

## Caracterización de células serotoninérgicas en el tejido cardiaco fetal

Gabriel Manjarrez-Gutiérrez,\* Nicolás Camacho-Calderón,\*\* Rosalio Mercado-Camargo,\*\*\* Alfonso Boyzo-Montes de Oca,& Alberto Arvizu-Flores,\* Jorge Hernández-Rodríguez&

### Resumen

**Objetivo:** Caracterizar morfológica y bioquímicamente células productoras de serotonina durante el desarrollo del tejido cardiaco.

**Material y métodos:** Se utilizaron ratas gestantes de la cepa Wistar. A los días 10, 12, 16 y 20 de gestación se obtuvieron los fetos por cesárea, a los cuales se les disecaron los corazones, que se fijaron para los ensayos de inmunohistoquímica para triptófano-5-hidroxilasa (Tph), además se efectuó Western Blot para la enzima; se determinó la concentración de serotonina y la actividad de Tph por cromatografía de líquidos de alta resolución. Los resultados fueron analizados mediante *U* de Mann-Whitney, aceptando un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

**Resultados:** En los cortes de corazón fetal, desde el día 10 de gestación se observaron células inmunorreactivas para Tph, con metacromasia en su interior. Fibras nerviosas inmunorreactivas para la misma enzima que hacen contacto probablemente con las células serotoninérgicas. La actividad enzimática y la concentración de la serotonina aumentaron con la edad gestacional, además, se encontró la proteína enzimática por Western-Blot en el corazón fetal de 16 días de gestación.

**Conclusiones:** Se demostró la presencia de células productoras de serotonina en el miocardio fetal, cuyo fenotipo corresponde a mastocitos cardiacos, lo cual sugiere que la serotonina puede ser importante en el desarrollo del tejido cardiaco y que también participa en los mecanismos fisiopatológicos de los defectos cardiacos estructurales o en la predisposición a enfermedades cardiovasculares en el adulto.

**Palabras clave:** Corazón fetal, serotonina, triptófano-5-hidroxilasa, células serotoninérgicas.

### Summary

**Background:** We undertook this study to present biochemical and morphological characterization of serotonergic cells during fetal heart development.

**Methods:** Wistar rats (10, 12, 16 and 20 days of gestation) were used. After obtaining the fetuses by cesarean section, the hearts were removed and fixed for immunohistochemical assay of tryptophan-5-hydroxylase (Tph), in addition to Western blot for enzyme. Serotonin concentration and Tph activity were also evaluated with high-performance liquid chromatography. Results were analyzed using Mann-Whitney U test with a significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** Metachromatic cells immunoreactive for Tph were observed from day 10 of gestation. Nerve fibers were also labeled, apparently making contact with serotonergic cells. Tph activity was measurable and serotonin levels increased with gestational age. The presence of Tph protein was confirmed by Western blot on day 16.

**Conclusions:** The present results support the existence of cells located in the fetal myocardium, capable of producing serotonin, whose phenotype belongs to cardiac mast cells. Their presence in this tissue strongly suggests that serotonin may play a key role in normal and abnormal development of cardiac tissue.

**Key words:** Fetal heart, serotonin, tryptophan-5-hydroxylase, serotonergic cells.

\* Unidad de Investigación Biomolecular, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D. F.

\*\* Coordinación de Investigación del Estado de Querétaro, Instituto Mexicano del Seguro Social, Querétaro, México.

\*\*\* Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

& Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav, Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.

#### Solicitud de sobretiros:

Gabriel Manjarrez-Gutiérrez.

Laboratorio de Patología Molecular, Unidad de Investigación Biomolecular, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI,

Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, 06725 México, D. F.

Tel.: (55) 5627 6900, extensión 22156. Fax: (55) 5578 0240.

E-mail: willisga@prodigy.net.mx; gmanjarrez@gmail.com

Recibido para publicación: 22-04-2009

Aceptado para publicación: 18-08-2009

## Introducción

La enfermedad cardíaca congénita es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil.<sup>1</sup> A menudo se inicia por la interacción de factores ambientales y de susceptibilidad genética.<sup>2,3</sup> La identificación de factores que regulan la proliferación y diferenciación miocárdica es de gran interés para el mejor conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades cardíacas congénitas.<sup>4-6</sup> Algunas líneas de evidencia sugieren que 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) regula las funciones cardiovasculares durante la embriogénesis y la edad adulta.<sup>7-10</sup> Se ha identificado a la serotonina, a sus receptores y a la proteína transportadora de serotonina (SERT) en el neuroepitelio y miocardio de roedores de ocho días de gestación.<sup>7,11-18</sup> Además, en embriones de ratón cultivados, en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de ritanserina (antagonista serotoninérgico), se han observado diversas malformaciones congénitas en la región cefálica, tubo neural y corazón.<sup>8,12,13,19</sup>

Las malformaciones cardíacas más frecuentes son ausencia de la trabeculación miocárdica, disminución del grosor de la pared ventricular, alteraciones en la organización de las sarcómeras, dilatación epicárdica, disminución de la proliferación de los miocardiocitos, del mesénquima cardíaco y del endotelio vascular.<sup>8,9</sup> Estas malformaciones también han sido identificadas en embriones cultivados en medios enriquecidos con inhibidores de la recaptura de la serotonina.<sup>8,12,15</sup> Del mismo modo, también se han observado en animales transgénicos carentes del gen que codifica al receptor 5-HT<sub>2B</sub> que funcionalmente se acopla a proteínas Gq y a la vía de señalización de RAS y activa a las proteínas cinasas C y MAPcinasa.<sup>8,12,15</sup> Estos hallazgos sugieren que la serotonina participa activamente en la proliferación y diferenciación de los miocardiocitos durante el desarrollo embrionario del corazón.<sup>7,11-18</sup>

Sin embargo, a pesar de haber demostrado la presencia de la serotonina y de sus receptores durante la cardiogénesis, hasta el momento se desconoce en qué sitio y en qué etapa del desarrollo se inicia su producción. Se ha propuesto que en los estadios tempranos de la gestación la serotonina procede de la circulación materna o que se origina en células de la cresta neural que migran a los tejidos periféricos, especialmente al tubo digestivo, a las glándulas suprarrenales, a los riñones y probablemente a los pulmones. La serotonina generada en estas células sería liberada al tejido intersticial y capturada, almacenada y transportada por las plaquetas a los tejidos periféricos. Después, las plaquetas la liberarían por un mecanismo de transporte activo e inmediatamente sería recapturada por las células endoteliales de los vasos sanguíneos y las neuronas ubicadas en el tejido cardíaco.<sup>8,9,16</sup> Proponemos que durante el desarrollo embrionario del corazón aparecen células productoras de serotonina en las estructuras cardíacas y que la serotonina sintetizada por ellas participa en la proliferación y diferenciación de los miocardiocitos. Ésta es la hipótesis que planteamos y que se evalúa en este trabajo, caracterizando inmunocitoquímica y bioquímicamente células productoras de serotonina durante el desarrollo fetal del tejido cardíaco.

## Material y métodos

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, machos y hembras nuliparas, proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav, Instituto Politécnico Nacional. Fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas a  $22 \pm 2$  °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas (7:00 a 19:00 horas y de 19:00 a 7:00 horas, respectivamente), humedad relativa de 50 a 60 %. Las ratas fueron alimentadas con una dieta balanceada estándar y agua *ad libitum*. La dieta Lab Diet 5P14 para roedores (PMI Feeds Inc., Richmond, IN, U.S.A.) está compuesta por 23 % de proteínas, 49 % de carbohidratos, 4.5 % de grasa, 6 % de fibra y 8 % de cenizas, levadura de caracoria, vitaminas y minerales (lisina, tiamina, alfa-tocoferol, calcio, sulfato ferroso, manganeso, entre otros micronutrientes), y proporciona una densidad calórica de 4.05 kcal/g de alimento.

Al término del periodo de adaptación, las ratas fueron apareadas, dos hembras ( $2500 \pm 10$  g de peso corporal) por cada macho (250 g de peso corporal). Después del periodo de apareamiento, el tapón vaginal y la longitud cefalosacra permitieron determinar la edad gestacional, con una aproximación de seis horas. Durante la gestación, las ratas se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales y nutrimentales. A los 10, 12, 16 y 20 días de gestación se extrajeron los fetos mediante operación cesárea. Inmediatamente se disecó el corazón para los ensayos bioquímicos e inmunocitoquímicos. El manejo de los animales de experimentación se efectuó en la UPEAL del Cinvestav, bajo las normas sanitarias y de ética del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, con apego a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de agosto de 2001.

### Ensayos bioquímicos

#### Inmunocitoquímica para triptófano-5-hidroxilasa (Tph)

Los corazones de los fetos de ratas obtenidos en los días 10, 12, 16 y 20 de edad fetal fueron fijados con formol a 10 % diluido en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.4. Después, los corazones se deshidrataron y colocaron en parafina para obtener cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor; a continuación, los cortes fueron fijados en portaobjetos cubiertos de poli-L-lisina a 10 %. Con los cortes desparafinados se procedió al desenmascaramiento antigénico por medio de una solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 6.0 (DECLERE, Cell Marque), en un horno de microondas durante tres ciclos de dos minutos. En seguida se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 5 % durante 15 minutos.

Una vez lavados, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario monoclonal específico para Tph a una dilución de 1:500 (Monoclonal Anti-tryptophan Hydroxylase Clone WH-3,

Sigma. Saint Louis, Missouri, USA) en una solución de PBS 0.1 M, pH 7.4, Triton X-100 a 0.3 y 3 % de suero de caballo durante 18 horas a 30 °C. Al día siguiente, los cortes se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS y Triton X 100 (anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de cabra) durante 30 minutos. Los cortes fueron incubados con el complejo avidina-biotina durante 15 minutos a temperatura ambiente; se lavaron y la inmunorreactividad fue revelada con un kit comercial de 3,3-diaminobencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo con el protocolo de Vector Laboratories.<sup>20</sup> Las fotomicrografías fueron tomadas con una cámara digital (Coolpix 995, Nikon).

#### Actividad de la Tph por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La actividad de la Tph fue evaluada por la determinación de 5-hidroxitriptófano formado, mediante HPLC (Water S. A. de C.V.) con un detector fluorométrico (Waters model 474 Scanning Fluorescence Detector).<sup>21,22</sup> Este método consiste en incubar 300 µg de la proteína enzimática en presencia de una solución amortiguadora de tris-HCl 50 mM, pH 7.40, EGTA 1.0 mM, 15 µg de catalasa, 200 µM 2-amino-4-hidroxi-1-metil tetrahydrobiopterina. La reacción se incubó a 37 °C durante 10 minutos y se detuvo por la adición de HClO<sub>4</sub> 6 M más 5 mM de EDTA y 0.1 % de ácido ascórbico; 20 µL del medio de la reacción fueron inyectados al HPLC. Se usó una columna de simetría C<sub>18</sub> (5 µm de tamaño de partícula) 3.9 × 150 mm (Waters S. A. de C.V.). La fase móvil se preparó con acetato de sodio 40 mM, pH 3.30 y acetonitrilo, en una relación de 95:5, respectivamente, y se corrió a un mililitro por minuto. Las longitudes de excitación y emisión que se utilizaron para la detección del 5-hidroxitriptófano formado fueron 280 y 340 nm, respectivamente. Los tiempos de retención para 5-hidroxitriptófano fueron 2.3 minutos y 5.5 minutos para el L-triptófano.

#### Determinación de serotonina por HPLC

La 5-HT en los corazones fue determinada por HPLC de acuerdo con el método de Peat y Gibb.<sup>23</sup> Los corazones fueron desproteinizados con una solución de HClO<sub>4</sub> 0.1 N más metabisulfito de sodio 4 mM en una relación 1:3 peso/volumen; se homogeneizaron los corazones con un émbolo de teflón Glas Col Instruments, a una velocidad de 1000 rpm durante 30 segundos. A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C; después, el sobrenadante fue separado y filtrado en una membrana de nailon de 0.45 µm de tamaño de poro. Posteriormente, 20 µL del filtrado fueron inyectados al HPLC, utilizando una columna de simetría C<sub>18</sub> de fase reversa de 5 µm de tamaño de partícula, 3.9 × 150 mm de longitud. Se usó un sistema binario de una solución de fosfato de potasio monobásico 2 mM, pH 3.50 más ácido heptanosulfónico 1 g/l de solución y una mezcla de metanol/agua en una relación de 3:2 v/v, a razón de

un mililitro por minuto. La determinación de la 5-HT se realizó mediante un detector fluorométrico (Waters Modelo 474), con una excitación de 290 nm y 330 nm de emisión. La respuesta fue obtenida mediante un sistema análogo Milenium 32 y la concentración de 5-HT fue considerada como la altura máxima de la señal, de acuerdo con una curva estándar de cantidades conocidas de 5-HT y expresada en ng/g de tejido.

#### Inmunotransferencia de Tph por Western Blot

Los corazones fetales fueron homogeneizados durante 30 segundos a 4 °C en una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. Después las muestras fueron centrifugadas a 29 000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry y colaboradores.<sup>24</sup> Se colocaron 30 µg de proteína en cada uno de los canales de un gel de SDS-poliacrilamida a 10 % de un milímetro de grosor. La corrida electroforética se efectuó a 100 V durante una hora a 5 °C. Para electrotransferencia de las proteínas, el gel se montó en membranas de nitrocelulosa (0.45 µm); la corrida se efectuó a 25 V, toda la noche.<sup>25</sup>

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fueron colocadas en una solución de bloqueo a base de leche semidescremada a 1 % diluida en PBS 0.1 M, pH 7.4 más Tween-20, 0.1 M, durante 30 minutos. A continuación las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal específico para Tph a una dilución de 1:500 (Monoclonal Anti-tryptophan hydroxylase Clone WH-3. Sigma. Saint Louis, Missouri, USA) en la misma solución de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario antiirratón (Chemicon) a una dilución de 1:5000 en la misma solución de bloqueo. Enseguida, las membranas fueron incubadas con el sistema ABC Elite de Vector Labs durante una hora. Después de lavar las membranas con PBS, se revelaron por quimioluminiscencia con el sistema ECL de Amersham.

#### Determinación de proteínas por espectrofotometría

Las proteínas de los corazones fetales fueron determinadas por el método de Lowry y colaboradores.<sup>24</sup> El homogeneizado de los corazones se diluyó 40 veces con agua bidestilada; de esta dilución se tomó 0.1 ml. La reacción se inició al agregar 0.5 ml del reactivo A, el cual contenía 0.5 ml de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 % y 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio a 2 % en 50 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2 %, diluido en NaOH a 0.1 N. La mezcla se agitó vigorosamente y dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se adicionó 0.05 ml de reactivo B, el cual contenía reactivo de Folin en una dilución 1:1 con agua bidestilada. Las muestras se agitaron y 30 minutos después se les midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman a 700 nm de longitud de onda. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de concentraciones conocidas de albúmina. La concentración de proteínas del corazón se expresó en mg/g de tejido.

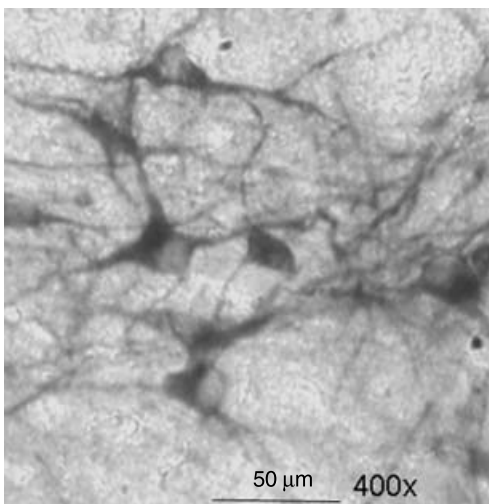
### Análisis estadístico

Para comparar los resultados de la actividad específica de Tph y la concentración de serotonina en el tejido cardíaco a las edades de 16 y 20 días de vida fetal, primero se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar de cada una. Después se comparó la actividad de Tph expresada en fmol de 5-HTP/mg de proteína/hora a los 16 días contra la de los 20 días de edad gestacional. Y de la misma forma se analizó la concentración de serotonina en el tejido cardíaco, a través de U de Mann-Whitney, ya que los valores de la actividad de la enzima y la concentración de serotonina no mostraron una distribución normal, aceptando un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

## Resultados

Para confirmar la especificidad del anticuerpo contra Tph, como controles se utilizaron cortes de tallo cerebral de rata adulta, donde se localizan las neuronas serotoninérgicas. En la figura 1 se muestran estas neuronas y las fibras nerviosas inmunorreactivas para la enzima, teñidas con 3,3-diaminobencidina.

En los cortes de corazón fetal se observaron células inmunorreactivas para Tph, dichas células se ubican entre el endocardio y el miocardio con gránulos intracitoplasmáticos de la enzima a partir del día 10 de gestación (figuras 2A y 2B). En la figura 2C se muestran las células inmunorreactivas para Tph a las edades de 16 y 20 días de gestación, que presentan morfología fusiforme y se sitúan alrededor de los miocardiocitos. Estas células inmunorreactivas para Tph se observan con mayor definición en el endocardio a los 20 días de edad gestacional (figura 2D).

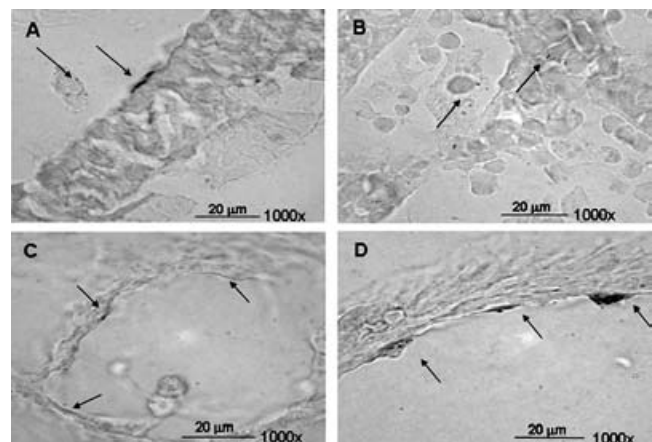


**Figura 1.** Neuronas serotoninérgicas inmunorreactivas para Tph en los núcleos del rafe del tallo cerebral de rata adulta. Teñidas con 3,3-diaminobencidina.

A los 20 días de gestación también se observaron células inmunorreactivas para Tph (figura 3A), células ovoides y algunas con mayor cantidad de gránulos intracitoplasmáticos, ubicadas en hileras que siguen los trayectos de los miocardiocitos y vasos sanguíneos. En la figura 3B vemos células que se localizan alrededor de los vasos sanguíneos y en el intersticio cardíaco. Es interesante observar que al hacer contratincciones con azul de toluidina, las células inmunorreactivas para Tph presentan metacromasia con múltiples gránulos intracitoplasmáticos (figura 3C). Nótese que además de las células inmunorreactivas existen fibras nerviosas inmunorreactivas para Tph que siguen los trayectos de los vasos sanguíneos y de los miocardiocitos, incluso dan la impresión de hacer contacto entre células y fibras nerviosas inmunorreactivas para Tph.

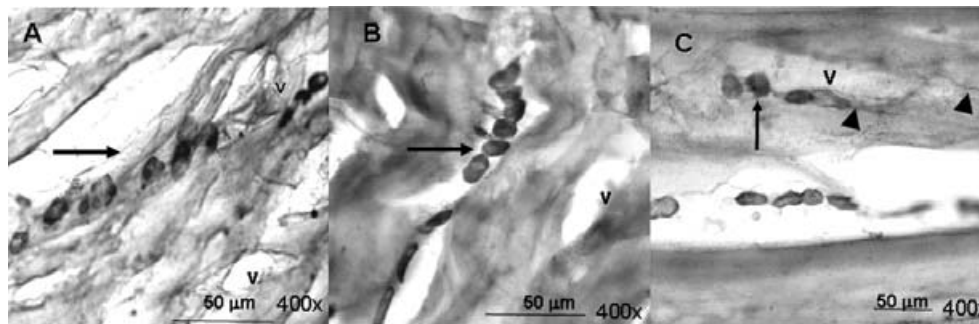
La actividad específica de Tph en el corazón fetal de 16 días de edad gestacional se muestra en el cromatograma representativo de la figura 4A (línea azul). Los estándares L-triptófano (L-Trp) y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) se presentan con línea negra. La actividad de la enzima expresada en fmol de 5-HTP/mg de proteína/hora mostró un patrón de desarrollo ascendente de  $14 \pm 2.8$  fmol a los 16 días, a  $62 \pm 7.6$  fmol a los 20 días de vida fetal ( $p < 0.001$ ) (cuadro I). Con la finalidad de evaluar la expresión de Tph en el corazón fetal se efectuaron experimentos de Western blot, empleando tejido del tallo cerebral de rata adulta como control. A diferencia del tallo cerebral donde se demostró una sola banda de Tph de 56 kDa (figura 4Ba), en el corazón fetal de 16 días de edad se observaron dos bandas inmunorreactivas a la enzima de 53 y 56 kDa (figura 4Bb).

La serotonina en el corazón fetal de 16 días de edad gestacional se muestra en el cromatograma representativo de la figura 5 (línea roja). Los estándares de L-Trp, 5-HT y ácido 5-hidroxiin-

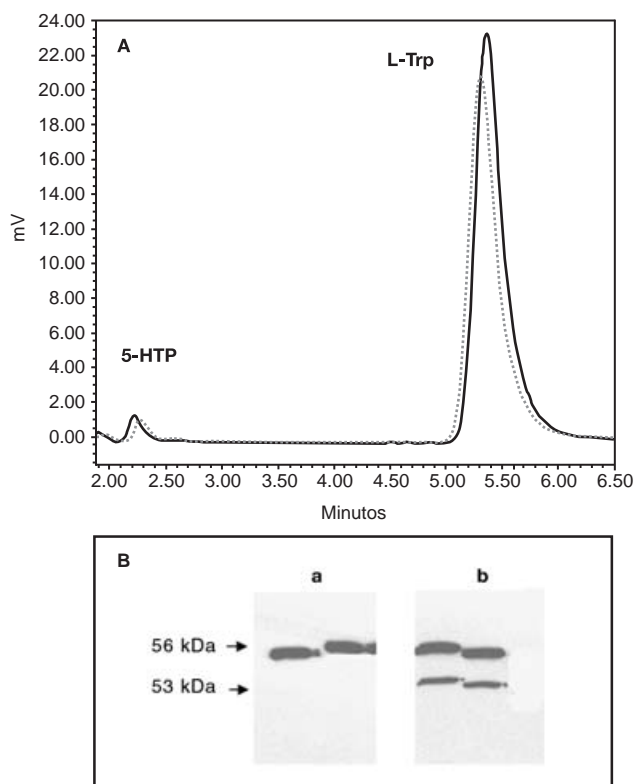


**Figura 2.** Células inmunorreactivas para Tph en el corazón fetal de rata. Se trata de cortes longitudinales del corazón: A) 10 días. B) 12 días. C) 16 días. D) 20 días de gestación. Las flechas muestran células inmunorreactivas para la enzima que se localizan en el miocardio y endocardio fetal.





**Figura 3.** Células inmunorreactivas para Tph en el corazón de rata a los 20 días de gestación. A) Células inmunorreactivas para Tph teñidas con 3,3-diaminobencidina. B y C) Células inmunorreactivas para la misma enzima teñidas con 3,3-diaminobencidina y azul de toluidina. Nótese que las fibras inmunorreactivas para Tph hacen contacto con las células inmunorreactivas (cabeza de flecha) y siguen el mismo trayecto de los vasos sanguíneos (v).



**Figura 4.** Actividad específica de Tph y expresión de la proteína enzimática por Western blot en el corazón fetal de rata. A) Cromatograma representativo de un estándar de 5-HTP y de L-Trp (línea negra) y la actividad específica de Tph en el corazón fetal a los 16 días de gestación (línea azul). B) Expresión de Tph identificada por electrotransferencia e inmunodetección por Western blot con anticuerpos específicos para la enzima. a) Tallo cerebral de rata adulta donde se distingue una sola banda de 56 kDa de peso molecular. b) Corazón de rata a los 16 días de gestación; se observan dos bandas, una de 53 kDa y otra de 56 kDa de peso molecular.

dolacético se presentan en línea negra. Obsérvese que también existió aumento significativo de la cantidad de serotonina en el corazón fetal de 16 a 20 días de edad gestacional ( $p < 0.001$ ) (cuadro I).

## Discusión

La hipótesis del presente estudio fue demostrar que durante el desarrollo del tejido cardiaco existen células serotoninérgicas. En efecto, los hallazgos morfológicos mostrados confirman que durante la cardiogénesis existen células inmunorreactivas para la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la triptófano-5-hidroxilasa, a partir del día 10 de gestación. Estas células inmunorreactivas para Tph se encuentran distribuidas en todas las capas del corazón fetal, sobre todo alrededor de los vasos sanguíneos. Por su localización y la presencia de múltiples gránulos intracitoplasmáticos en el periodo de 16 y 20 días de gestación, se planteó la posibilidad de que pudiera tratarse de células cebadas. Para confirmarlo, los cortes del corazón fetal se contratiñeron con azul de toluidina, donde se observó que las células inmunorreactivas para Tph mostraron metacromasia, al igual que

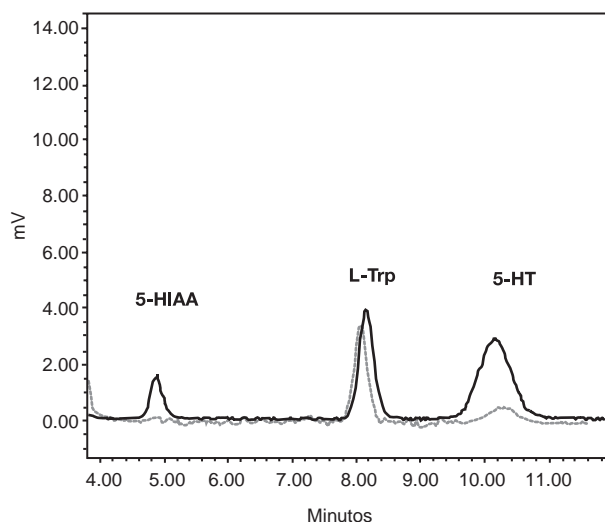
**Cuadro I.** Actividad serotoninérgica en el corazón fetal de rata

Edad fetal (días)	Tph	5-HT
16	14 ± 2.8	50 ± 10*
20	62 ± 7.6	110 ± 15*

Tph = actividad de triptófano-5-hidroxilasa en nmol de 5-HTP/mg proteína/hora  
 5-HT = concentración de serotonina en ng/mg de tejido. Cada punto representa el valor promedio ± desviación estándar de cuatro experimentos efectuados por duplicado. La diferencia estadística entre las edades de 16 y 20 días de vida fetal en cada uno de los parámetros bioquímicos se obtuvo con U de Mann-Whitney.\* $p < 0.001$ .

en los mastocitos o células cebadas adultas.<sup>26-28</sup> Estos hallazgos apoyan la existencia de mastocitos que durante la cardiogénesis producen serotonina y que probablemente participan activamente en la diferenciación de los miocardiocitos, aspecto que también se está evaluando en el laboratorio. Por otro lado, no se sabe si en etapas tempranas de la cardiogénesis se expresa primero el fenotipo serotoninérgico seguido por la diferenciación hacia mastocito, o si ambas características fenotípicas aparecen simultáneamente, lo que tendría que ser indagado.

Los mastocitos son células que captan, sintetizan, almacenan y liberan una variedad de neuropéptidos y neurotransmisores, por ejemplo, neurotensina, somatostatina, sustancia P, serotonina y acetilcolina.<sup>28-30</sup> Además, se ha observado que los mastocitos tienen una relación estrecha con las fibras nerviosas periféricas; estas interacciones se han demostrado en el diafragma, cerebro, vejiga, íleon, mesenterio y piel.<sup>31</sup> Es importante señalar que en este trabajo se apreciaron dichas interacciones entre fibras nerviosas y mastocitos inmunorreactivos para Tph. Este hallazgo sugiere que las interacciones entre mastocitos productores de serotonina y fibras nerviosas podrían estar participando activamente en la proliferación y diferenciación de los miocardiocitos. En efecto, se ha observado en los animales transgénicos carentes del receptor 5-HT<sub>2B</sub> una mayor letalidad embrionaria y neonatal, debido a que estos animales tienen múltiples malformaciones congénitas del corazón. Los animales que logran sobrevivir tienen paredes ventriculares delgadas debido al daño en la proliferación de los miocardiocitos y a la desorganización de la sarcómera en la zona compacta,



**Figura 5.** Concentración de serotonina en el corazón fetal de rata. Se observa en el cromatograma una corrida representativa de un estándar de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), de L-L-Trp y de 5-HT (4 ng/μL) (línea negra), comparado con la concentración de 5-HT (línea roja) obtenida en corazón fetal de rata a los 16 días de gestación, que muestra el mismo tiempo de retención que el estándar de 5-HT.

así como defectos en la trabeculación miocárdica.<sup>8,12,15</sup> En conjunto, estos resultados sugieren que 5-HT participa en la regulación de la diferenciación y proliferación de los miocardiocitos a través de la activación del receptor 5-HT<sub>2B</sub>.<sup>8,12,15</sup> Además, diversos estudios farmacológicos han relacionado los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, y 5-HT<sub>7</sub> con la función cardiovascular;<sup>32,33</sup> estos receptores se localizan en las terminales nerviosas o bien sobre el miocardio y su papel está en estudio.<sup>18,32,33</sup>

Otros hallazgos no menos importantes del presente trabajo son la confirmación de la actividad de Tph, así como la presencia de serotonina en el tejido cardíaco fetal. También se identificaron en el mismo tejido, dos bandas de la proteína de la enzima (53 y 56 kDa) mediante Western blot, a diferencia del tallo cerebral de la rata adulta (control), donde solo existió una banda de 56 kDa, similar a lo ya demostrado por otros autores.<sup>34</sup> Lo anterior sugiere que en el corazón fetal se expresan dos isoformas de Tph, que podrían o no corresponder a las dos isoformas descritas en el tejido adulto.

## Agradecimientos

Este trabajo se efectuó gracias a los apoyos financieros otorgados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (2005/1/L/005) y el Cinvestav.

## Referencias

1. Goldmuntz E. The epidemiology and genetics of congenital heart disease. *Clin Perinatol* 2001;28:1-10.
2. Lewin MB. The genetic basis of congenital heart disease. *Pediatric Ann* 2000;29:469-480.
3. Gelb BD. Molecular genetics of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1997;12:321-328.
4. Kirby ML. Cardiac morphogenesis: recent research advances. *Pediatr Res* 1987;21:219-224.
5. Dianne AL, Penny KA, Brian SC, Jeffrey H, Steven GH. Regulation of rat cardiac myocyte growth by a neuronal factor secreted by PC 12 cells. *Pediatr Res* 1997;41:832-841.
6. Banach K, Halbach MD, Hu P, Hescheler J, Egert U. Development of electrical activity in cardiac myocyte aggregates derived from mouse embryonic stem cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2114-H2123.
7. Ikeda K, Tojo K, Otsubo Ch, Udagawa T, Kumazawa K, Ishikawa M, et al. 5-hydroxytryptamine synthesis in HL-1 cells and neonatal rat cardiocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:522-525.
8. Canan G, Nebigil, Maroteaux L. A novel role for serotonin in heart. *TCM* 2001;11:329-335.
9. Frishman WH, Grewall P. Serotonin and the heart. *Ann Med* 2000;32:195-209.
10. Yavarone MS, Shuey DL, Tamir H, Sadler TW. Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 1993;47:573-584.
11. Lauder MJ, Wilkie MB, Wu Ch, Singh S. Expression of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2c</sub> receptors in the mouse embryo. *Int J Devl Neuroscience* 2000;18:653-662.
12. Nebigil CG, Doo-Sup Ch, Dierich A, Hicckel P, Le Meur M, Messaddeq N, et al. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9508-9513.
13. Nebigil CG, Hicckel P, Messaddeq N, Vonesch JL, Douchet MP, Monassier L, et al. Ablation of serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* 2001;103:2973-2985.

14. Nebigil CG, Etienne N, Schaerlinger B, Hickel P, Launay JM, Maroteaux L. Developmentally regulated serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Int J Devl Neurosci* 2001;19:365-372.
15. Choi DS, Birraux G, Launay JM, Maroteaux L. The human serotonin serotonin<sub>2B</sub> receptor: pharmacological link between serotonin<sub>2</sub> and serotonin<sub>1D</sub> receptors. *FEBS* 1994;352:393-399.
16. Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. 5-HT<sub>2B</sub> receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* 1997;124:1745-1755.
17. Sari Y, Zhou FC. Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. *Int J Devl Neuroscience* 2003;21:417-424.
18. Côte F, Tévenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, et al. Disruption of the nonneuronal Tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *PNS* 2003;100:13525-13530.
19. Hansson SR, Mezey E, Hoffman BJ. Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest-derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo. *Neuroscience* 1999;89:243-265.
20. Naish JS, Boenisch AJ, Farmilio U, Stead RH. *Handbook of Immunochemical Staining Methods*. Carpinteria, CA: Dako Corp.; 1989. pp 1-41.
21. Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. *J Neurochem* 1995;65:882-887.
22. Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. *J Neurochem* 1996;66:817-823.
23. Peat MA, Gibb JW. High-performance liquid chromatographic determination of indoleamines, dopamine and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. *Anal Biochem* 1983;128:275-280.
24. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-273.
25. Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Harlow; 1988. pp. 471-509.
26. Galli JS. Mast cell and basophils. *Curr Opin Hematol* 2000;7:32-39.
27. Payne V, Kam PCA. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 2004;59:695-703.
28. Leon A, Buriani A, Dal Toso A, Fabris M, Romanello S, Aloe L, et al. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3739-3743.
29. Palladini G, Tozzi R, Perlini S. Cardiac mast cells in the transition to heart failure: innocent bystanders or key actors? *J Hypertens* 2003;21:1823-1825.
30. Sperr WR, Bankl HC, Mundigler G, Grossschmidt AH, Simon P, Laufer P, et al. The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization. *Blood* 1994;84:3876-3884.
31. Bauer M, Razin E. Mast cells-nerve interactions. *News Physiol Sci* 2000;15:213-218.
32. Saxena PR, Villalon CM. Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;15:S17-S34.
33. Ramage AG. Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain Res Bull* 2001;56:425-439.
34. McKinney J, Knappsokg PM, Haavik J. Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J Neurochem* 2005;92:311-320.