



Rev Mex Med Forense, 2020, 5(2): 1-9

ISSN: 2448-8011

Expresión del mRNA del gen HIF1- α en la corteza frontal de un modelo murino expuesto a CO₂ en concentraciones letales

Artículo Original

Expression of mRNA of the HIF1- α gene in the frontal cortex of a murine model exposed to CO₂ in lethal concentrations

Abigail Delgado-Carvajal¹, Carolina Barrientos-Salcedo²

Recibido: 8 mayo 2018, Aceptado: 18 Agosto 2018, Publicado: 15 enero 2019

¹ Química Clínica, Máster en Medicina Forense

² Bióloga, Máster en Ciencias, Doctora en Biología Molecular y Ciencias Biológicas y de la Salud, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana.

Corresponding author: Abigail Delgado-Cavajal, revmforense@uv.mx

RESUMEN

El Monóxido de Carbono (CO), es un gas incoloro, inoloro e insípido que es producido por la combustión incompleta de hidrocarburos, el cual es tóxico debido a su alta afinidad por la hemoglobina produciendo un estado de hipoxia puede llevar a la muerte. En la mayoría de los casos de muerte por intoxicación por CO no existen lesiones patognomónicas; sin embargo, en algunos casos los hallazgos en la autopsia son indicativos del agente causal, y se realiza la detección de carboxihemoglobina por laboratorio, prueba de resultados no siempre confiables. En el presente trabajo se analizó la expresión del mRNA del gen HIF1- α , mediante RT-PCR, como marcador para identificar la intoxicación de CO a partir de tejido cerebral de ratas expuestas a CO en concentraciones 40%CO₂/60%O₂ y 60%CO₂/40%O₂. El diagnóstico de la muerte por intoxicación por monóxido de carbono solo se basa en las características clínicas que presenta el individuo; por otra parte no existe un protocolo toxicológico establecido en el país para identificar la intoxicación de CO. Los resultados no indicaron diferencias en la expresión de HIF1- α entre los animales expuestos y el grupo control; puede deberse a la sensibilidad de la prueba, por lo que se propone que se emplee RT-PCR en tiempo real.

Palabras Clave: Intoxicación; monóxido de carbono; HIF1- α ; Carboxihemoglobina; RT-PCR

SUMMARY

Carbon Monoxide (CO) is a colorless, odorless and tasteless gas produced by the incomplete combustion of hydrocarbons; it is toxic due to its high affinity for hemoglobin producing a state of hypoxia leading to death. In most cases of death due to CO poisoning, there are no pathognomonic lesions; however, in some cases the findings at autopsy are indicative of the causative agent; confirmation requires detection of carboxyhemoglobin, test of contradictory results. In the present work, the expression of the mRNA of the HIF1- α gene was analyzed by RT-PCR, as a marker to identify CO intoxication from brain tissue of rats exposed to CO at concentrations of 40% CO₂ / 60% O₂ and 60 % CO₂ / 40% O₂. The diagnosis of death by carbon monoxide poisoning is only based on the clinical characteristics presented by the individual; on the other hand, there is no toxicological protocol established in the country to identify CO intoxication. Our results indicated no difference in the expression of HIF1- α between the exposed animals and the control group; it may be due to the sensitivity of the test, so it is proposed that RT-PCR is used in real time.

Palabras Clave: Intoxication; carbon monoxide; HIF1- α ; Carboxyhemoglobin; RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Algunas personas que desarrollan sus actividades “a cielo abierto” están expuestos a los cambios de temperaturas, vientos y contaminación ambiental ocasionada por la exposición al monóxido de carbono (CO)¹. El Monóxido de Carbono (CO), es un gas incoloro, inoloro e insípido que fisiológicamente es producido por el organismo en cantidades ínfimas². También producido por la combustión incompleta de hidrocarburos, la concentración de monóxido de carbono en la atmósfera es usualmente baja, los niveles son más altos en áreas urbanas más que en las áreas rurales³. Cuando se produce la inhalación de grandes cantidades se torna tóxico para el organismo debido a que al poseer tan baja densidad su inhalación se facilita y de esta manera los vapores de CO llegan a los alveolos pulmonares, posteriormente al torrente sanguíneo con la reducción de la capacidad que posee la sangre de llevar oxígeno a todo el organismo⁴.

La polución atmosférica puede ocurrir a través de la emisión de contaminantes derivados de procesos industriales variados, de las quemas de plantaciones y de la combustión de los vehículos movidos a motor produciendo CO⁵⁻⁶. Este gas es uno de los más expresivos en toxicidad y actúa directamente en el sistema respiratorio⁷.

El cerebro requiere de un alto suministro de oxígeno y glucosa para llevar a cabo sus funciones ya que para obtener su energía lo hace casi exclusivamente por fosforilación oxidativa mitocondrial⁸. En procesos de

hipoxia en humanos debido al insuficiente aporte de energía al cerebro por la glucolisis anaerobia a los pocos minutos se puede producir una pérdida de conciencia y muerte neuronal debido a la degradación de ácidos grasos insaturados, provocando una desmielinización del sistema nervioso central⁹.

La intoxicación aguda por monóxido de carbono (CO) es una emergencia médica común y una causa frecuente de muerte intencional o accidental, pero, reconocerla puede ser difícil, pudiendo pasar de ser percibida¹⁰. Ambas exposiciones a CO aguda y crónica puede producir características clínicas inespecíficas que se pueden confundir con otras patologías¹¹. Puede causar lesiones en distintos órganos como corazón, y sistema nervioso (lesiones agudas o crónicas)¹². El cerebro y el corazón pueden verse gravemente afectados después de una exposición a niveles superiores al 20% de COHb¹³. Predominan lesiones en corteza cerebral, sustancia blanca y ganglios basales. Pueden exacerbar patología cardiaca incluso en personas con coronarias normales, debiendo someterse a los pacientes a un estudio cardiológico. Generalmente la intoxicación se produce a causa de la utilización de cocinas u hornos que funcionan en base a carbón, leña, gas y otros, siempre que su utilización se realice en ambientes cerrados o con escasa ventilación¹⁴. Debido a que este escenario se produce principalmente en espacios domésticos, la población más propensa a sufrir daño por este tóxico son las mujeres en etapa de gestación, los niños pequeños y los adultos mayores¹⁵.

El organismo responde a la hipoxia con una serie de adaptaciones que pueden manifestarse en cambios hormonales, mediadores, actividad enzimática, la expresión de una serie de genes en los que destacan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y la eritropoyetina (EPO); algunos de estos genes codifican para proteínas que participan en angiogénesis, eritropoyesis, proliferación celular, remodelación vascular y apoptosis, lo que permite a la célula adaptarse a las condiciones de hipoxia¹⁶.

El papel principal para la inducción de estos genes es llevado a cabo por el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), un heterodímero compuesto por dos sub-unidades (HIF-1 α y HIF-1 β) con pesos moleculares aparentes de 120-130 kD y 91-94 kD, respectivamente, localizado en el cromosoma 14q21.5-11¹⁷. El gen de HIF-1 α está localizado en el cromosoma 14q21, compuesto por 15 exones en una región de 53kb de ADN genómico. Este gen codifica para una proteína de 826 iaminoácidos. Las dos sub-unidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, debido a que contienen un dominio bHLH (basic helix-loop-helix) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), los cuales se encuentran involucrados en la dimerización y en la unión al ADN¹⁸. El extremo COOH-terminal de la sub-unidad α contiene dos dominios de transactivación (TADs) y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), siendo éstos los responsables de las funciones transactivadora y reguladora de este factor en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno¹⁹. HIF-1 β es idéntico al ARNTtranslocador nuclear del receptor Ah (aryl hydrocarbon). Esta proteína dimeriza con receptores Ah activados cuyos ligandos constituyen

diferentes contaminante ambiental, como aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos y compuestos aromáticos (dioxinas, dibenzofuranos y bifenilos)²⁰⁻²¹.

Es importante estudiar la relación que existe entre la expresión de HIF-1 α en procesos de hipoxia tales como la intoxicación por monóxido de carbono y dióxido de carbono; por este motivo, en el presente trabajo se analizó si la exposición de animales a concentraciones letales de CO₂, guarda relación con la expresión diferencial del mRNA del gen HIF1 α en la corteza frontal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron lotes de tres ratas macho de la cepa Wistar, a las que se les indujo la muerte por exposición a CO₂. Se sometieron a los animales a concentraciones de CO₂ / O₂; el grupo de Exposición 1 fue sometido a una concentración de 40% CO₂/60%O₂ siendo tres sujetos por cada grupo; el tiempo de pérdida de conciencia de este grupo fue de 5 a 7 minutos. El grupo de Exposición 2 fue sometido a una concentración de 60%CO₂/40%O₂ siendo tres sujetos por cada grupo; el tiempo de pérdida de conciencia de este grupo fue de 3 a 4 minutos. El grupo control fue sacrificado por dislocación cervical. Se tomaron muestras de 1-3 mm o 50-100 mg de corteza cerebral. Se puso especial atención a que el lugar de la manipulación y todo el material que se empleó fueran previamente sujetos a esterilización por UV.

Se realizó el sacrificio según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, relacionada a las especificaciones técnicas para la

producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se tomaron en cuenta los Criterios de elección para métodos de eutanasia. Siguiendo las recomendaciones de la norma antes mencionada se utilizó un cilindro de CO₂ comprimido en una cámara cerrada previamente gasificada a la introducción de los animales hasta alcanzar la concentración deseada y sometidos a esta concentración hasta la inconsciencia y perdida de la respiración del animal.

Para la extracción del RNA, se homogeneizaron las muestras con 1 ml del TRIzol Reagent por cada 50-100 mg de muestra de tejido; las muestras se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, agregando 0.2 ml de cloroformo por ml de Trizol; posteriormente se lavaron con 1 ml de etanol al 75% potr cada

ml de TRIzol Reagent, centrifugando opr 5 min a 4°C a 7500 RPM.

A partir de haber obtenido el RNA total se procede a convertirlo a cDNA utilizando PCR Transcriptasa Reversa. Con la finalidad de amplificar las dos diferentes isoformas del gen HIF-1α se utilizaron los oligonucleótidos (primers) informados por Schaible et al: HIF-1α1 sentido 5'-AACATTATTACAGCAGCCAGACG-3', HIF-1α1 antisentido 5'-ACTGGTCAGCTGTGGTAATCCA-3', La localización de los primers en la secuencia del mRNA de HIF-1α se muestra en la figura 1. Para la visualización del amplificado de PCR, se realiza un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2.0%.

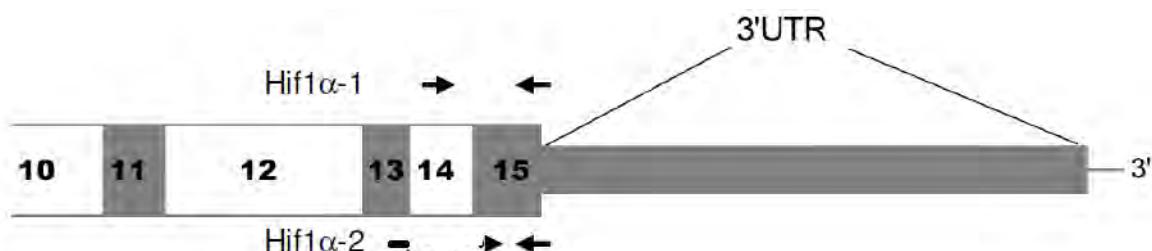


Figura 1. Localización de las secuencias de oligonucleótidos sentido y antisentido para HIF-1α.

RESULTADOS

Los resultados de la amplificación por RT-PCR del gen HIF-1α indican que la expresión es semejante entre los grupos controles y los expuestos; se analizaron cada uno de los animales en los grupos de

exposición 1 (40% CO₂/60% O₂) y 2 (60% CO₂/ 40% O₂), en diferentes periodos de tiempo: 00hr, el momento inmediato después de determinar la hora de muerte; 01hr, una hora después de la hora de muerte; 02hr, dos horas posterior a la hora de muerte (figura 2, tabla 1).

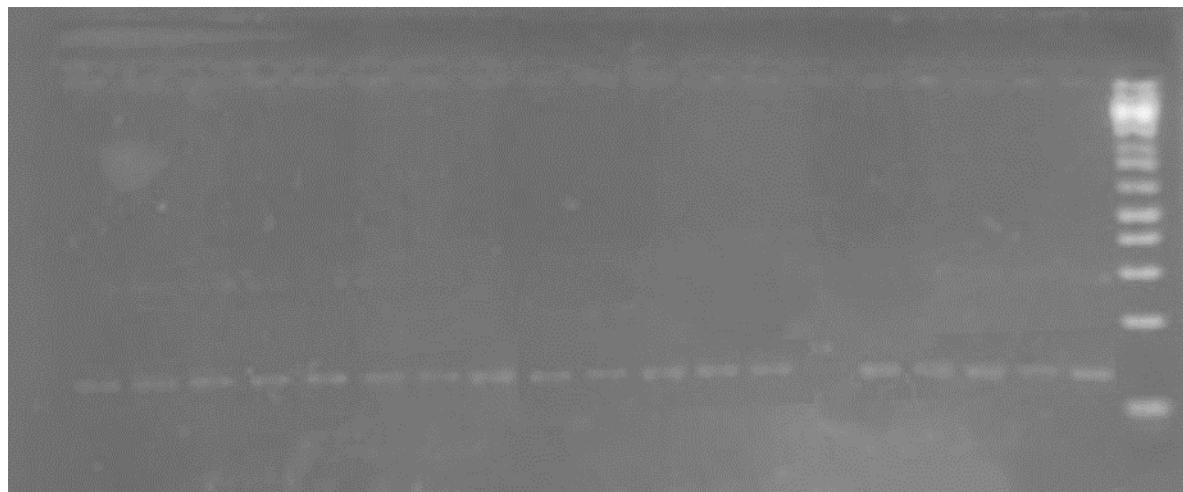


Figura 2. 1. Marcador de peso molecular, 2. R1 00hrs Grupo control, 3.R2 00hrs Grupo Control, 4. R3 00hrs Grupo Control, 5. R1 01hrs Grupo Control, 6. R2 01hrs Grupo control, 7. R3 01hrs Grupo Control, 8.R4 00hrs Grupo de exposicion1, 9. R5 00hrs Grupo de exposición 1, 10.R6 00hrs Grupo de Exposición 1, 11. R4 01hrs Grupo de Exposición 1, 12. R5 01hrs Grupo de Exposición 1, 13. R6 01hrs Grupo de exposición 1, 14. R7 00hrs Grupo exposición 2, 15. R8 00hrs Grupo de exposición 2, 16. R9 00hrs Grupo de Exposición 2. 17. R7 01hrs Grupo de Exposición 2, 18. R8 01hrs Grupo de exposición 2, 19. R9 01hrs Grupo de exposición 2.

Expresión de cada una de las ratas analizadas según grupo y hora.									
	Grupo Control			Grupo de Exposición 1			Grupo Exposición 2		
Hora	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
00hr	Si	si	Si	Si	si	Si	Si	Si	Si
01hr	Si	si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla 1. Expresión de cada uno cada una de las ratas analizadas según grupo y hora

Debido a que todos los amplificados fueron semejantes, se realizó una repetición con un pool de los RNAs de

los tres individuos de cada grupo y se observaron bandas análogas (figura 3, tabla 2).

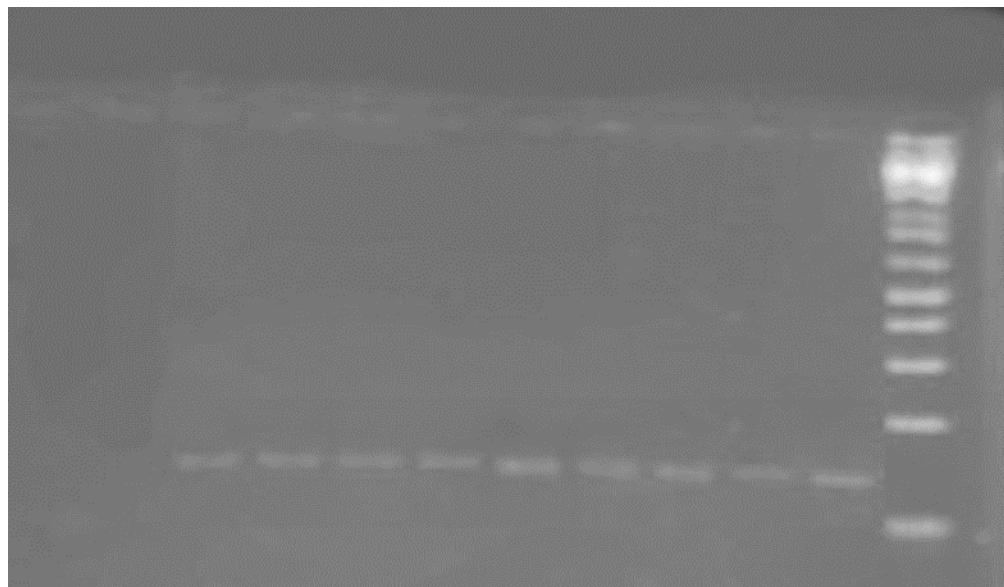


Figura 3. 1. Marcador de peso molecular, 2. Pool grupo control 00hr, 3. Pool grupo control 01hr, 4. Pool Grupo Control 02hrs, 5. Pool Grupo de Exposición 1 00hrs, 6. Pool grupo Exposición 1 01hr, 7. Pool Grupo Exposición 1 02hrs, 8. Pool Grupo de Exposición 2 00hrs, 9. Pool grupo Exposición 2 01hr, 10. Pool Grupo Exposición 2 02hrs.

Hora	Grupo Control	Grupo Exposición 1	Grupo Exposición 2
00hr	Si	Si	Si
01hr	Si	Si	Si
02hrs	Si	Si	Si

Tabla 2. Pool de los RNAs de los tres individuos de cada grupo según hora

DISCUSIÓN

En medicina forense, las muertes por intoxicación por monóxido de carbono, son diagnosticadas generalmente por el examen anatopatológico en el cadáver; la prueba de laboratorio que se utiliza para corroborar el diagnóstico es la determinación de carboxihemoglobina por diferentes métodos, pero puede arrojar resultados no confiables debido a la calidad de la muestra y al método empleado.

No se han encontrado estudios donde se relacione la expresión de HIF- 1a con la muerte por intoxicación por monóxido de carbono. Sato et al realizaron un estudio sobre la expresión de mRNA en la corteza frontal e hipotálamo en un modelo de rata por intoxicación aguda de dióxido de carbono; sin embargo ellos analizaron la expresión de Agps, Hcrt, Th, Hspb2, Oprd1, Ren, Ppy, Crhr2, Car1, Hcrt 1, observando una elevación en la expresión de Hspb2 y Agps, la cual es una proteína de choque térmico.

Se han realizado trabajos acerca de la expresión de HIF-1 α en personas vivas sometidas a procesos de hipoxia como el realizado por Vogt et al, en el cual los sujetos fueron sometidos a entrenamientos de alta y de baja intensidad en condiciones de normoxia e hipoxia; se observó una elevación en la concentración de HIF-1 α en ambos tipos de entrenamientos pero solo en condiciones de hipoxia.

En el presente estudio no se observó expresión diferencial de HIF-1 α entre el grupo control y los grupos de exposición a CO₂ ya que hubo expresión de HIF-1 α tanto en el grupo que no fue expuesto a CO₂ como en los grupos que fueron expuestos a diferentes concentraciones de CO₂.

Es recomendable realizar un análisis de la expresión diferencial de HIF-1 α utilizando como matriz biológica músculo liso y estriado, analizando si existe relación con la muerte por intoxicación por monóxido de carbono. Otra opción de seguimiento al estudio sería establecer los valores de referencia de HIF-1 α en individuos en estado de normoxia en su estado basal, para hacer la diferencia con pacientes sometidos a la exposición de CO₂.

En el presente estudio no se observó relación alguna entre la expresión de mRNA de HIF-1 α y la muerte por intoxicación por monóxido de carbono; los resultados de la amplificación por RT-PCR del gen HIF-1 α indican que la expresión es semejante entre los grupos controles y los expuestos. Con base a los resultados obtenidos, la expresión de RNA de HIF-1 α no está relacionada con la supresión de la respiración causada por envenenamiento con CO₂.

REFERENCIAS

1. Silva L, Robazzi M, Terra F. Relation between workplace accidents and the levels of carboxyhemoglobin in motorcycle taxi drivers. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2013; 21: 1119-26.
2. Harris JR, Attwell D. Synaptic energy use and supply. *Neuron*. 2012; 75:762-77.
3. Haddad J. A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependant regulation of HIF-1alpha. *FEBS Lett.* 2001; 505:269-74.
4. Caramelo C, Peña J, Castilla A. Respuesta a la hipoxia: Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina (Buenos Aires)*. 2006; 66(2):155-64.
5. Aquino A, González G. El papel del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la fibrosis pulmonar idiopática. *Neumol Cir Torax*. 2010; 69(3):170-7.
6. Kaur B, Khwaja F, Severson EA. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology*. 2005; 7(2):134-53.
7. Gaber RD, Tripmacher R, Burmester G. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis*. 2005; 64:971-80.
8. Wang Y, Minko T. A novel cancer therapy: combined liposomal hypoxia inducible factor 1 alpha antisense oligonucleotides and an anticancer drug. *Biochemical pharmacology*. 2004; 68(10):2031-42.

9. Schaible E, Boehringer A, Callau D. Exercise and menstrual cycle dependent expression of a truncated alternative splice variant of HIF1a in leukocytes. *Exerc Immunol Rev.* 2009; 15:145-56.
10. Castellano R, Sendra J. La hipoxia estimula la expresión del receptor LRP1 a través del factor de transcripción HIF-1 alfa en células musculares lisas de pared vascular humana. *Clin Invest Arterioscl.* 2012; 24(3):115-30.
11. Weaver LK. Carbon Monoxide Poisoning. *New England Journal of Medicine.* 2009; 360(12):1217-25.
12. Majdanik S, Orowicz W, Borowiak K. Carbon monoxide as an external cause of fatality. *Ann Acad Med Stetin.* 2007; 53 Suppl 2:125-8; discussion 8.
13. Vázquez M, Álvarez C, Cruz A. Intoxicaciones inadvertidas por monóxido de carbono: una epidemia oculta. *Revista de Toxicología.* 2015; 32(2).
14. Giannuzzo AN. Los estudios sobre el ambiente y la ciencia ambiental. *Scientile Studia,* São Paulo. 2010; 8(1):129-56.
15. Ortiz SD, Mamani WC. Intoxicación por monóxido de carbono. *Revista de Actualización Clínica Investiga.* 2013; 36:1842-6.
16. Ernst A, Zibrak JD. Carbon Monoxide Poisoning. *New England Journal of Medicine.* 1998; 339(22):1603-8.
17. Holger K, Eltzschig PC. Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med.* 2011; 364(7):656-65.
18. Vogt AP. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol.* 2001; 91:173-82.
19. Sato K, Tsuji A, Usumoto Y, Kudo K, Yokoyama T, Ikeda N. Expression of mRNA in the frontal cortex and hypothalamus in a rat model of acute carbon dioxide poisoning. *Legal medicine.* 2016; 19:101-6.
20. Olson KN, Hillyer MA, Kloss JS, Geiselhart RJ, Apple FS. Accident or arson: is CO-oximetry reliable for carboxyhemoglobin measurement postmortem? *Clinical chemistry.* 2010; 56(4):515-9.
21. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2013; 2(2):70-8.

