

Sistemas de Transducción de Señales en la Hipertrofia Cardíaca

Loreto Carrasco, Mario Chiong, Cristián Ibarra, Ximena Campos, Mario Tello, Mario Sapag-Hagar, Guillermo Díaz-Araya, Sergio Lavandero

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile.

Los cardiomiocitos son células terminalmente diferenciadas que cesan de dividirse inmediatamente después del nacimiento. Esto hace del corazón un órgano muy vulnerable a eventos isquémicos, tóxicos e inflamatorios. La sobrecarga hemodinámica induce hipertrofia cardíaca, produciendo un aumento de sarcómeros y del volumen celular. Aunque la hipertrofia es inicialmente beneficiosa, aumentando el gasto cardíaco, finalmente es deletérea, generando cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca y muerte súbita.

El estiramiento mecánico de los cardiomiocitos activa la expresión de genes hipertrofos y de factores de crecimiento cardíacos (agonistas adrenérgicos, Ang II, ET-1, IGF-1, CT-1, FGF-2, TGF- β , hormonas tiroideas, TNF- α , LIF). Estos factores humorales activan diversas vías transduccionales responsables de la expresión de genes hipertrofos. Estas vías son: proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas), proteína kinasa C (PKC), proteína kinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK) y calcineurina. Las MAPKs (ERK, JNK y p38-MAPK) se activan por fosforilación secuencial en cascada. La PKC se activa por receptores acoplados a la proteína Gq. Ambas vías se interrelacionan y controlan factores transcripcionales responsables de la hipertrofia. La calcineurina es una fosfatasa dependiente de Ca²⁺ y CaM que desfosforila y activa a NFAT3. La CaMK activa a MEF2 al disociarlo de una desacetilasa de histona tipo II. MEF2 y NFAT3 son factores transcripcionales que controlan la expresión de genes hipertrofos.

El uso combinado de la manipulación mecánica/quirúrgica, animales transgénicos, adenovirus modificados genéticamente e inhibidores químicos farmacológicos, han contribuido a dilucidar las vías transduccionales involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Sin embargo, recién se están empezando a vislumbrar los mecanismos por los cuales las distintas vías conversan entre sí. Sólo entendiendo la compleja interrelación de las múltiples vías transduccionales se podrán diseñar fármacos que permitan controlar el proceso hipertrofos.

Signaling Mechanisms in Cardiac Hypertrophy

Cardiomyocytes are completely differentiated cells, which are unable to proliferate. Because this characteristic, the heart is a very sensitive organ to ischaemic, toxic and inflammatory events. Haemodinamic overload induces hypertrophy by increasing the sarcomere number and cellular volume. Although hypertrophy is initially beneficial, by increasing cardiac output, it finally causes a harmful effect, by generating cardiomyopathy, heart failure and sudden death.

Cardiomyocyte stretching activates the expression of hypertrophic genes and cardiac growth factors (adrenergic agonists, Ang II, ET-1, IGF-1, CT-1, FGF-2, TGF- β , thyroid hormones, TNF- α , LIF). These humoral factors activate

several transductional pathways responsible for controlling hypertrophic gene expression. These pathways are: mitogen activated protein kinases (MAP kinases), protein kinase C (PKC), calcium/calmodulin dependent protein kinase (CaMK) and calcineurin. A sequential phosphorylation cascade activates MAPKs (ERK, JNK y p38-MAPK). PKC is activated by Gq-coupled receptors. Both pathways are interrelated and they control hypertrophy-related transcriptional factors. Calcineurin (CnA) is a Ca^{2+} /CaM phosphatase, which dephosphorylates and activates NFAT3. CaMK phosphorylates a type II histone deacetylase and therefore dissociates and activates MEF2. Both MEF2 and NFAT3 are transcriptional factors that control hypertrophic gene expression.

The integrate use of surgical/mechanical approaches, transgenic animals, genetic modified adenovirus and pharmacological inhibitors have contributed to elucidate transductional pathways involved in the cardiac hypertrophy development. However, different cross-talkings among pathways are just beginning to be discovered. Only understanding the complexity of these transductional pathway interrelations, new drugs to control cardiac hypertrophy will be developed.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS CARDÍACAS

El corazón es una bomba mecánica compuesta por diversos tipos celulares. Los cardiomiocitos y los fibroblastos dan cuenta del 33 y 66% del total de células cardíacas, respectivamente (Figura 1)¹. Los cardiomiocitos, protagonistas centrales en el proceso

de contracción cardíaca, son células muy especializadas (terminalmente diferenciadas) que cesan de dividirse casi inmediatamente después del nacimiento, permaneciendo por el resto de su existencia con su ciclo celular detenido^{2,3}. Esta restricción evolutiva hace del tejido cardíaco un órgano particularmente vulnerable a eventos isquémicos, tóxicos e inflamatorios.

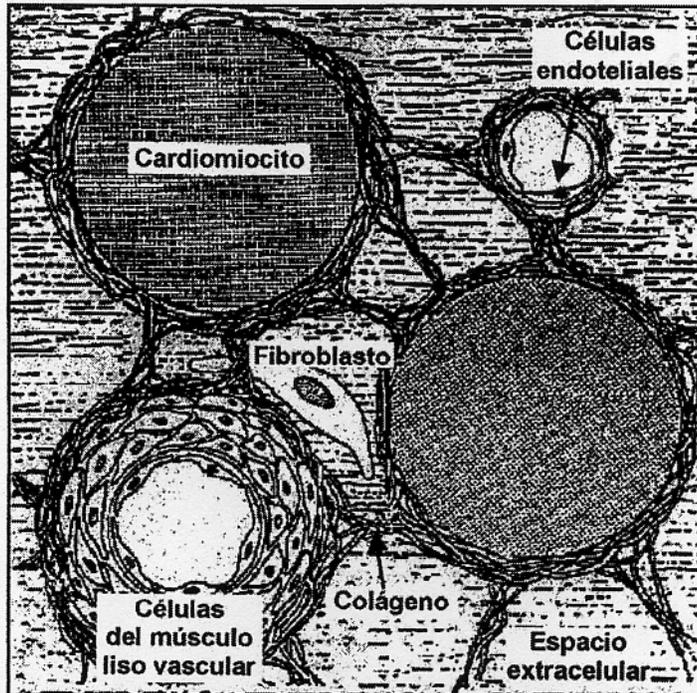


Figura 1. Representación esquemática de la organización tisular cardíaca. El corazón está compuesto principalmente por cardiomiocitos y fibroblastos, dando cuenta del 33 y 66% de las células, respectivamente. Otros componentes celulares son las células endoteliales y las células del músculo liso vascular.

Los fibroblastos, a diferencia de los cardiomiocitos, proliferan y se diferencian en respuesta a diversos mitógenos y son los únicos responsables de la producción de los distintos componentes de la matriz extracelular cardíaca, principalmente colágenos, laminina, fibronectina, etc⁴.

HIPERTROFIA DEL CARDIOMIOCITO

A fin de responder a crecientes requerimientos de trabajo que impone la sobrecarga hemodinámica en ciertas etapas del desarrollo fetal, los cardiomiocitos, además de proliferar, experimentan un aumento importante del número de sarcómeros por célula y de su volumen celular, proceso conocido como hipertrofia⁵. Esta misma respuesta adaptativa se activa en el corazón adulto expuesto a estímulos patológicos que imponen un mayor trabajo cardíaco, entre los que figuran hipertensión arterial, infarto al miocardio, desórdenes endocrinos y enfermedades valvulares o alteraciones genéticas en la función del sarcómero⁵.

Aunque la hipertrofia es inicialmente beneficiosa, permitiendo aumentar el gasto cardíaco, ésta finalmente llega a ser deletérea, generando insuficiencia cardíaca y asociándose a un aumento en la mortalidad^{6,7}. Diversos estudios epidemiológicos han esta-

blecido que la hipertrofia cardíaca es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca y otras patologías cardiovasculares⁷.

El cardiomiocito, en respuesta a un estímulo hipertrofico, activa una respuesta celular caracterizada principalmente por un aumento de la síntesis proteica, de proteínas contráctiles, tales como la α -actina esquelética (SKA) o la cadena pesada de la β -miosina (β -MHC), en el tamaño celular, número de sarcómeros y la reexpresión de genes que codifican para proteínas cardíacas fetales². Los aumentos en los niveles de los mRNAs para el factor natriurético auricular (ANF) y SKA, y la presencia de diversas isoformas de receptores para hormonas tiroideas se han utilizado como marcadores para distinguir un estímulo trófico normal de uno de naturaleza patológica (Figura 2)².

EL ESTRÉS HEMODINÁMICO INDUCE DIRECTAMENTE LA HIPERTROFIA DE LOS CARDIOMIOCITOS

Las fuerzas hemodinámicas regulan la estructura y función de los distintos tipos celulares en el sistema cardiovascular, en particular de los cardiomiocitos, que son células expuestas a continuos cambios mecánicos a lo largo de toda su existencia⁸. Los repetitivos eventos de relajación y contracción, propios del ciclo

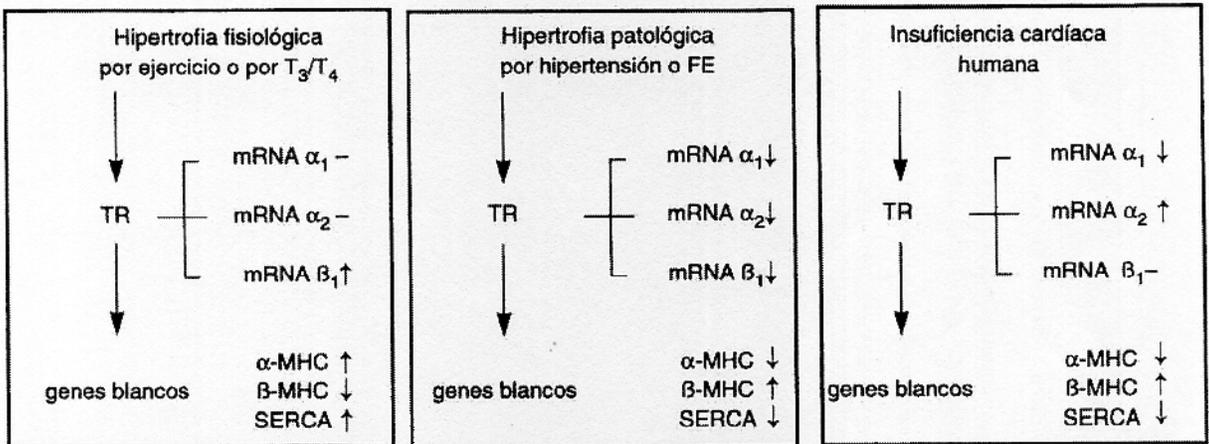


Figura 2. Cambio en los niveles de expresión de los mRNAs para las distintas isoformas de receptores para hormonas tiroideas (TR: α_1 , α_2 y β_1) en el corazón con hipertrofia fisiológica, patológica y con insuficiencia cardíaca. Los cambios en las isoformas de los TR se traducen a su vez en alteraciones en los niveles de expresión de α -MHC, β -MHC y SERCA. \uparrow : aumento de la expresión; \downarrow : disminución de la expresión; -: sin variación en la expresión; α -MHC: cadena pesada de la α -miosina; β -MHC: cadena pesada de la β -miosina, SERCA: bomba de calcio del retículo sarcoplásmico; FE: fenilefrina.

contráctil del miocardio, y el estiramiento ("stretching") producido por la presión y volumen sanguíneos, regulan la función y estructura del tejido cardíaco⁹. La sobrecarga mecánica crónica, clínicamente representada por la hipertensión arterial, remodela estructural y funcionalmente el corazón a través del desarrollo de complejos procesos de hipertrofia y apoptosis en los cardiomiocitos, hiperplasia de los fibroblastos y estimulación de la biosíntesis de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular (fibrosis). Todos estos cambios modifican la función cardíaca¹⁰.

Existe gran controversia sobre si el estímulo primario que induce la hipertrofia es el estrés mecánico o la acción coordinada de varios factores neuronales y/o humorales. Algunos estudios han demostrado que la activación de los receptores adrenérgicos es un evento intermediario de la sobrecarga hemodinámica y de la hipertrofia cardíaca⁶. Sin embargo, existen evidencias que indican que el estiramiento mecánico es el factor inicial para la generación de hipertrofia cardíaca en respuesta a una sobrecarga hemodinámica. Corazones denervados sometidos a sobrecarga hemodinámica incrementan su síntesis proteica y se hipertrofian⁶. Estudios en órgano aislado y dispositivos de tensión mecánica para cultivo celular, reproducen fielmente las respuestas mediadas por los estímulos mecánicos¹¹⁻¹³. Se ha demostrado que tanto los cardiomiocitos como

los fibroblastos cardíacos "sensen" la sobrecarga mecánica externa, en ausencia de agentes neurohumorales. Se han observado incrementos en la síntesis de proteínas contráctiles, sin cambios en la síntesis de DNA, y la activación de la transcripción de genes implicados en el proceso hipertrófico (ANF, c-fos y β -MHC) en cardiomiocitos sembrados sobre sustratos elásticos deformables y sometidos a estiramiento¹³⁻¹⁶. El fenotipo de estos cardiomiocitos estirados es semejante al observado durante el desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda inducida por hipertensión renovascular¹⁷. Hoy en día existen claras evidencias que la sobrecarga hemodinámica conduce a un estiramiento de las células del miocardio, activando la expresión de genes de hipertrofia tempranos y tardíos, y que este estímulo a su vez induce la expresión génica de factores de crecimiento cardíacos, desarrollando el proceso hipertrófico en el corazón^{6,18,19}.

FACTORES HUMORALES QUE MEDIAN LA HIPERTROFIA CARDÍACA

Se ha sugerido que las diferentes células cardíacas producen y secretan algunos factores de crecimiento y péptidos vasoactivos en respuesta al estiramiento producido por sobrecarga hemodinámica (Figura 3)^{18,19}.

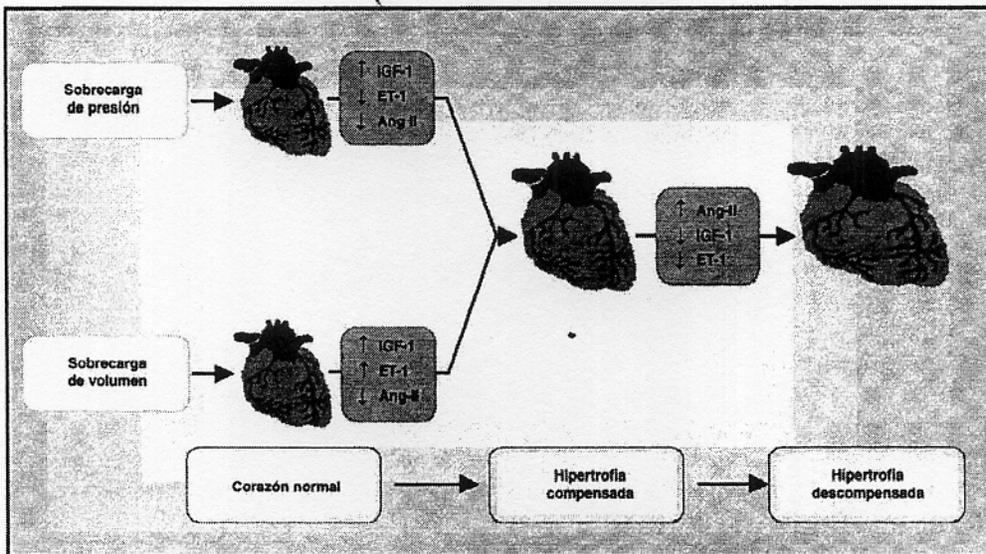


Figura 3. Inducción de la hipertrofia cardíaca. Los distintos estímulos hemodinámicos, sobrecarga de presión y sobrecarga de volumen, inducen distintos factores humorales en el corazón. Estos factores humorales actúan de manera autocrina/paracrina produciendo remodelamiento cardíaco. El factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1) y la endotelina 1 (ET-1) son factores cardioprotectores que se expresan en la fase compensada de la hipertrofia. En la fase descompensada se reprime la expresión de IGF-1 y ET-1 y se induce angiotensina II (Ang II), un factor hipertrófico que, además, induce apoptosis de los cardiomiocitos.

El sistema adrenérgico es un mediador importante de la respuesta a una sobrecarga hemodinámica y es, además, un potente inductor de la hipertrofia cardíaca⁶. Por otra parte, el estiramiento estimula la síntesis y secreción de angiotensina II (Ang II), endotelina 1 (ET-1), factor de crecimiento análogo a insulina análogo tipo 1 (IGF-1) en los cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos^{6,20,21}. Todos estos factores son inductores del proceso de hipertrofia en el músculo cardíaco. Utilizando distintas cardiopatías (dos valvulopatías, estenosis aórtica y regurgitación aórtica), Neri Sernerí y cols. definieron un modelo humano para el estudio de la inducción de tres factores de crecimiento (IGF-1, ET-1 y Ang II) por sobrecarga hemodinámica en corazón humano²². Se determinó que pacientes que tenían hipertrofia cardíaca compensada inducida por estenosis aórtica, equivalente a un modelo de sobrecarga de presión, expresaban IGF-1 a nivel de mRNA y de proteína, mientras que aquellos que sufrían hipertrofia compensada inducida por regurgitación aórtica, equivalente a un modelo de sobrecarga de volumen, inducían IGF-1 y ET-1 a nivel de mRNAs y proteína. Sin embargo, cuando se realizó el análisis en pacientes que sufrían hipertrofia descompensada, se determinó que los niveles de expresión de IGF-1 y ET-1 eran muy bajos y se inducía la expresión de los mRNA y proteína para Ang II²². De este trabajo se puede deducir que la inducción de los distintos factores humorales depende del estímulo hipertrofico. El IGF-1 sería un factor humoral primario y menos específico en la respuesta hipertrofica, mientras que la Ang II sería inducida sólo en la etapa final y patológica (Figura 3). Es importante hacer notar que tanto IGF-1 como ET-1 son factores de crecimiento que poseen propiedades cardioprotectoras, mientras que la Ang II es un conocido inductor de muerte celular programada o apoptosis, en los cardiomiocitos²².

Norepinefrina (NE). La NE es un potente estimulador del crecimiento de cardiomiocitos. La administración de dosis subhipertensivas de NE aumenta la masa del miocardio y el grosor de la pared del ventrículo izquierdo. En el corazón existen receptores α_1 , β_1 y β_2 -adrenérgicos⁶. La NE estimula la hipertrofia de los cardiomiocitos neonatos de rata a través de los receptores α_1 -adrenérgicos y no a través de los receptores β -adrenérgicos. La hipertrofia cardíaca inducida por agonistas β -adrenérgicos sería secundaria a una estimulación adrenérgica de la frecuencia cardíaca⁶. Sin embargo, también se ha descrito que la síntesis proteica de los cardiomiocitos es estimulada tanto por los receptores α_1 como los β -adrenérgicos⁶. Ratones

transgénicos que expresan el receptor α_{1B} -adrenérgico constitutivamente activo exhiben signos de hipertrofia cardíaca. Estos ratones expresan bajos niveles de estos receptores en la aurícula durante el desarrollo, pero su número aumenta en los ventrículos poco después del nacimiento. Estos ratones transgénicos contienen aproximadamente 3 veces más receptores α_{1B} -adrenérgicos en el corazón que los silvestres. Estos resultados indican que una estimulación α -adrenérgica es suficiente por sí sola para inducir hipertrofia *in vivo*²³.

Angiotensina II. En el corazón se han detectado mRNA y proteína de todos los componentes del sistema renina-angiotensina [renina, angiotensinógeno, enzima convertidora de angiotensina (ECA) y receptores de angiotensina II (rAT)]^{6,24}. Se ha observado la activación de este sistema en la hipertrofia ventricular izquierda inducida por sobrecarga hemodinámica. Además se han detectado aumentos en los niveles de mRNA para angiotensinógeno, ECA y rAT tipo 1 y 2 en los ventrículos izquierdos hipertrofiados de rata. Dentro de los antihipertensivos más usados en humanos, los inhibidores de ECA son los que manifiestan el efecto más potente de reducción de la hipertrofia cardíaca, produciendo una mejora en la función ventricular izquierda y aumento en la sobrevida^{6,24,25}. Estos hallazgos sugieren que el sistema renina-angiotensina producido localmente juega un papel primordial en la hipertrofia cardíaca producida por sobrecarga hemodinámica, en que Ang II actúa como un promotor del crecimiento de los cardiomiocitos por un mecanismo autocrino y paracrino, y que la regresión de la hipertrofia cardíaca por inhibidores de ECA y por antagonistas del rAT no sólo se debe a una reducción de la presión sanguínea, sino que también a una inhibición tisular del sistema renina-angiotensina^{6,24,25}.

Endotelina I (ET-1). Este péptido es sintetizado, almacenado y liberado en el corazón humano. Todos los componentes del "sistema de la endotelina", es decir, los precursores de ET-1, las enzimas convertidoras de endotelina y sus receptores, se encuentran localizados en el corazón humano²⁶. ET-1, de origen paracrino, activa receptores específicos, modificando directamente la función cardíaca. Los efectos del sistema de ET-1 son diversos y juegan un papel crucial en el desarrollo y remodelamiento del corazón insuficiente y en la modulación de la contractibilidad cardíaca²⁶. Se ha postulado que ET-1 participa en la generación de la hipertrofia cardíaca humana basado

en el hecho de que los pacientes que poseen cardiopatía hipertrófica poseen altas concentraciones plasmáticas de ET-1, en comparación con controles sanos. Además, en este tipo de pacientes se observó una correlación positiva entre la formación de ET-1 y el grosor relativo de la pared ventricular izquierda. Por otro lado, la administración crónica de antagonistas para los receptores de ET-1 reduce la hipertrofia miocárdica en animales con insuficiencia cardíaca inducida experimentalmente²⁶.

Factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1). En el corazón, el IGF-1 aumenta la síntesis de DNA y de proteínas, reduce la degradación de las proteínas, y participa en la proliferación y maduración de los cardiomiocitos en la etapa neonatal temprana. El IGF-1 promueve el crecimiento cardíaco, mejora la contractibilidad y el gasto cardíaco, el volumen de expulsión y la fracción de eyección. En humanos, el IGF-1 mejora la función cardíaca después de un infarto al miocardio a través de la estimulación de la contractibilidad y la promoción del remodelamiento tisular²⁷. Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el IGF-1 es capaz de proteger a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por diferentes tipos de estrés, incluido el estrés hiperosmótico²⁸. El IGF-1 tiene un papel importante en la respuesta hipertrófica del miocardio. Induce hipertrofia en ratas hipofisectomizadas y en ratas con hipófisis intactas^{27,29}. En cardiomiocitos de rata neonatas, este factor está asociado con la expresión de proteínas contráctiles tales como actina, cadena liviana de la miosina-2, troponina-1, β -MHC y SKA^{27,29,30}. En nuestro laboratorio se ha determinado que el IGF-1 generado localmente en el corazón, y no el IGF-1 circulante, es el que contribuye a la generación de hipertrofia ventricular izquierda generada por hipertensión renovascular³¹. Utilizando el cDNA para IGF-1B humano controlado bajo el promotor de la α -MHC, se construyó un ratón transgénico que sobreexpresaba IGF-1 en el miocardio. En este ratón, el peso del corazón se incrementó en un 50% y el número de cardiomiocitos aumentó entre un 20 a un 50%, pero sorprendentemente, no se observó hipertrofia cardíaca²⁷. En contraste, otro estudio reciente informó que la sobreexpresión de una forma local de IGF-1 en los corazones de ratones transgénicos era suficiente para un fenotipo hipertrófico que conducía a una reducción del rendimiento sistólico³⁰. Por otro lado, también hay una falta de consenso respecto al fenotipo cardíaco asociado con la deficiencia de IGF-1. La deficiencia de hormona de crecimiento e IGF-1 en

humanos se ha asociado a atrofia cardíaca y a una reducción en la función cardíaca. Sin embargo, ratones deficientes en IGF-1 poseen presión arterial elevada y una contractibilidad cardíaca aumentada³⁰.

Otros factores humorales. La cardiotropina-1 (CT-1), un miembro de la familia de las interleukinas 6, se descubrió originalmente como un factor que induce hipertrofia cardíaca, tanto *in vivo* como *in vitro*³². Actualmente se sabe que, además de inducir hipertrofia, es un potente cardioprotector. La hipertrofia inducida por CT-1 es diferente a la inducida por los receptores α -adrenérgicos, tanto en morfología celular como en el patrón de expresión génica³². La estimulación con CT-1 aumenta el tamaño del cardiomiocito por un aumento más en su longitud que su ancho. Además, las células estimuladas con CT-1 muestran un ensamble de unidades sarcoméricas en serie en vez de paralelas, tal como ocurre en la estimulación α -adrenérgica³². El factor de crecimiento de fibroblasto 2 (FGF-2) (también llamado FGF básico) y el factor de crecimiento transformante tipo α (TGF- β) son otros factores de crecimiento peptídicos que inducen un programa genético similar al fetal en cultivos de miocitos de ratas neonatas, consistente con la inducción del programa hipertrófico^{21,30}. Tanto FGF-2 como TGF- β son producidos tanto por cardiomiocitos u otras células dentro del corazón, actuando como factores de crecimiento autocrinos o paracrinos³⁰. Las hormonas tiroideas, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y la linfokina de la familia de las interleukinas 6, el factor inhibidor de leucemia (LIF), también son factores humorales inductores de hipertrofia del corazón^{23,30}.

SISTEMAS TRANSDUCCIONALES MEDIADORES DE LA RESPUESTA HIPERTRÓFICA EN EL CARDIOMIOCITO

Tanto el estudio de los sistemas de transducción de señales como el de los mecanismos de comunicación intercelular han experimentado en los últimos años un notable avance, no exento de complejidad, lo que está permitiendo un mayor entendimiento de cómo las células reciben y coordinan señales del entorno y de otras células del propio organismo a fin de controlar de esa manera los procesos de diferenciación, proliferación, morfología, migración, hipertrofia, muerte celular, etc.

La dilucidación de los sistemas de transducción de señales que activan los programas de hipertrofia en el cardiomiocito representa un gran desafío para las

décadas venideras en la cardiología molecular. Los avances recientes en genética molecular han permitido el estudio en detalle de las vías de transducción intracelulares involucradas en la hipertrofia cardíaca. Se han generado varios ratones transgénicos que han permitido la disección molecular de las distintas vías transduccionales, imitando las características principales de la hipertrofia e insuficiencia cardíaca en humanos^{23,33}. De estos estudios, se han identificado varias vías transduccionales que juegan un papel importante en dichos procesos. Estas vías incluyen: a) las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas); b) proteína kinasa C (PKC); y c) proteína kinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK) y proteína fosfatasa calcineurina^{23,31,33,34}.

a) Sistema transduccional de las MAP kinasas

Las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas) corresponden a una serie de enzimas intra-

celulares que tienen la propiedad de regular por fosforilación a un conjunto diverso de sustratos que controlan la transcripción de genes y la síntesis de proteínas, como por ejemplo factores transcripcionales y proteínas reguladoras de la síntesis proteica. Estos dos últimos procesos bioquímicos son muy importantes en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y por ello se han estudiado intensamente en el cardiomiocito.

Las MAPKs se subdividen en tres subfamilias: proteínas kinasas reguladas extracelularmente (ERKs), proteínas kinasas activadas por estrés (kinasas N-terminal de c-Jun, JNKs), y proteínas kinasas p38 (p38-MAPKs)^{30,31,33-35}. Cada una de estas subfamilias consiste en cascadas de MAP kinasa kinasa kinasas (MEKKs o MKKKs), MAP kinasa kinasas (MEKs o MKKs) y MAP kinasas. Estas cascadas se activan por la fosforilación secuencial en residuos tirosina y treonina de las kinasas (Figura 4)³⁵. En algunos tipos celulares se sabe que las MAPKs regu-

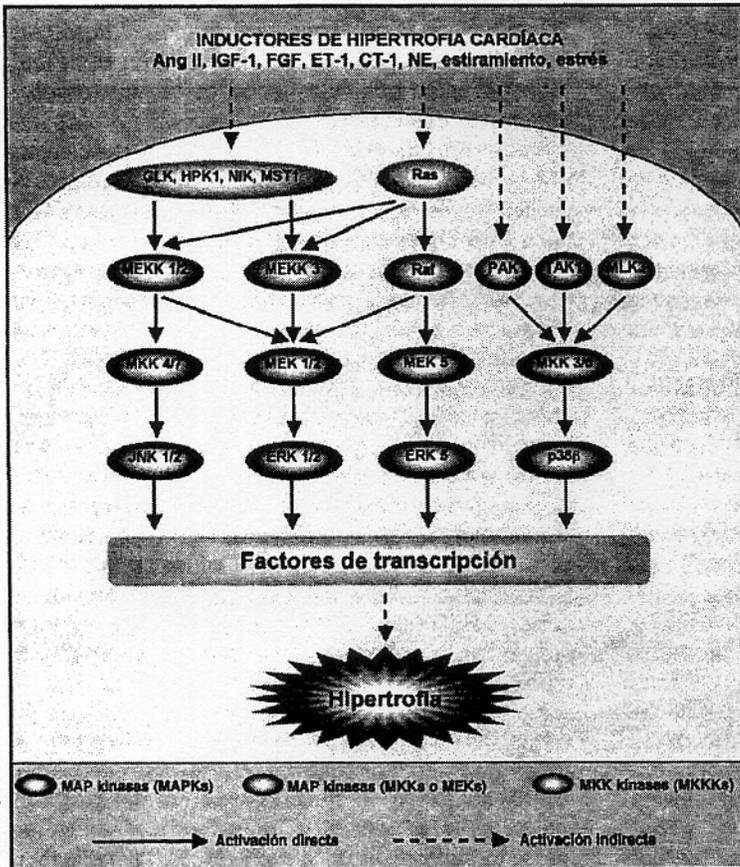


Figura 4. Vías de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas) en cardiomiocitos. Las MAPKs se dividen en tres subfamilias: ERKs, JNKs y p38 MAPKs. Cada una de estas subfamilias se activan por fosforilación secuencial de MAP kinasa kinasa kinasas (MKKKs o MEKKs), MAP kinasa kinasas (MKKs o MEKs) y MAPKs. Las MAPKs regulan la actividad de factores transcripcionales involucrados en la expresión de genes responsables del desarrollo de la hipertrofia cardíaca.

lan la proliferación celular mediante la fosforilación de factores transcripcionales (ej: c-Jun y ATF). Aunque la activación de las MAP kinasas se ha correlacionado con el inicio de la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca, su papel específico en el corazón intacto aún no se ha dilucidado completamente³³.

Existen 5 isoformas de ERK, siendo las más importantes ERK1, ERK2 y ERK5, que son fosforiladas coordinadamente y activadas por múltiples estímulos mitogénicos. Los principales activadores río arriba de las ERK1 y 2 son dos MAPKKs, denominadas MEK1 y MEK2, las cuales fosforilan directamente el sitio dual en Thr-Glu-Tyr en las ERK1 y 2. Directamente río arriba de MEK1 y 2 están las MAPKKK denominadas Raf-1, A-Raf, B-Raf, y MEKK1-3 (Figura 4)³⁰. La cascada de las ERKs se activan por varios estímulos hipertroáficos, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos, ET-1, agonistas adrenérgicos, ésteres de forbol y estimulación^{30,32}. Se ha demostrado que las ERKs son un componente esencial de la hipertrofia inducida por ET-1 y fenilefrina³³. Sin embargo, la activación directa de ERKs en cultivos de cardiomiocitos ha originado resultados ambiguos en la inducción de la hipertrofia³³. Nosotros hemos demostrado que la incubación de cardiomiocitos de rata con IGF-1 induce la activación de c-Raf, seguida de una fosforilación de MEK y, finalmente, la fosforilación y activación de las ERK1 y 2³⁶. La inhibición de las ERKs bloquea la manifestación de algunas de las características típicas de la respuesta hipertrofica (aumento del tamaño celular y síntesis proteica)³⁷. Animales transgénicos que sobreexpresan Ras o MEK1 producen hipertrofia concéntrica en el ventrículo³³. Una diferencia importante entre ambos modelos transgénicos es que la hipertrofia mediada por Ras se asocia a defectos en la función diastólica y muerte súbita, mientras que la inducida por MEK1 tiene una función hipertrofica con una supervivencia normal, representando un estado de hipertrofia compensada³³. La diferencia puede deberse a que Ras está localizado río arriba de MEK1, y puede inducir un proceso de hipertrofia compensada a través de Raf-MEK-ERK, pero también puede inducir otras vías transduccionales paralelas que pueden causar la disfunción diastólica³³.

La MAPK kinasa denominada MEK5 activa a ERK5 (Figura 4). En cultivos de cardiomiocitos, la expresión de una forma constitutivamente activa de MEK5 induce una forma de hipertrofia en la cual los cardiomiocitos adquieren una morfología elongada, con sarcómeros ensamblados en serie³⁸. La citokina LIF, que estimula a MEK5, induce una respuesta similar en los cardiomiocitos. La hipertrofia inducida por

LIF es bloqueada específicamente por un dominante negativo de MEK5³⁸. Ratones transgénicos que expresan MEK5 constitutivamente activa, desarrollan una hipertrofia cardíaca excéntrica que progresa a una cardiomiopatía dilatada y muerte súbita³⁸. Estos resultados indican que la vía MEK5-ERK5 participa en la inducción de la hipertrofia excéntrica y son parte de los mecanismos de transducción de las señales hipertroficas inducidas por citocinas, tales como LIF y CT-1.

Tanto JNK como p38-MAPKs son consideradas MAP kinasas activadas por estrés, e inducidas por diversos estrés celulares, de naturaleza química y física. En células de mamífero se han identificado tres genes que codifican para JNK. Cada una es activada por las MAPK kinasas MKK4 y MKK7, que a su vez son activadas por MEKK1 o MEKK2. Las MKKKs río arriba de MEKK1 y 2 incluyen a GLK, HPK1, NIK, MST1, miembros de las proteínas G de bajo peso molecular (Ras) y Grb2 (Figura 4)³⁰. JNK es fosforilada directamente por MKK4 o MKK7 en un sitio dual que comprende a los aminoácidos Thr-Pro-Tyr³⁰. En el corazón se expresan JNK1 y JNK2, mientras que JNK3 está casi exclusivamente restringida al cerebro³⁰. La activación de JNK en cardiomiocitos de ratas neonatas induce los fenotipos característicos de hipertrofia, mientras que la activación *in vivo* de JNK produce una hipertrofia leve pero con una función cardíaca profundamente deprimida^{33,39}. La expresión de un dominante negativo para MKKK1 (que activa tanto las vías transduccionales JNK como ERK) en el cardiomiocito, bloqueó la inducción del ANF por fenilefrina, mientras que la expresión de un mutante de Raf (que activa sólo a la vía ERK) no tuvo efecto, sugiriéndose de esta forma un papel clave para JNK. La sobreexpresión, mediante adenovirus, de una forma constitutivamente activa de MKK7 en cultivos de cardiomiocitos, que activa específicamente a JNK sin alterar las actividades de ERK y p38-MAPK, indujo la respuesta hipertrofica⁴⁰. En forma similar, un mutante dominante negativo para MKK4 (también específico para la vía JNK) bloqueó la hipertrofia estimulada por ET-1⁴¹. La primera evidencia que demostró *in vivo* el papel de JNK en la hipertrofia cardíaca se logró mediante la introducción de un dominante negativo de un activador de JNK, la MKK4, conocida también como SEK-1 (proteína kinasa-1 activada por estrés), en el miocardio de ratones mediante transferencia génica mediada por adenovirus. En estos animales se logró bloquear la activación de JNK mediada por sobrecarga de presión, y con ello se atenuó la hipertrofia cardíaca y la inducción del marcador

génico de hipertrofia, ANF³³. Basado en todos estos antecedentes se ha sugerido que JNK tiene un papel crítico en la hipertrofia cardíaca inducida por estrés mecánico, pero que la inducción de sólo JNK no es suficiente para inducir la hipertrofia.

Se han descrito cuatro isoformas de p38-MAPK, denominadas α , β , γ y δ ³⁰. Los principales activadores α de p38 MAPKs son dos MAPKKs, MKK3 y MKK6, las que fosforilan directamente el sitio dual Thr-Gly-Tyr de las p38 MAPKs. En el cardiomiocito se sabe muy poco de los factores MAPKKK que están α arriba de MKK3 y MKK6, aunque se han identificado como potenciales activadores a PAK, TAK1 y MLK3 (Figura 4)³⁰. La activación p38-MAPK también ha sido implicada en el proceso hipertrófico inducido por sobrecarga de presión e hipertrofia/insuficiencia cardíaca mediada por la proteína Gq^{41,42}. El papel funcional de p38-MAPK se ha complicado por el hecho de que en el tejido cardíaco existen dos isoformas de p38, llamadas α y β , y cada una de ellas puede ejercer funciones diferentes^{33,42}. Las isoformas p38 γ y p38 δ son indetectables en el corazón³⁰. En cultivos de cardiomiocitos, p38 α está involucrada en la apoptosis, mientras que p38 β media la hipertrofia cardíaca y la sobrevida^{33,42,43}. La activación específica de p38 *in vivo* no produce una hipertrofia significativa pero, sin embargo, produce una forma única de cardiomiopatía caracterizada por una disfunción contráctil, miocardio rígido y la inducción de marcadores genéticos embrionarios³³. Se demostró que la sobreexpresión de p38-MAPK o MKK6 (que activa a p38-MAPK pero no a JNK ni ERK) aumentaba la expresión del gen para ANF. Esta respuesta fue potenciada por agonistas hipertróficos y bloqueada por los inhibidores farmacológicos SB-203580 y SB-02190. Estos inhibidores previnieron los cambios morfológicos asociados a la hipertrofia en células tratadas con ET-1 o con la citokina LIF^{30,33}. Además, la transferencia genética mediada por adenovirus de un dominante negativo de p38 β MAPK bloqueó la respuesta hipertrófica en cardiomiocitos de ratas neonatas³⁰. Estos resultados han sugerido que p38 β MAPK es un importante regulador de la hipertrofia *in vitro*.

b) Sistema transduccional proteína Gq/proteína quinasa C (PKC)

La hipertrofia cardíaca es mediada en parte por una estimulación autocrina/paracrina del miocardio estresado. En este contexto, los receptores acoplados a proteína G de dominios de transmembrana juegan un papel importante en la detección de las señales hiper-

tróficas extracelulares. Estos receptores incluyen a los receptores α_1 - y β_1 -adrenérgicos, el receptor para Ang II, y el receptor para ET. En respuesta a la unión de un ligando, tres de estos receptores estimulan enzimas efectoras que incluyen a la fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa C (PKC), y MAPKs, vía la proteína heterotrimérica que une GTP denominada Gq^{23,24,26}. En cambio, el receptor β_1 -adrenérgico interacciona con las proteínas de la clase Gs para estimular la adenilato ciclasa y subsecuentemente a la proteína quinasa A (PKA)²³.

Varios estudios *in vitro* han sugerido un papel para los receptores acoplados a Gq en la hipertrofia cardíaca. Cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas inducidas con Ang II, ET-1 o fenilefrina exhibieron todas características de una respuesta hipertrófica, incluyendo aumento del tamaño, organización sarcomérica y reactivación del programa fetal de expresión genética cardíaca²³. Ratones transgénicos que sobreexpresaban el receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico indujeron hipertrofia, detectándose un aumento considerable de la actividad de la PLC, determinada a través del aumento del contenido de diacilglicerol miocárdico (Figura 5)²³. Sin embargo, el fenotipo observado por la sobreexpresión del receptor AT₁, en corazón de ratones transgénicos fue muy diferente al observado con aquellos ratones que sobreexpresaban el receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico. Los ratones transgénicos AT₁ murieron *in utero* o poco después de nacer, con una aurícula muy desarrollada, pero sin cambio en la morfología ventricular²³. El aumento de la aurícula fue el resultado de una hiperplasia del miocito y no de hipertrofia, un resultado sorprendente ya que Ang II es un potente inductor de hipertrofia *in vitro*²³. Al interrumpir el gen que codifica para AT₁ por recombinación homóloga, los ratones transgénicos resultantes no presentaron diferencias significativas en la extensión de la hipertrofia ventricular izquierda, activación de los genes fetales cardíacos o fibrosis inducidas por constricción aórtica²³. Estos resultados indican que, *in vivo*, la señalización vía AT₁ no sería necesaria para la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión.

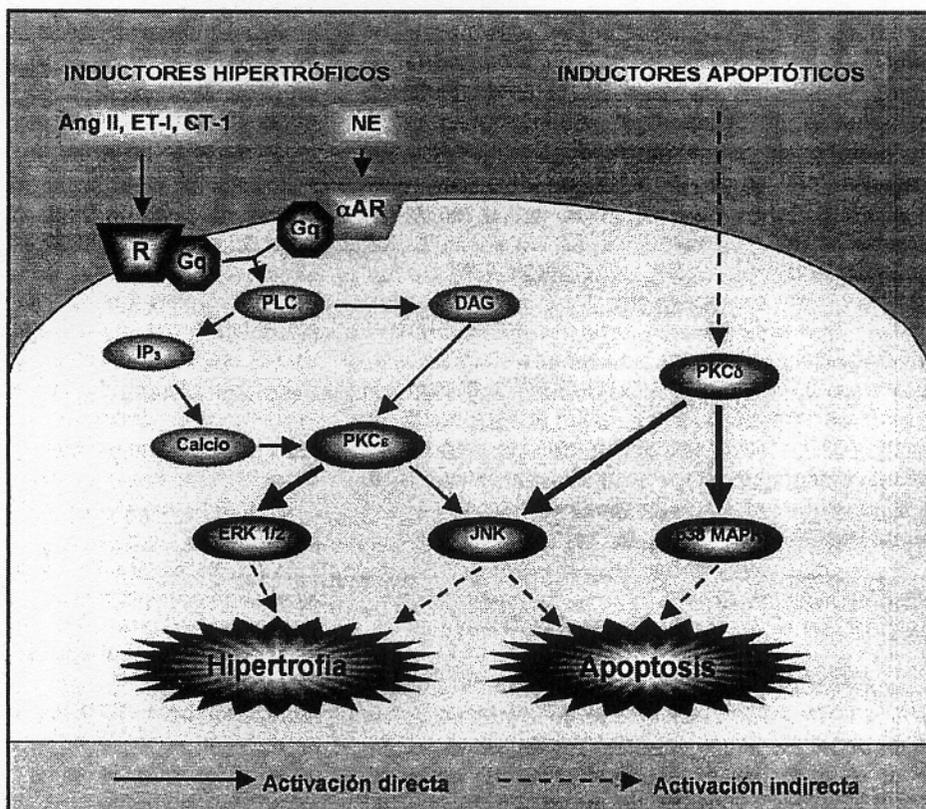
En células no estimuladas, las proteínas Gq existen como un heterotrímero conformado por una subunidad unida a GDP que interacciona con subunidades β y γ . La unión de un agonista al receptor disocia el complejo trimérico en un dímero $\beta\gamma$ y una subunidad α libre. Paralelamente, GTP se intercambia con GDP en la subunidad α , volviéndola competente para activar a la PLC²³. La sobreexpresión de G α_q en ratones transgénicos fue suficiente para comenzar a expresar el pro-

grama fetal de expresión génica cardíaco que está asociado con una respuesta hipertrófica^{23,30}. En dosis transgénicas altas de este gen, los ratones desarrollaron cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca. Resultados similares se obtuvieron en ratones transgénicos que sobreexpresaban una forma constitutivamente activa de Gαq en el corazón. Sin embargo, en este modelo los animales desarrollaron un fenotipo más severo²³. En el período terminal de la preñez o inmediatamente después del parto, estos animales progresaron rápidamente a insuficiencia cardíaca, caracterizada por una dilatación masiva biventricular y baurículo-ventricular con congestión pulmonar, efusiones pleurales y ascitis³⁰. Histológicamente, estos cardiomiocitos exhibieron apoptosis, sin la reacción de inflamación que normalmente acompaña al proceso necrótico^{30,42}. Ambos resultados indican que la señalización vía Gαq es suficiente para inducir la hipertrofia cardíaca que conduce a una insuficiencia cardíaca (Figura 5).

La proteína kinasa C (PKC) consiste en una familia de más de 10 isoenzimas codificadas por diferentes genes. En base a sus propiedades enzimáticas, las isoformas de PKC se clasifican en dependientes de calcio (cPKC), independientes de calcio (nPKC) y las activadas por lípidos diferentes a diacilglicerol (aPKC). Una característica importante de las isoformas de PKC es que, una vez activadas, se translocan a diferentes sitios subcelulares³⁰.

En tejido cardíaco, la actividad de la PKC aumenta después de isquemia y sobrecarga de presión aguda o crónica, donde se postula que media el precondicionamiento isquémico y transduce la señal hipertrófica³⁰. La estimulación α-adrenérgica de cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas transloca PKCβI desde el citosol al núcleo, PKCβII desde las estructuras fibrilares al perinúcleo y sarcolema, PKCε desde el núcleo y citosol a las miofibrillas, y PKCδ a la región perinuclear³⁰. Esta compartimentalización implica funciones celulares específicas para cada iso-

Figura 5. Vía de la proteína Gq y proteína kinasa C (PKC) en la hipertrofia cardíaca. La angiotensina II (Ang II), endotelina 1 (ET-1), cardiotropina 1 (CT-1), norepinefrina y otros agonistas adrenérgicos (NE) inducen hipertrofia mediante la activación de la proteína Gq mediada por receptores, activando a la fosfolipasa C (PLC), responsable de aumentar los niveles de calcio y de diacilglicerol (DAG) intracelular. La isoforma PKCε activa a JNK y fuertemente a ERK1/2, induciendo el desarrollo de hipertrofia cardíaca. La isoforma PKCδ activa fuertemente a JNK y p38 MAPK, induciendo apoptosis en los cardiomiocitos.



forma. La activación de PKC ϵ y la regulación positiva de PKC α son dos de los muchos eventos celulares que se describen en el modelo de hipertrofia mediada por G α q³⁰. La sobreexpresión de PKC β III, bajo el control de un promotor truncado de la cadena pesada de α -miosina, en ratones transgénicos, indujo hipertrofia, fibrosis y disfunción sistólica³⁰. Usando un sistema de expresión inducible de PKC β constitutivamente activa se demostró que inducía hipertrofia cuando el transgen era inducido en corazón adulto, pero tenía un efecto letal cuando se inducía en ratones neonatos³⁰. Estudios más recientes se han enfocado a la sobreexpresión de isoformas de PKC más abundantes en el corazón adulto, tal como PKC ϵ . En este modelo se demostró que la translocación de un 20% de la PKC ϵ era suficiente para inducir un potente efecto protector sobre la función contráctil cardíaca y la integridad de los miocitos en corazones aislados sujetos a isquemia global con reperfusión³⁰. Estudios posteriores demostraron que PKC ϵ causa una forma fisiológica de hipertrofia, mientras que la inhibición de la translocación de PKC ϵ , produce el efecto opuesto, esto es, adelgazamiento de las paredes del ventrículo e insuficiencia cardíaca letal producida por una cardiomiopatía dilatada³⁰. Usando cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas y un adenovirus que codificaba una mutante constitutivamente activa de PKC ϵ (Ad-caPKC ϵ) se demostró que esta isoforma de PKC activaba fuertemente a ERK1/2 y en menor grado a JNK, mientras que p38 MAPK permanecía inalterada. Sin embargo, al usar un adenovirus que codificaba una forma constitutivamente activa de PKC δ (Ad-caPKC δ) se detectó una fuerte activación de JNK y p38-MAPK, pero no de ERK1/2 (Figura 5)⁴⁴. En estos cultivos, Ad-caPKC ϵ inducía hipertrofia en los cardiomiocitos, mientras que Ad-caPKC δ inducía apoptosis⁴⁴. Estos resultados permiten concluir que diferentes isoformas de PKC activan diferentes vías transduccionales de la MAPKs modulando diferencialmente la hipertrofia y la apoptosis de los cardiomiocitos.

c) Sistemas transduccionales dependientes de calcio/calmodulina

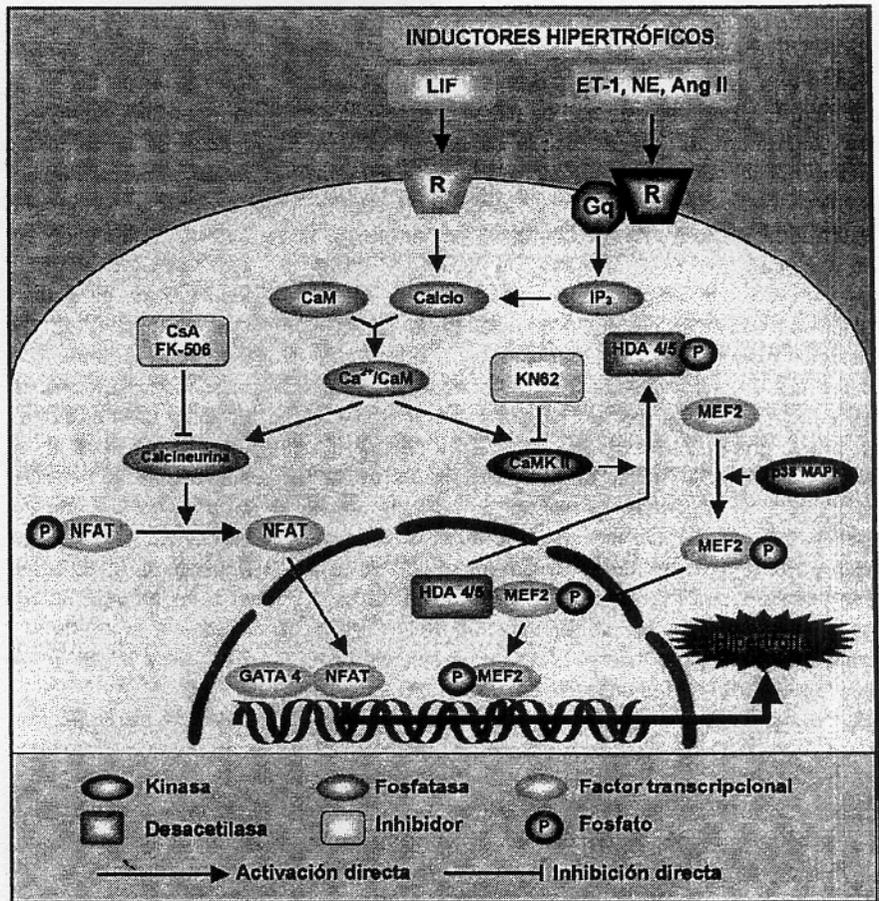
Numerosos estudios apoyan la idea de que el calcio (Ca²⁺) es una señal primaria para la hipertrofia cardíaca. Agonistas hipertróficos, tales como: Ang II, ET-1, agonistas adrenérgicos y el estiramiento mecánico, activan cascadas transduccionales dependientes de [Ca²⁺]_i^{23,30,45}. De una manera similar, el estiramiento de los cardiomiocitos, el aumento de la sobrecarga de trabajo en corazones aislados, el aumento de la con-

centración de Ca²⁺ extracelular, la estimulación con agonistas de canales de Ca²⁺, y el tratamiento con ionóforos de Ca²⁺, todos ellos elevan la [Ca²⁺]_i e inducen hipertrofia de los cardiomiocitos⁴⁵. La disminución de la velocidad de captación de Ca²⁺ por el retículo sarcoplásmico, las concentraciones aumentadas de Ca²⁺ intracelular, y defectos en el secuestro del Ca²⁺ diastólico por los cardiomiocitos ventriculares también están asociados con hipertrofia e insuficiencia cardíaca en humanos y en modelos animales⁴⁵. La evidencia inicial de la participación de Ca²⁺/calmodulina (CaM) en la hipertrofia cardíaca provino de la observación de que la sobreexpresión de CaM producía una considerable hipertrofia cardíaca en ratones transgénicos, mientras que la sobreexpresión de un dominante negativo para CaM bloqueaba la generación de hipertrofia^{45,46}. Existen varias vías transduccionales dependientes de calcio implicadas en la hipertrofia cardíaca; entre las más estudiadas se encuentran la vía de la fosfatasa calcineurina y la vía de la proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/CaM (CaMK)^{23,30,45}.

Sistema transduccional de la calcineurina. La calcineurina es una proteína serina y treonina fosfatasa que depende de Ca²⁺ y CaM para su activación. Esta enzima es esencialmente citoplasmática y está conformada por una subunidad catalítica A que une CaM y una subunidad B regulatoria que une Ca²⁺^{45,47}. Los fármacos inmunosupresores como ciclosporina A (CsA) y FK-506 inhiben a calcineurina, a través de su interacción con proteínas inmunofilinas citoplasmáticas, ciclofilinas y proteína-12 que une FK-506, respectivamente^{45,47}.

El papel de la calcineurina como transductor de las señales hipertróficas proviene de las observaciones de que la exposición de cultivos de cardiomiocitos a CsA o FK-506 bloquean el desarrollo de hipertrofia en respuesta a Ang II y fenilefrina, y que estímulos hipertróficos (Ang II y fenilefrina) activan a la calcineurina⁴⁵. Esta enzima desfosforila al factor transcripcional NFAT3 y estimula su translocación al núcleo, donde interacciona con otro factor transcripcional, GATA-4, controlando la expresión de distintos genes asociados al desarrollo de hipertrofia. La activación de NFAT3/GATA-4 es bloqueada por CsA y FK-506 (Figura 6)^{23,30,45-48}. GATA-4 es un factor transcripcional cardíaco que controla la expresión de varios genes hipertróficos. Los sitios de unión para GATA-4 son muy importantes para la activación transcripcional de genes hipertróficos como el receptor para Ang II tipo 1A y los genes para α -MHC, en res-

Figura 6. Vías transduccionales dependientes de calcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) que inducen hipertrofia cardíaca. Los inductores hipertrofos angiostensina II (Ang II), endotelina 1 (ET-1) y agonistas adrenérgicos (NE); y el factor inhibidor de leucemia (LIF) aumentan los niveles de Ca^{2+} intracelular en forma dependiente e independiente de inositol trifosfato (IP_3). El Ca^{2+} se une a CaM y activa a la calcineurina y a la proteína quinasa II dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (CaMKII). La calcineurina desfosforila a NFAT, que se transloca al núcleo y junto a GATA4 activa la transcripción de genes hipertrofos. La CaMKII fosforila a la desacetilasa de histonas 4/5 y la disocia de MEF2, liberándola para que active la transcripción de genes hipertrofos. La vía p38 MAPK activa a MEF2 en forma sinérgica con CaMKII, mediante la fosforilación del factor transcripcional.



puesta a la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión⁴⁵. NFAT3 es una de las cinco proteínas NFAT conocidas: NFAT1 (también llamado NFATp), NFAT2 (también llamado NFATc), NFAT3, NFAT4 (con altos niveles de expresión en células inmunes y músculo esquelético) y NFAT5 (cuya actividad no depende de calcineurina). NFAT3 se expresa en una amplia variedad de tejidos, incluyendo el corazón adulto⁴⁵. Los NFATs son factores transcripcionales pertenecientes a la familia Rel, donde uno de sus integrantes más conocido es el $\text{NF}\kappa\text{B}$ ⁴⁵. En células en reposo, el NFAT3 permanece secuestrado en el citoplasma debido a la fosforilación de su dominio regulatorio N-terminal. La acción de la calcineurina, la cual desfosforila el dominio regulatorio, permite que el NFAT3 entre al núcleo e interaccione con GATA-4⁴⁵. NFAT3 también puede interactuar con GATA-5 y GATA-6,

los cuales se expresan igualmente en el corazón y comparten alta homología con GATA-4⁴⁵.

La expresión de un transgen de calcineurina constitutivamente activo, bajo el control transcripcional del promotor de α -MHC, fue suficiente para inducir hipertrofia cardíaca que progresó a cardiomiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca y muerte súbita en ratones transgénicos (Figura 7A)⁴⁵. Los electrocardiogramas de estos ratones mostraron la presencia de arritmias cardíacas que pueden dar cuenta de su alta susceptibilidad a la muerte súbita⁴⁵. Ratones transgénicos que sobreexpresaban en el corazón la proteína recubridora de actina, tropomodulina, desarrollaron una cardiomiopatía dilatada severa⁴⁵. La administración sistémica de CsA y FK-506 a estos ratones transgénicos, en dosis que anteriormente habían demostrado ser inmunosupresoras y previo a la aparición de la cardiomiopatía,

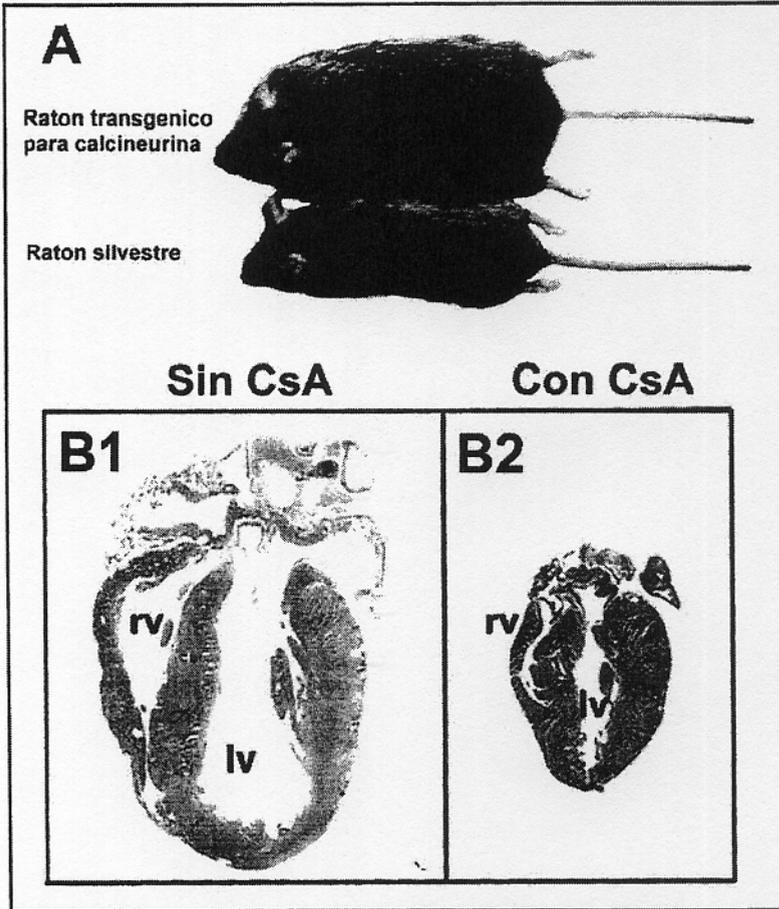


Figura 7. Hipertrofia cardíaca inducida en ratones transgénicos por sobreexpresión de genes que controlan el proceso hipertrofico. A) Superior: ratón transgénico que sobreexpresa el gen de calcineurina, controlado por un promotor de α MHC; inferior: ratón tipo silvestre normal. Ambos ratones fueron de la misma camada y poseían 8 semanas de edad al momento de la fotografía. El ratón transgénico presentó insuficiencia cardíaca, con retorno venoso y acumulación excesiva de fluidos. B1) Corazón hipertrofico de un ratón transgénico que sobreexpresa tropomodulina (TG). Este ratón transgénico desarrolla insuficiencia cardíaca dilatada 24 días después del nacimiento. B2) Corazón del ratón transgénico que sobreexpresa TG, pero tratado en forma sistémica con un inhibidor de calcineurina, la ciclosporina (CsA, 15 mg/kg dos veces al día). Ambos experimentos demuestran que la calcineurina juega un papel importante en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Figuras extraídas de la referencia 44.

previnieron completamente la dilatación cardíaca (Figura 7B)^{45,47}. La expresión de un NFAT3 mutante, que carece del extremo regulador N-terminal y, por lo tanto, es constitutivamente activo, también fue capaz de inducir hipertrofia en ratones transgénicos, mientras que la expresión de un NFAT3 tipo silvestre en el corazón no condujo a hipertrofia⁴⁵. Los resultados obtenidos con estos ratones transgénicos apoyan el modelo en que las señales hipertroficas, incluyendo la sobreexpresión de la tropomodulina, activan las señales dependientes de Ca^{2+}/CaM vía la calcineurina, que a su vez desfosforila y activa al factor transcripcional NFAT3, responsable de la expresión de los genes hipertroficos.

El posible uso terapéutico de CsA para controlar la hipertrofia cardíaca ha sido controversial. La administración de CsA para prevenir la hipertrofia cardíaca en

modelos animales ha generado resultados que varían desde la inhibición completa de la hipertrofia a poco o ningún efecto⁴⁵. La razón de estas variaciones no está clara y se las atribuye a diferencias de los procedimientos quirúrgicos para inducir sobrecarga de presión y a variabilidad en los regímenes de aplicación del fármaco⁴⁵. Tampoco han sido clarificadores los resultados del tratamiento con CsA en pacientes, ya que se ha comprobado que pacientes tratados con CsA pueden desarrollar hipertrofia, pero no se sabe si esta hipertrofia se desarrolla con la misma intensidad en presencia o en ausencia de CsA⁴⁵.

Aunque la activación de NFAT3 es suficiente para inducir hipertrofia, aún no se conoce si todos los efectos de la calcineurina son mediados por la activación de NFAT3. Este aspecto es particularmente importante para diseñar futuros fármacos para la terapia de la

hipertrofia. Otro posible candidato como blanco de la acción de la calcineurina son los factores transcripcionales MEF2 ("Myocyte Enhancer Factor-2"), responsables de la regulación de muchos genes cardíacos relacionados con la hipertrofia. Los MEF2 se identificaron inicialmente en músculo, pero luego se detectó una alta expresión en neuronas, células T y fibroblastos⁴⁹. La familia MEF2 está compuesta de 4 factores transcripcionales que se denominan MEF2 (A-D) y se unen al DNA como homo o heterodímeros, existiendo preferencia por formar algunos heterodímeros específicos. En músculo esquelético y cardíaco de rata, donde se expresan MEF2A, C y D, sólo se forman heterodímeros MEF2A-C y MEF2C-D⁵⁰. Se han informado diferentes acciones de MEF2, entre las que se cuenta la regulación de la hipertrofia cardíaca patológica⁵¹. Se ha demostrado que la calcineurina activa a MEF2, pero no se sabe si esta activación es mediada por un efecto directo o indirecto de la calcineurina sobre el MEF2⁴⁵.

Calmodulina quinasa (CaMK). Las CaMKs, o proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+}/CaM , también han sido implicadas en la transducción de las señales hipertroficas en cultivos de cardiomiocitos (Figura 6)^{45,51}. Hasta la fecha existen descritas tres CaMKs, las altamente homólogas CaMKI y CaMKIV y la multiémerica CaMKII⁵². Las CaMKs fosforilan un amplio repertorio de sustratos y son activadas por una cascada de proteínas quinasas de una manera muy similar a la cascada de las MAPKs⁵². La CaMKII es la forma más predominante en el corazón y está codificada por 4 genes (α , β , γ y δ), existiendo además otras variantes generadas por "splicing" alternativo en los transcritos de estos genes^{45,53}. Las isoformas α y β de la CaMKII se encuentran sólo en cerebro, y las isoformas γ y δ se han detectado en corazón de rata⁵⁴.

La activación de CaMKI, II y IV indujo la expresión de genes marcadores de hipertrofia en cultivo de cardiomiocito, y la inhibición de las CaMKs con KN-62, bloqueó la hipertrofia en respuesta a ET-1^{50,54-56}. La expresión de CaMKIV constitutivamente activa en corazones de ratones transgénicos resultó en respuesta hipertrofica que progresa a disfunción cardíaca⁵¹. Sin embargo, la CaMKIV parece no ser la quinasa responsable de la hipertrofia, debido a que no es la isoforma predominante en cardiomiocito y podría imitar la actividad de otra isoforma de CaMK. Se ha informado que la actividad de la CaMKII está aumentada en corazones hipertroficos de ratones transgénicos con sobreexpresión de CaM, sugiriendo

que la CaMKII es la responsable de activar la respuesta celular hipertrofica en cardiomiocitos⁵⁷.

La activación de CaMK II indujo la expresión del gen marcador de hipertrofia, el factor natriurético auricular (ANF), en cultivos de cardiomiocitos, sin embargo no activó una respuesta hipertrofica completa⁵⁸. Debido a que la vía transduccional dependiente de CaMK es sólo una de las vías inductoras de hipertrofia, una importante pregunta es cómo se integran todas estas vías transduccionales responsables del fenotipo hipertrofico. Aparentemente la vía CaMK podría modular la sensibilidad del cardiomiocito a otras vías relacionadas con hipertrofia, lo que queda de manifiesto a través de la potente sinergia en la generación de hipertrofia que existe entre las vías CaMK/calcineurina⁵¹ y CaMK/MAPK⁵⁹. La evidencia inicial de la molécula blanco río abajo para CaMK viene de una línea de ratones transgénicos llamados "MEF2 sensor mice" (ratones sensores de MEF2). Estos ratones contienen un gen reportero β -galactosidasa (β -gal) bajo el control de la secuencia de consenso de unión al factor transcripcional MEF2⁵¹. En los ratones sensores de MEF2, el gen reportero con sitio de unión MEF2- β -gal, se expresó sólo en un nivel basal, pese a la abundancia de MEF2 en los cardiomiocitos. Cuando estos ratones sensores de MEF2 se cruzaron con ratones que expresaban CaMK constitutivamente activa, la actividad del gen reportero con sitio de unión MEF2- β -gal aumentó más de 100 veces, sin cambios en la cantidad de MEF2 o en su afinidad de unión al DNA (Figura 8)⁵¹. Por lo tanto, la CaMK II sería la responsable de la fosforilación y activación de MEF2.

Recientemente Lu y cols, demostraron que el crecimiento hipertrofico de los cardiomiocitos en respuesta a suero o fenilefrina se acompaña de la activación de MEF2 dependiente de CaMK y MAPK. La CaMK estimula la actividad de MEF2 al disociar a una desacetilasa de histona tipo II (HDACs) del sitio de unión a DNA⁶⁰. Sin embargo, las MAPKs también activan a MEF2 por fosforilación (Figura 6)⁶¹. Por ello estos investigadores han concluido que MEF2 es el eslabón final del programa hipertrofico en los cardiomiocitos y que este factor transcripcional media las respuestas transcripcionales sinérgicas de los sistemas de transducción CaMK y MAPK⁶⁰.

CONCLUSIONES

El uso combinado de la manipulación mecánica/quirúrgica y genética de los animales de experimentación, y

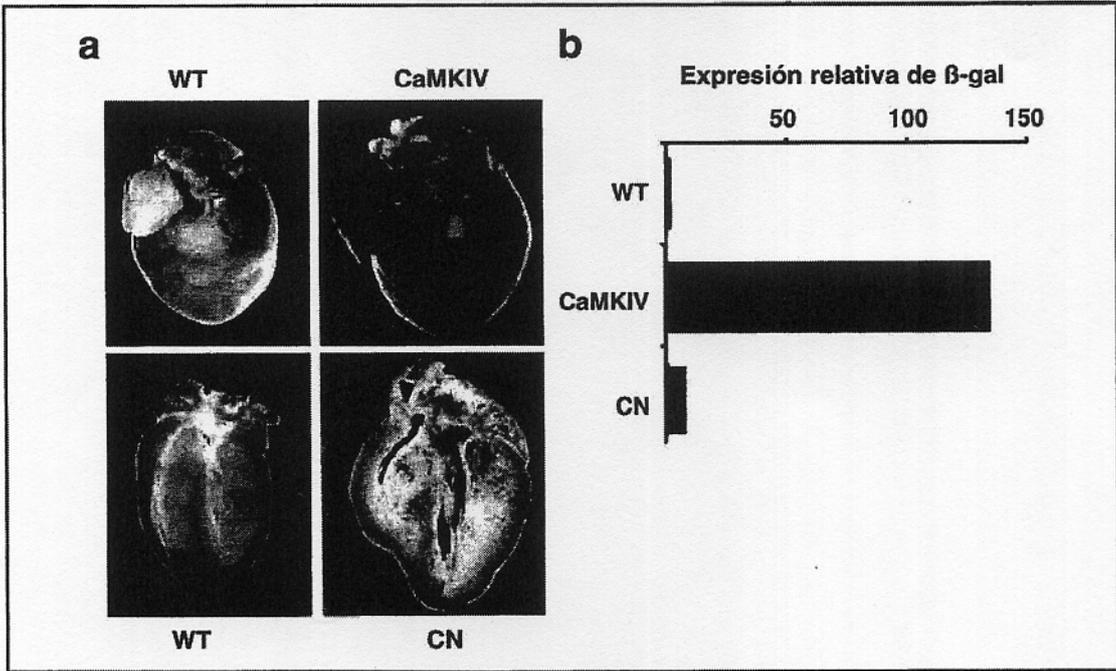


Figura 8. Activación *in vivo* de MEF2 por calmodulina quinasa (CaMK). a) Inducción de la actividad MEF2 por CaMKIV en corazón intacto. El ratón sensor de MEF2 corresponde a un ratón transgénico que expresa el gen de la β -galactosidasa (β -gal) controlado por un promotor activado por MEF2. El ratón sensor de MEF2 se cruzó con un ratón tipo silvestre (WT), con un ratón transgénico que sobreexpresa el gen de la CaMKIV controlado bajo el promotor de α MHC (CaMKIV), y con un ratón transgénico que sobreexpresa el gen de la calcineurina controlado bajo el promotor de α MHC (CN). Las crías se sacrificaron a las 8 semanas y los corazones se tiñeron para medir la expresión de β -gal. La cría con un ratón tipo silvestre originó un corazón sin actividad de β -gal, medida como pigmentación azul (figura inferior izquierda); la cría con el ratón CN originó un corazón con actividad esporádica de β -gal, observable como manchas azules distribuidas en el tejido cardíaco (figura inferior derecha); la cría con el ratón CaMKIV originó un corazón con alta actividad β -gal, observable a través de su intensa coloración azul (figura superior derecha). Los corazones de los ratones resultantes de las cruza del ratón sensor de MEF2 con CN y CaMKIV presentan hipertrofia cardíaca. b) Se midió la actividad de β -gal en extractos de los corazones descritos anteriormente. La actividad enzimática de β -gal se correlacionó con la intensidad de las tinciones de los cortes histológicos del panel a). De estos resultados se concluye que para la activación del factor transcripcional MEF2 se requiere la activación de la CaMK, y que ambos factores son parte del mecanismo de transducción de la señal hipertrofica. Las figuras se obtuvieron de la referencia 50.

con el uso de inhibidores químicos farmacológicos, ha ayudado a dilucidar gran parte de las vías transduccionales involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca compensatoria, de la hipertrofia cardíaca patológica y el remodelamiento cardíaco. A pesar del desarrollo significativo gatillado por el uso de los animales transgénicos y de adenovirus modificados genéticamente, todavía quedan muchos aspectos moleculares que necesitan dilucidarse para comprender a cabalidad los complejos mecanismos implicados

en el desarrollo de la hipertrofia e insuficiencia cardíacas. Nuestra comprensión del fenómeno hipertrofico cardíaco permite visualizar varias vías transduccionales que activan numerosos factores transcripcionales, que finalmente expresan los genes responsables del proceso hipertrofico. Sin embargo, recién se están empezando a vislumbrar los mecanismos por los cuales las distintas vías conversan entre sí. Sólo entendiendo la compleja interrelación de las múltiples vías transduccionales se podrán definir los mejores

blancos farmacológicos para diseñar fármacos útiles en la prevención o control del proceso hipertrófico. En estos momentos éste es el corazón del problema de la hipertrofia cardíaca.

REFERENCIAS

1. WEBER KT, BRILLA CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation* 1991; 83: 1849-65.
2. CHIEN KR, KNOWLTON KU, ZHU H, CHIEN S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 1991; 5: 3037-46.
3. VON HARSDFORF R, HAUCK L, MEHRHOF F, WEGENKA U, CARDOSO MC, DIETZ R. E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21CIP1 and p27KIP1 and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1999; 85: 128-36.
4. BOOZ GW, BAKER KM. Molecular signaling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 537-43.
5. OLIVETTI G, CIGOLA E, MAESTRI R, LAGASTRA C, CORRADI D, QUAINI F. Recent advances in cardiac hypertrophy. Update review. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 68-75.
6. YAMAZAKI T, KOMURO I, YAZAKI Y. Signaling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal* 1998; 10: 693-8.
7. KANNEL WB. Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol* 2000; 53: 229-35.
8. STEWART DM. The role of tension in muscle growth. Regulation of organ and tissue growth. Goss RJ (ed.) Academic Press. New York. 1972; 77-100.
9. WEBER KT, JALIL JE, JANICKI JS, PICK R. Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease. *Am J Hypertens* 1989; 2: 931-40.
10. SIMPSON DG, SHARP WW, BORG TK, PRICE RL, TERRACIO L, SAMAREL AM. Mechanical regulation of cardiac myocyte protein turnover and myofibrillar structure. *Am J Physiol* 1996; 270: C1075-C1087.
11. MELÉNDEZ J, EBENSBERGER R, GONZÁLEZ F, GÁLVEZ A, PÉREZ V, FONCEA R, OCARANZA MP, SAPAG-HAGAR M, LAVANDERO S. Mecanismos moleculares en la remodelación cardíaca patológica por estrés mecánico experimental. *Rev Chil Cardiol* 1998; 17: 102-14.
12. LEE AM, DELHAAS T, WALDMAN LK, MACKENA DA, VILLAREAL FJ, McCULLOCH AD. An equibiaxial strain system for culture cells. *Am J Physiol* 1996; 271: C1400-C1408.
13. VANDERBURGH HH, KAUFMANN S. *In vitro* model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science* 1979; 203: 265-8.
14. KOMURO I, KAIDA T, SHIBAZAKI M, KURABAYASHI M, TAKAKU F, YAZAKI Y. Stretching cardiac myocytes stimulates proto-oncogene expression. *J Biol Chem* 1990; 265: 3565-98.
15. MANN DL, KENT RL, COOPER GT. Load regulation of the properties of adult feline cardiomyocytes: growth induction by cellular deformation. *Circ Res* 1989; 64: 1079-90.
16. SADOSHIMA J, JAHN L, TAKAHASHI T, KULIK TJ, IZUMO S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells: an *in vitro* model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 1992; 267: 10551-60.
17. IZUMO S, NADAL-GINARD B, MAHDAVI V. Protoncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 339-43.
18. KOMURO I, YAZAKI Y. Intracellular signaling pathways in cardiac myocytes induced by mechanical stress. *Trends Cardiovasc Med* 1994; 4: 117-21.
19. SADOSHIMA J, IZUMO S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J* 1993; 12: 1681-92.
20. YAMAZAKI T, KOMURO I, KUDOH S, ZOU Y, SHIOGIMA I, HIROI Y, NIZUNO T, MAEMURA K, KURIHARA H, AIKAWA R, TAKANO H, YAZAKI Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1996; 271: 3221-8.
21. YAMASAKI T, KOMURO I, KUDOH S, ZOU Y, SHIOGIMA I, MIZUNO T, TAKANO H, HIROI Y, UEKI K, TOBE K, KADOWAKI T, NAGAI R, YAZAKI Y. Angiotensin II partly

AGRADECIMIENTOS

LC y MT son becarios de Doctorado del Programa CONICYT. LC cuenta con financiamiento parcial del Programa de Tesis de Postgrado, Universidad de Chile. Este trabajo contó con el financiamiento de los Proyectos FONDECYT 1980908 (SL) y 1010246 (SL).

- mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1995; 77: 258-65.
22. NERI SERNERI GG, MODESTI PA, BODDI M, CECIONI I, PANICIA R, COPPO M, GALANTI G, SIMONETTI I, VANNI S, PAPA L, BANDINELLI B, MIGLIORINI A, MODESTI A, MACCHERINI M, SANI G, TOSCANO M. Cardiac growth factors in human hypertrophy. Relations with myocardial contractility and wall stress. *Circ Res* 1999; 85: 57-67.
 23. MCKINSEY TA, OLSON EN. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Develop* 1999; 9: 267-74.
 24. DOSTAL DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Reg Pep* 2000; 91: 1-11.
 25. GÁLVEZ A, OCARANZA MP, LAVANDERO S, JALIL J. Prevención precoz de hipertrofia ventricular izquierda en la hipertensión experimental y concentraciones de angiotensina II. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 1287-94.
 26. RUSSEL FD, MOLENAAR P. The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *TIPS* 2000; 21: 353-9.
 27. REN J, SAMSON WK, SOWERS JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 2049-61.
 28. FONCEA R, GÁLVEZ A, PÉREZ V, MORALES MP, CALIXTO A, MELÉNDEZ J, GONZÁLEZ-JARA F, DÍAZ-ARAYA G, SAPAG-HAGAR M, SUGDEN PH, LE ROITH D, LAVANDERO S. Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 273: 736-44.
 29. LAVANDERO S, FONCEA R, PÉREZ V, SAPAG-HAGAR M. Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1 induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultures neonatal rat ventricular myocytes. *FEBS Lett* 1998; 422: 193-6.
 30. MÖLKENTIN JD, DORN GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 391-426.
 31. EBENSBERGER R, ACEVEDO E, MELÉNDEZ J, CORBALÁN R, ACEVEDO M, SAPAG-HAGAR M, JALIL JE, LAVANDERO S. Selective increase of cardiac IGF-1 in a rat model of ventricular hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 20-4.
 32. LATCHMAN DS. Cardiotrophin-1: a novel cytokine and its effects in the heart and other tissues. *Pharmacol Therap* 2000; 85: 29-37.
 33. WANG Y. Signal transduction in cardiac hypertrophy - dissecting compensatory versus pathological pathways using a transgenic approach. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 134-40.
 34. HUNTER JJ, CHIEN KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999; 341: 1276-83.
 35. BOGOYEVIICH MA. Signaling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 826-42.
 36. FONCEA R, ANDERSSON M, KETTERMAN A, BLAKESLEY V, SAPAG-HAGAR M, SUGDEN PH, LE ROITH D, LAVANDERO S. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 19115-24.
 37. LAVANDERO S, FONCEA R, PÉREZ V, SAPAG-HAGAR M. Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1 induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *FEBS Lett* 1998; 422: 193-6.
 38. NICOL RL, FREY N, PEARSON G, COBB M, RICHARDSON J, OLSON EN. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J* 2001; 20: 2757-67.
 39. RAMÍREZ MT, SAH VP, ZHAO XL, HUNTER JJ, CHIEN KR, BROWN JH. The MEKK-JNK pathway is stimulated by β 1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with *in vitro* and *in vivo* cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 1997; 272: 14057-61.
 40. WANG Y, SU B, SAH VP, BROWN JH, HAN J, CHIEN KR. Cardiac hypertrophy induced by MKK7, a specific activator for JNK in ventricular muscle cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 5423-6.
 41. ZECHNER D, THUEARAUF DJ, HANFORD DS, McDONOUGH PM, GLEMBOTSKI CC. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol* 1997; 139: 115-27.
 42. ADAMS JW, SAKATA Y, DAVIES MG, SAH VP, WANG Y, LIGGETT SB, CHIEN KR, BROWN JH, DOM GW. Enhanced Gq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10140-5.
 43. WANG Y, HUANG S, SAH VP, ROSS J, BROWN JH, HAN J, CHIEN KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998; 273: 2161-8.
 44. HEIDKAMP MC, BAYER AL, MARTIN JL, SAMAREL AM. Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C ϵ and δ in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2001; 89: 882-90.
 45. OLSON EN, MÖLKENTIN JD. Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition. Hope or hype? *Circ Res* 1999; 84: 623-32.
 46. GRUVER CL, DeMAYO F, GOLDSTEIN MA, MEANS AR. Targeted developmental overexpression of calmodu-

- lin induced proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocyte in transgenic mice. *Endocrinology* 1993; 133: 376-88.
47. RUSNAK F, MERTZ P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 2000; 80: 1483-520.
 48. MOKKENTIN JD, LU J-R, ANTOS CL, ROBBINS J, GRANT SR, OLSON EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; 93: 215-28.
 49. ORNATSKY OI, McDERMOTT JC. MEF2 protein expression, DNA binding specificity and complex composition, and transcriptional activity muscle and non-muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 24927-33.
 50. NAYA FJ, OLSON E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 683-8.
 51. PASSIER R, ZENG H, FREY N, NAYA FJ, NICOL RL, MCKINSEY TA, OVERBEEK P, RICHARDSON JA, GRANT SR, OLSON EN. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor *in vivo*. *J Clin Invest* 2000; 105: 1395-406.
 52. CORCORAN EE, MEANS AR. Defining Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 2975-8.
 53. SODERLING TR, CHANG B, BRICKEY D. Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 2001; 276: 3719-22.
 54. KATO T, SANO M, MIYOSHI S, SATO T, HANUKO D, ISHIDA H, KINOSHITA-NAKAZAWA H, FUKUDA K, OGAWA S. Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res* 2000; 87: 937-45.
 55. ZHU W, ZOU Y, SHIOJIMA I, KUDOH S, AIKAMA R, HAYASHI D, MIZUKAMI M, TOKO H, SHIBASAKI F, YAZAKI Y, NAGAI R, KOMURO I. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play a critical role in endothelin 1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2000; 275: 15239-45.
 56. IRONS CE, SEI CA, HIDAKA H, GLEMBOTSKI CC. Protein kinase C and calmodulin kinase are required for endothelin-stimulated atrial natriuretic factor secretion from primary atrial myocyte. *J Biol Chem* 1992; 267: 5211-6.
 57. COLOMER JM, MEANS AR. Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1125-36.
 58. RAMÍREZ MT, ZHAO XL, SCHULMAN H, BROWN JH. The nuclear δ B isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocyte. *J Biol Chem* 1997; 272: 31203-8.
 59. LU J, MCKINSEY TA, NICOL RL, OLSON EN. Signal-dependent activation of MEF2 transcription factor by dissociation from histone-deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4070-5.
 60. BLACK BL, OLSON EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF-2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 167-96.
 61. MUSARO A, MCGULLAGH KJ, NAYA FJ, OLSON EN, ROSENTHAL N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NFATc1. *Nature* 1999; 400: 581-5.