

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“EFECTO CITOPROTECTOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO, DEFEROXAMINA Y N-ACETILCISTEÍNA FRENTE AL DAÑO POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN SIMULADA EN FIBROBLASTOS CARDIACOS EN CULTIVO”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de Doctor en Farmacología por:

PABLO IGNACIO PARRA FLORES

Directores de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz Araya

Dr. Ramón Rodrigo Salinas

Santiago-CHILE

Agosto 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

PABLO IGNACIO PARRA FLORES

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____

Directores de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz Araya _____

Dr. Ramón Rodrigo Salinas _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya Arango (Presidente) _____

Dra. Gina Sánchez Vergara _____

Dr. Emilio Herrera Videla _____

Dr. Mauricio Boric Pellerano _____

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis Directores de Tesis por creer en mi idea inicial de proyecto de investigación y darme la oportunidad para poder llevarla a cabo, y de los cuales me siento muy agradecido por haber sido excelentes profesores y personas conmigo. Todos estos años trabajando juntos fueron muy fructíferos tanto en lo personal como en mi formación como investigador científico, y sin duda la guía y apoyo que me dieron fueron muy importantes para poder decidir los caminos que fui tomando a lo largo del Doctorado, incluso en los momentos más difíciles.

También quisiera agradecer a mi familia por darme todo el apoyo durante estos años de intenso estudio; han sido un pilar fundamental para mí para seguir adelante. Juntos pasamos por innumerables dificultades, pero felizmente pude terminar el Doctorado, un logro personal que se lo quiero dedicar especialmente a mi mamá, a mi abuela, mi hermano y abuelo quienes han tenido que aguantarme todos los días tanto en mis buenos como en mis malos momentos, los quiero mucho.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio de quienes tengo presente muchos recuerdos muy divertidos y valiosos, y que de alguna u otra manera me ayudaron a llevar a cabo los experimentos que desarrollé en esta Tesis. Particularmente, a Diego, Pia, Claudia “Clodito”, Samir, Renato, José Miguel “Rulo”, Francisco “Pancho Malo”, Natalia y Ninoska con quienes compartí, aprendí y entablé una gran amistad cuando llegué al laboratorio. También, a quienes me acompañaron en la parte final del desarrollo de mi Tesis, donde me tocó estar en una posición de mayor responsabilidad en el laboratorio y de quienes sin duda me llevo muchos gratos recuerdos: Aimeé y Felipe a quienes agradezco mucho su amistad, Jenaro, Paula, Francisca, Claudio, Esteban “dido” y Jossete. A todos muchas gracias y les deseo mucho éxito en lo personal y profesional a futuro.

Agradecimientos especiales a mis queridos amigos que siempre se preocuparon por mí, a quienes conocí en la universidad durante los estudios de pregrado y que han estado presentes a lo largo de todos estos años: Pedro, Felipe, Marcel, Gonzalo, Bárbara, Sebastián “Apu”. Al Dr. Jaime Riquelme y al Dr. Raúl Vivar por todo su apoyo, consejos, aportes y enseñanzas durante todo este tiempo; a Don José Riquelme, Sra. Gindra, Don Fidel y Evelyn también por su compañía y ayuda en todo momento.

Finalmente quiero agradecer a la comisión por sus críticas constructivas y comentarios que sin duda fueron un gran aporte para orientar de mejor manera el desarrollo de esta Tesis, y por tener la mejor disposición para reunirse pese a las dificultades por las que está pasando el País debido al Covid-19.

El desarrollo de esta Tesis de Doctorado se realizó gracias al trabajo en colaboración de los laboratorios de Farmacología Molecular (Dr. Guillermo Díaz-Araya), Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, y del laboratorio de Estrés Oxidativo y Nefrotoxicidad (Dr. Ramón Rodrigo Salinas), Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. También quisiera agradecer el apoyo del Laboratorio de Transducción de Señales, *ADVANCED CENTER FOR CHRONIC DISEASES* (ACCDiS) (Dr. Sergio Lavandero), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

Beca CONICYT 2015-2019 (Pablo Parra Flores)

Beca apoyo tesis Doctoral CONICYT 21151215 (Pablo Parra Flores)

Proyectos FONDECYT 1170425 (Guillermo Díaz)

Proyecto FONDEF ID15110285 (Ramón Rodrigo)

Los resultados obtenidos en esta Tesis se presentaron en los siguientes Congresos:

- **Parra, P.I.**, Díaz Araya, G., Rodrigo R. VITAMIN C, N ACETYLCYSTEINE AND DEFEROXAMINE ASSOCIATION DECREASES CARDIAC FIBROBLAST APOPTOSIS INDUCED BY SIMULATED ISCHEMIA/REPERFUSION (Póster). XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Noviembre 2017.

- **Parra-Flores, P.I.**, Valenzuela-Bustamante, P., Brüggendieck F.A., Vivar R., Díaz-Araya, G. Effects of the ascorbate/deferoxamine/n-acetylcysteine association on functionality and survival/apoptosis pathways in cardiac fibroblasts under ischemia/reperfusion (Presentación Oral para incorporación como socio-estudiante). XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Santa Cruz, Noviembre 2018.

Premios obtenidos de las presentaciones:

- 2017 - 2do Lugar Categoría Mejor Poster, XXXIX Congreso Anual SOFARCHI, Puerto Varas, Chile.

- 2018 - Ganador Premio “Prof. Dr. Jorge Mardones Restat”, XL Congreso Anual SOFARCHI, Santa Cruz, Chile.

- 2018 - Incorporación a la SOFARCHI como Socio-Estudiante.

De los resultados obtenidos en esta Tesis se obtuvieron las siguientes publicaciones:

- **Pablo Parra-Flores**, Jaime A Riquelme, Paula Valenzuela-Bustamante, Sebastian Leiva-Navarrete, Raúl Vivar, Jossete Cayupi-Vivanco, Esteban Castro, Claudio Espinoza-Pérez, Felipe Ruz-Cortés, Zully Pedrozo, Sergio Lavandero, Ramon Rodrigo, Guillermo Diaz-Araya. The Association of Ascorbic Acid, Deferoxamine and N-Acetylcysteine Improves Cardiac Fibroblast Viability and Cellular Function Associated with Tissue Repair Damaged by Simulated Ischemia/Reperfusion. *Antioxidants* 2019 Dec; 8(12): 614. doi: 10.3390/antiox8120614.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS	15
RESUMEN	16
SUMMARY	17
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. El infarto agudo de miocardio y el remodelamiento cardiaco	18
1.2. Tratamiento clínico del infarto agudo de miocardio mediante terapias por reperfusión	19
1.3. Muerte celular inducida por isquemia/reperfusión cardiaca	19
1.3.1. Fisiopatología del daño por isquemia miocárdica	21
1.3.2. Fisiopatología del daño por reperfusión miocárdica	22
1.3.3. Papel del estrés oxidativo en la muerte celular inducida por reperfusión miocárdica	23
1.4. Proceso de cicatrización del corazón posterior al infarto: Papel del fibroblasto cardiaco	25
1.5. Antecedentes preliminares de los efectos de la isquemia/reperfusión simulada sobre la capacidad funcional del fibroblasto cardiaco	27
1.6. Estrategias de cardioprotección para reducir el daño por isquemia/reperfusión cardiaca	28
1.6.1. RISK y otras vías de pro-sobrevida importantes	29
1.7. Uso de antioxidantes para prevenir el daño por isquemia/reperfusión cardiaca	30
1.7.1. Uso de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, solos o asociados, para prevenir el daño por isquemia/reperfusión miocárdica	30
1.7.2. Daño por isquemia/reperfusión simulada en la capacidad funcional de los fibroblastos cardíacos y posible efecto citoprotector de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína	33
2. HIPÓTESIS	34
3. OBJETIVO GENERAL	34
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Reactivos y materiales	36

5.2.	Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos de ratas neonatos	37
5.3.	Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatos	37
5.4.	Protocolo de isquemia/reperfusión simulada y tratamiento antioxidante	37
5.5.	Determinación de la viabilidad celular por conteo celular	39
5.6.	Determinación de la viabilidad celular por ensayo de reducción de rezasurina	40
5.7.	Determinación de la producción de ROS intracelular	40
5.8.	Determinación de necrosis por citometría de flujo	41
5.9.	Determinación de apoptosis por citometría de flujo	42
5.10.	Western blot	43
5.10.1.	Preparación de extractos de proteínas totales	43
5.10.2.	Electroforesis de geles de poliacrilamida	43
5.10.3.	Electrotransferencia	44
5.10.4.	Inmunodetección de proteínas	44
5.11.	Evaluación de la migración celular por ensayo de cierre de la herida	45
5.12.	Protocolo para inducir diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos	45
5.13.	Síntesis de pro-colágeno tipo I	46
5.14.	Representación de datos y análisis estadístico	46
6.	RESULTADOS	47
6.1.	OBJETIVO ESPECÍFICO 1.	47
6.1.1.	Efectos de la isquemia/reperfusión simulada en la viabilidad de los fibroblastos cardiacos.	47
6.1.2.	Efecto dependiente de la concentración del ácido ascórbico, la deferoxamina y la N-acetilcisteína sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos bajo isquemia/reperfusión simulada.	48
6.1.3.	Efectos de asociaciones entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, a bajas concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos bajo isquemia/reperfusión simulada.	51
6.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO 2.	54
6.3.	OBJETIVO ESPECÍFICO 3.	58
6.3.1.	Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la producción de ROS intracelulares inducidas por isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.	58

6.3.2. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre las vías de supervivencia ERK1/2 y Akt, y las vías pro-apoptóticas p38 y JNK inducidas por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardíacos.	59
6.3.3. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre las fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3 y la relación Bcl-x1/Bax en fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	62
6.3.4. Estudios sobre citoprotección con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína en cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	64
6.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4.	66
6.4.1. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la migración inducida por suero en fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	66
6.4.2. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la diferenciación inducida por TGF-β1 en fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	68
6.4.3. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II en fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	69
7. DISCUSIÓN	70
7.1. Efectos de los antioxidantes, solos o asociados, sobre la pérdida de viabilidad celular inducida por la isquemia/reperfusión simulada en los fibroblastos cardíacos.	71
7.2. Efectos de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre los tipos de muerte celular inducidos por la isquemia/reperfusión simulada en los fibroblastos cardíacos.	73
7.3. Efectos de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre las vías ERK1/2, Akt, p38 y JNK en los fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	75
7.4. Efectos citoprotectores de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre la pérdida de viabilidad de los cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	76
7.5. Efectos citoprotectores de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre la pérdida de migración inducida por suero, diferenciación inducida por TGF-β1 y síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II en los fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	76

8.	LIMITACIONES	79
8.1.	Limitaciones en el análisis estadístico	79
9.	CONCLUSIONES	80
10.	ESTUDIOS PRELIMINARES DE CITOPROTECCIÓN CON LPS EN FIBROBLASTOS CARDIACOS EXPUESTOS A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN SIMULADA.	81
10.1.	Comparación entre los efectos del LPS y la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	86
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
12.	ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Esquema representativo de la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis.	21
Figura 2.	Esquema representativo del papel del estrés oxidativo en el daño por reperfusión miocárdico.	25
Figura 3.	Esquema representativo del protocolo de isquemia/reperfusión simulada empleado en los fibroblastos cardiacos.	38
Figura 4.	Esquema representativo del protocolo de conteo celular con azul de tripán.	39
Figura 5.	Esquema representativo del protocolo para determinación de la viabilidad celular por ensayo de reducción de rezasurina.	40
Figura 6.	Esquema representativo de la metodología empleada para la determinación de necrosis.	41
Figura 7.	Esquema representativo de la metodología empleada para la determinación de apoptosis.	42
Figura 8.	La viabilidad de los fibroblastos cardiacos disminuyó significativamente después de la isquemia/reperfusión simulada.	47
Figura 9.	Efectos del ácido ascórbico, a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos en normoxia y expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	49
Figura 10.	Efectos de la deferoxamina, a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos en normoxia y expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	50
Figura 11.	Efectos de la N-acetilcisteína, a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos en normoxia y expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	50
Figura 12.	Las asociaciones entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, a 10 μ M cada uno, aumentaron la viabilidad en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	52
Figura 13.	Efectos de las asociaciones entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, a 1 μ M cada uno, sobre la viabilidad en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	52

Figura 14.	Efectos de las diferentes concentraciones de la asociación entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la viabilidad en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	53
Figura 15.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína no disminuyó la necrosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.	55
Figura 16.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína reduce la apoptosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.	56
Figura 17.	La asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	57
Figura 18.	La asociación de ácido ascórbico/deferoxamina/N-acetilcisteína redujo la producción intracelular de ROS en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	59
Figura 19.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la activación de las vías de sobrevivencia ERK1/2 y Akt en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	60
Figura 20.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína disminuyó la activación de las proteínas pro-apoptóticas p38 y JNK en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	61
Figura 21.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína previno la disminución de los niveles de proteína de las pro-caspasas 9 y 3 en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	62
Figura 22.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la relación Bcl-x1/Bax en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	63
Figura 23.	La asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la viabilidad de los cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	64

Figura 24.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína previno la disminución de los niveles de proteína de las procaspasas 9 y 3 en cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	65
Figura 25.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la relación Bcl-xl/Bax en cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	65
Figura 26.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumenta la migración inducida por suero en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	67
Figura 27.	Los niveles de proteína de α -SMA aumentaron en los fibroblastos cardiacos luego de ser expuestos a isquemia/reperfusión simulada, estímulo de TGF- β 1 y tratamiento con la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína.	68
Figura 28.	La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	69
Figura 29.	Esquema representativo de los principales resultados de la Tesis Doctoral.	71
Figura 30.	El LPS aumentó la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.	81
Figura 31.	El LPS no disminuyó la necrosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.	82
Figura 32.	El LPS redujo la apoptosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.	83
Figura 33.	El LPS previno las fragmentaciones de las pros-caspasas 9 y 3 inducidas por la isquemia/reperfusión simulada a través de las vías ERK1/2 y Akt en fibroblastos cardiacos.	84
Figura 34.	El LPS previno la fragmentación de la pro-caspasa 9 inducida por la isquemia/reperfusión simulada a través de TLR4.	85
Figura Suplementaria 1.	Estudios preliminares sobre los efectos de las diferentes condiciones de normoxia, isquemia simulada e	101

	isquemia/reperfusión simulada sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos.	
Figura Suplementaria 2.	Estudios preliminares sobre el efecto de la 2-deoxi-D-glucosa en las condiciones de isquemia simulada e isquemia/reperfusión simulada sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos	102
Figura Suplementaria 3.	Evaluación preliminar de la sensibilidad de la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato en medio de cultivo y en fibroblastos cardiacos incubados con ella frente a estímulos de peróxido de hidrógeno a distintas concentraciones.	103
Figura Suplementaria 4.	Evaluación preliminar del efecto antioxidante de la asociación de ácido ascórbico/deferroxamina/N-acetilcisteína, a 10 µM cada uno, en fibroblastos cardiacos estimulados con peróxido de hidrógeno	104
Figura Suplementaria 5.	Intensidad de fluorescencia de los fibroblastos cardiacos incubados con 2',7'-diclorofluorescina diacetato en condiciones de normoxia.	104

ABREVIATURAS

α -SMA	: Alfa actina del músculo liso
A/D/N	: Ácido ascórbico, Deferoxamina, N-acetilcisteína
ASC	: Ácido ascórbico
BrdU	: 5-bromo-2'-deoxiuridina
COL1A1	: Colágeno tipo 1 alfa 1
DCFH-DA	: 2',7'-diclorofluorescina diacetato
DFO	: Deferoxamina
ECM	: Matriz extracelular
ERK1/2	: Quinasa regulada por señal extracelular 1/2
FBS	: Suero fetal bovino
I/Rs	: Isquemia/reperfusión simulada
JNK	: Quinasa c-Jun-N-terminal
IAM	: Infarto agudo de miocardio
LPS	: Lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas
NAC	: N-acetilcisteína
RISK	: Quinasa de rescate de la lesión por reperfusión
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
TGF- β 1	: Factor de crecimiento transformante beta 1
TLR4	: Receptor de tipo Toll-4

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio es una de las principales causas de muerte global y, por lo tanto, una enfermedad que ha sido ampliamente estudiada. En el infarto, una causa que contribuye al daño celular es la reperfusión post-isquemia, mediado esencialmente por el estrés oxidativo. A este respecto, los efectos del daño por isquemia/reperfusión sobre los fibroblastos cardiacos, un tipo celular muy importante en el proceso de reparación tisular, aún se desconocen. Es bien conocido que el ácido ascórbico, la deferoxamina y la N-acetilcisteína (A/D/N) son antioxidantes con efectos cardioprotectores. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si la asociación farmacológica entre estos antioxidantes, a concentraciones que individualmente no muestran protección, podrían conferir protección a los fibroblastos cardiacos contra el daño por isquemia/reperfusión. Para evaluar esto, los fibroblastos cardiacos de ratas neonatas fueron sometidos a isquemia/reperfusión simulada en presencia o ausencia de tratamiento con A/D/N agregado al comienzo de la reperfusión simulada. La viabilidad celular fue medida usando tinción con azul de tripán, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) fue medida usando la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato. La muerte celular fue medida por citometría de flujo usando yoduro de propidio. Los mecanismos de señalización celular, diferenciación en miofibroblastos y síntesis de pro-colágeno tipo I fueron determinados por Western blot, mientras que la migración fue evaluada utilizando el método de la herida. Nuestros resultados muestran que la asociación A/D/N, a concentraciones donde cada uno de ellos por sí mismo no demostró actividad citoprotectora, aumentó la viabilidad de los fibroblastos cardiacos. La asociación A/D/N también disminuyó el estrés oxidativo generado en la isquemia/reperfusión simulada, indujo la fosforilación de las vías de supervivencia ERK1/2 y Akt, y disminuyó la fosforilación de las proteínas pro-apoptóticas p38 y JNK. El tratamiento con A/D/N también redujo la apoptosis inducida por la reperfusión evidenciado por una disminución en la población sub-G1, menores fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3, así como también un aumento en la relación Bcl-x1/Bax. Finalmente, la isquemia/reperfusión simulada inhibió la migración inducida por suero, la diferenciación de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos cardiacos mediados por TGF- β 1, y la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II, pero estos efectos fueron prevenidos por el tratamiento con A/D/N. En conclusión, en esta Tesis se presentan los primeros antecedentes no descritos anteriormente para la asociación farmacológica A/D/N protegiendo la viabilidad y la funcionalidad de los fibroblastos cardiacos después de la isquemia/reperfusión simulada y representando, por lo tanto, una novedosa alternativa terapéutica para cardioprotección.

Palabras Claves: Ácido ascórbico, deferoxamina, N-acetilcisteína, isquemia/reperfusión, fibroblastos cardiacos, especies reactivas del oxígeno.

SUMMARY

Acute myocardial infarction is one of the main causes of global death and, therefore, a disease that has been widely studied. In heart attack, one factor that contributes to cellular damage is post-ischemic reperfusion, caused essentially by oxidative stress. In this regard, the effects of ischemia/reperfusion damage on cardiac fibroblasts, a very important cell type in the tissue repair process, are still unknown. Ascorbic acid, deferoxamine, and N-acetylcysteine (A/D/N) are well known to be antioxidants with cardioprotective effects. Therefore, the objective of this study was to assess whether the pharmacological association between these antioxidants, at concentrations that individually do not show protection, could confer protection to cardiac fibroblasts against ischemia/reperfusion damage. To assess this, neonatal rat cardiac fibroblasts were subjected to simulated ischemia/reperfusion in the presence or absence of treatment with added A/D/N at the start of simulated reperfusion. Cell viability was measured using trypan blue staining, the production of reactive oxygen species (ROS) was measured using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate probe. Cell death was measured by flow cytometry using propidium iodide. The mechanisms of cellular signaling, differentiation in myofibroblasts and synthesis of pro-collagen type I were determined by Western blotting, while migration was evaluated using the wound healing assay. Our results show that the A/D/N association, at concentrations where each of them by itself did not show cytoprotective activity, increased the viability of cardiac fibroblasts. The A/D/N association also decreased oxidative stress generated in simulated ischemia/reperfusion, induced phosphorylation of the ERK1/2 and Akt survival pathways, and decreased phosphorylation of pro-apoptotic proteins p38 and JNK. Treatment with A/D/N also reduced reperfusion-induced apoptosis evidenced by a decrease in the sub-G1 population, less fragmentation of pro-caspases 9 and 3, as well as an increase in the Bcl-xl/Bax ratio. Finally, the ischemia/reperfusion inhibited serum-induced migration, differentiation of cardiac fibroblasts to cardiac myofibroblasts mediated by TGF- β 1, and pro-collagen synthesis induced by angiotensin II, but these effects were prevented by treatment with A/D/N. In conclusion, this Thesis presents the first antecedents not previously described for the pharmacological association A/D/N, protecting the viability and functionality of cardiac fibroblasts after simulated ischemia/reperfusion and, therefore, representing a novel alternative therapy for cardioprotection.

Keywords: Ascorbic acid, deferoxamine, N-acetylcysteine, ischemia/reperfusion, cardiac fibroblasts, reactive oxygen species.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El infarto agudo de miocardio y el remodelamiento cardiaco

De acuerdo con cifras obtenidas de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares se han mantenido como la principal causa de muerte en el mundo entre los años 2000 y 2016. De un total de 56,9 millones de muertes ocurridas en 2016 a nivel global 15,2 millones (26,7 %) se deben a cardiopatías isquémicas y accidentes cerebrovasculares [1]. Entre las principales cardiopatías isquémicas se encuentra el infarto agudo de miocardio (IAM) que se define como la muerte del miocardio producida por la oclusión parcial o total de la circulación coronaria debido a trombos circulantes o estenosis [2]. En el estudio INTERHEART de más de 15.000 pacientes en 52 países, el 90% de los infartos de miocardio en hombres (94% en mujeres), se relacionaron con factores de riesgo tales como fumar, dislipidemia, hipertensión, obesidad abdominal, factores psicosociales, consumo de frutas y vegetales, ingesta de alcohol, regularidad en la actividad física y diabetes [3].

El IAM lleva a la muerte de una gran cantidad de células cardíacas debido a la isquemia prolongada (falta de oxígeno y nutrientes sanguíneos). Dado que el corazón de un adulto mamífero tiene una capacidad muy limitada para regenerarse después de la injuria, las células muertas son reemplazadas por tejido fibrótico seguido de un remodelamiento alrededor del miocardio que incluye engrosamiento (hipertrofia) y rigidez (fibrosis) de la pared del ventrículo izquierdo, lo que eventualmente conduce a una disfunción cardíaca. Además de su efecto sobre la contractibilidad, la cicatrización fibrótica interfiere con la normal función eléctrica del corazón predisponiendo a la aparición de arritmias [4].

Los factores fisiopatológicos que convergen hacia el remodelado del corazón después del infarto de miocardio son múltiples. Sin embargo, los determinantes fundamentales de este proceso (y de su progresión hacia una insuficiencia cardíaca clínica), son la extensión del infarto inicial y la calidad del proceso reparativo post-infarto. En la práctica clínica, la limitación en la extensión del infarto se aborda mediante una reperfusión coronaria oportuna. Por otro lado, la manipulación terapéutica del proceso de reparación subsecuente, que es impulsado principalmente por una inflamación robusta del tejido y, posteriormente, por su inhibición y resolución activas, ha resultado ser mucho más desafiante y difícil de alcanzar, por lo que se ha hecho necesario proponer potenciales blancos terapéuticos que podrían influenciar la reparación y cicatrización cardíaca [5].

1.2. Tratamiento clínico del infarto agudo de miocardio mediante terapias por reperfusión

El manejo clínico del IAM involucra una compleja interacción entre una rápida revascularización coronaria mediante procedimientos basados en catéteres y tratamientos farmacológicos, una prevención de eventos isquémicos recurrentes a través de terapias antitrombóticas optimizadas, y tratamientos dirigidos a mitigar el efecto de la necrosis miocárdica y prevenir eventos futuros [2].

Para el tratamiento de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI), lo principal es una reperfusión coronaria de emergencia mediante angioplastia coronaria percutánea primaria (ACPP) o terapia fibrinolítica intravenosa, aunque la primera opción presenta importantes ventajas tales como menores tasas de muertes tempranas, de reinfartos y de hemorragias intracraneales. Además, los tratamientos actuales están incluyendo el implante de *stent* coronarios metálicos, la liberación de fármaco o ambas características [6].

El manejo de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST requiere de una urgencia y enfoque de revascularización distinto dado que hay una circulación residual en la zona isquémica. La estrategia invasiva con ACPP es de elección ya que ha tenido resultados beneficiosos y favorables para la mayoría de los pacientes, mientras que el uso de la terapia fibrinolítica primaria está contraindicado por ser perjudicial [6].

1.3. Muerte celular inducida por isquemia/reperfusión cardiaca

En un paciente con STEMI, la intervención terapéutica más efectiva para reducir el daño miocárdico y limitar el tamaño del infarto provocado por la isquemia es la reperfusión oportuna. Sin embargo, el proceso de reperfusión miocárdica, paradójicamente, puede inducir por sí misma muerte celular, un fenómeno conocido como daño por reperfusión que puede contribuir hasta con un 50% del tamaño final del infarto según diversos estudios en modelos animales de infarto cardiaco [7]. La necrosis y la apoptosis son los dos tipos de muerte celular que más se han descrito en el contexto de isquemia/reperfusión miocárdica [8].

La *necrosis* es un proceso pasivo (no requiere de energía para que ocurra), descontrolado y que usualmente afecta a grandes campos de células; y que es mediado por 2 mecanismos: interferencia con el suministro de energía y un daño directo en la membrana celular. Se caracteriza morfológicamente por la pérdida de la integridad de la membrana celular, desintegración tanto del núcleo como de la cromatina condensada, hinchazón celular, formación de vacuolas citoplasmáticas, organelos desintegrados y lisados, formación de vesículas citoplasmáticas, mitocondrias hinchadas, desintegradas o condensadas.

Además, la liberación del contenido citoplasmático hacia el medio extracelular genera señales quimiotácticas que eventualmente reclutan células inflamatorias [9].

La *apoptosis* es conocida como un proceso de muerte celular programada, y ocurre normalmente durante el desarrollo y envejecimiento del organismo para mantener la homeostasis de las poblaciones celulares en los distintos tejidos. Además, es un mecanismo de defensa frente a reacciones del sistema inmune o cuando las células son dañadas debido a patologías o agentes nocivos. No obstante, hay patologías (como muchos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes o daño por isquemia), donde las anormalidades en la muerte celular pueden ser un componente significativo, ya sea con una apoptosis insuficiente o excesiva. Las características morfológicas de la apoptosis son: ocurre en una célula individual o un pequeño grupo de células, hay encogimiento celular y externalización de fosfatidilserina, hay desintegración nuclear y fragmentación de la cromatina condensada, la membrana celular se mantiene intacta, se forman cuerpos apoptóticos que retienen el citoplasma los cuales son fagocitados por macrófagos y otras células cercanas, y no hay reacción inflamatoria. Los mecanismos bioquímicos de la apoptosis son altamente complejos e involucran una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. Las dos principales vías apoptóticas son la activación de receptores de muerte por el ligando de sintetasa del ácido graso (FasL) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (vía extrínseca), y la liberación de citocromo c desde la mitocondria debido a diferentes estímulos (vía intrínseca). A través de las vías extrínseca e intrínseca se activan la caspasa-8 y caspasa-9, respectivamente, las cuales son caspasas iniciadoras que convergen en la activación de la caspasa-3 ejecutora. Esta última activa varias endonucleasas (degradan material nuclear) y proteasas (degradan proteínas del citoesqueleto y nucleares) que llevan a muerte celular programada [9] (Figura 1).

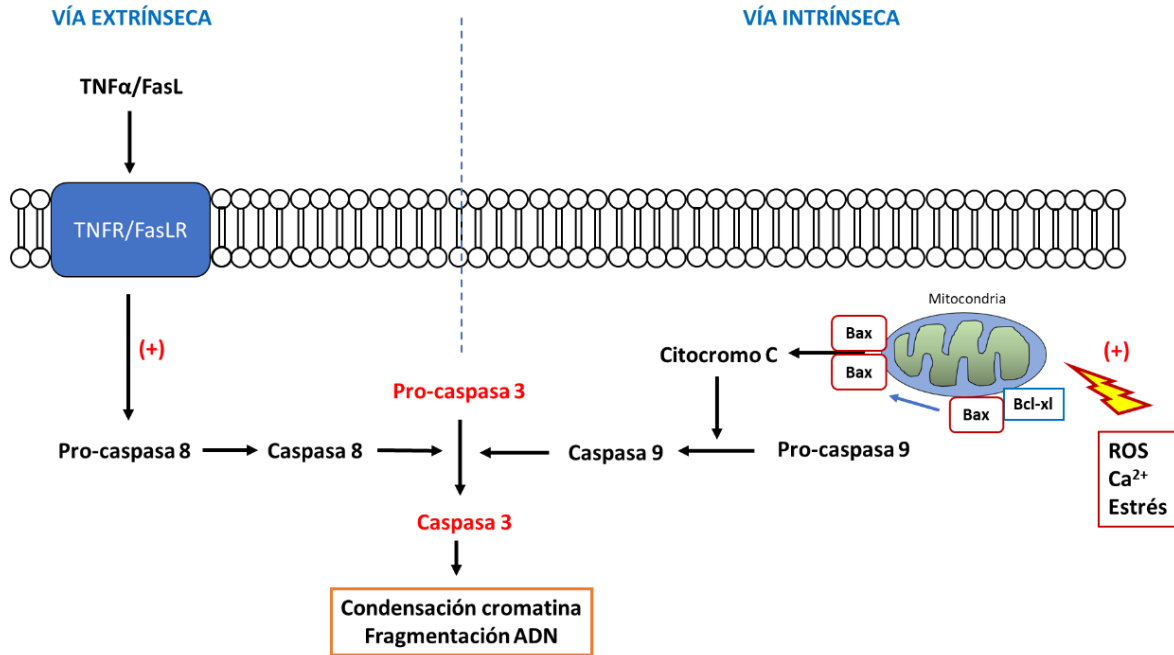


Figura 1. Esquema representativo de la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis. La vía extrínseca de la apoptosis se inicia con la unión de ligandos, como TNF- α o FasL, con sus respectivos receptores causando la activación río debajo de la caspasa 8. Por otro lado, la vía intrínseca de la apoptosis se inicia con la salida de citocromo C desde el interior de la mitocondria a través de poros formados por proteínas Bax (entre otras proteínas pro-apoptóticas), en respuesta a estímulos nocivos como exceso de calcio o ROS, lo que activa a la caspasa 9. Ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3 ejecutora, la cual desencadena los eventos finales de la apoptosis con la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN.

1.3.1. Fisiopatología del daño por isquemia miocárdica

Cuando ocurre un IAM debido a una oclusión coronaria, las células del corazón pasan a estar en una condición de isquemia, que al ser prolongada lleva a muerte celular. La privación de oxígeno y nutrientes resulta en una serie de cambios metabólicos y bioquímicos abruptos al interior de las células cardíacas. La ausencia de oxígeno detiene la fosforilación oxidativa en la mitocondria y con ello decaen los niveles de adenosín 5'-trifosfato (ATP), hay despolarización de la membrana mitocondrial, se acumula el fosfato inorgánico mitocondrial (debido a que hay hidrólisis de ATP para mantener el potencial de membrana mitocondrial), y disminuye la función contráctil del corazón. Además, la falta de oxígeno provoca que el metabolismo celular cambie a glicólisis anaeróbica, resultando en acumulación de lactato lo cual reduce el pH intracelular ($a < 7.0$). Los cambios mencionados anteriormente llevan a una alteración en la función de las proteínas intercambiadoras de iones lo que provoca acumulación de calcio al interior de la célula.

1.3.2. Fisiopatología del daño por reperfusión miocárdica

La restauración del flujo coronario miocárdico conduce a una recuperación de la respiración mitocondrial y del potencial de membrana mitocondrial, a un aumento en la síntesis de ATP, y una normalización del pH intracelular. Como consecuencia, ocurre una excesiva actividad contráctil o hipercontractura debido a que aumentan aún más los niveles de calcio citosólico (proveniente tanto del retículo sarcoplásmico como del extracelular), se producen altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), se activan calpaínas (proteasas dependientes de calcio inhibidas en pH ácido) que digieren el citoesqueleto, y se induce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) (un canal altamente permeable del cual se sabe poco sobre su identidad molecular y que permite una conexión directa entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana), provocando edema y lisis de la mitocondria [10]. La apertura del MPTP permite la liberación de las proteínas citocromo c (una proteína pequeña que funciona como transportador electrónico mitocondrial entre los complejos respiratorios III y IV), Smac/DIABLO y proteasa de serina HtrA2/Omi (ambas proteínas inhiben a los IAPs o inhibidores de las proteínas de apoptosis), las cuales activan la vía intrínseca de la apoptosis, mientras que también se libera otro grupo de proteínas pro-apoptóticas en forma tardía que se encargan de la fragmentación de la cromatina nuclear conocidas como AIF (factor inductor de apoptosis), endonucleasa G y CAD (ADNasa activada por caspasa). Además, cabe destacar que existen proteínas de la familia Bcl-2 anti-apoptóticas (ej. Bcl-xl, Bcl-2, Bcl-w) y pro-apoptóticas (ej. Bax, Bad, Bak), que controlan y regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial, y con ello la salida de citocromo c, frente a eventos mitocondriales apoptóticos [9]. Por último, aún no es claro si la participación de la respuesta inflamatoria que acompaña al IAM contribuye a la patogénesis del daño por reperfusión o si es una reacción a este evento [7].

1.3.3. Papel del estrés oxidativo en la muerte celular inducida por reperfusión miocárdica

El estrés oxidativo se refiere a la acumulación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y ROS debido a una excesiva producción y/o a una degradación insuficiente relacionada con una menor actividad de las defensas antioxidantes. La generación de ROS y RNS durante la reperfusión miocárdica ha sido ampliamente estudiada en modelos animales de corazones aislados perfundidos expuestos a isquemia/reperfusión, por lo que en consecuencia se ha propuesto al estrés oxidativo como un potencial blanco farmacológico en este contexto [11, 12] (Figura 2).

Las ROS son moléculas pequeñas o iones moleculares generados, inicialmente, por la reducción del oxígeno durante el metabolismo celular que ocurre mayoritariamente en la mitocondria, y se caracterizan por la presencia de electrones desapareados. Entre las ROS más conocidas están el anión superóxido (tiene una vida media corta y puede originar otras ROS mediante reacciones enzimáticas o catalizadas por metales), el peróxido de hidrógeno (es más estable y puede difundir a través de las membranas celulares), y el radical hidroxilo (un radical tóxico que es altamente reactivo y que tiene un fuerte potencial oxidante; posee vida media corta y reacciona cerca de su sitio de formación). Por otro lado, las RNS como el peroxinitrito (altamente reactivo y dañino para la célula) derivan de la reacción entre el óxido nítrico (NO) y el anión superóxido [12].

Durante la isquemia y reperfusión miocárdica, las potenciales fuentes enzimáticas generadoras de anión superóxido son la actividad del citocromo p450, el desacoplamiento del transporte de electrones en la cadena mitocondrial, la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, la actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, y la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada. Las fuentes mitocondriales de peróxido de hidrógeno son diversas, siendo la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) la más importante. El radical hidroxilo se produce a partir de la reducción de peróxido de hidrógeno por hierro (II) (reacción de Fenton), y a partir de la descomposición del peroxinitrito [11]. Es importante destacar que se ha demostrado en modelos de corazón aislado perfundido que durante la reperfusión posterior a una isquemia prolongada aumentan considerablemente los niveles de hierro y cobre libre en el flujo coronario los cuales se han correlacionado directamente con el daño cardíaco y la producción de radicales hidroxilos [13, 14]. Este aumento de hierro libre extracelular se debe probablemente tanto a la lisis de las células cardíacas como a la movilización de hierro desde los almacenamientos de ferritina intracelular favorecido por la disminución del pH en la célula durante la isquemia [15].

Las ROS y RNS causan un daño celular severo. Los radicales libres se caracterizan por generar reacciones en cadena autopropagantes, espontáneas y escalonadas que terminan por modificar a diversas biomoléculas orgánicas de la célula hacia productos celulares nocivos. En consecuencia, los productos

de lipoperoxidación pueden comprometer la integridad de la membrana celular o de las proteínas que forman parte de ella; la oxidación y nitración de proteínas pueden perjudicar su propia función; y el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) puede ser mutagénico [11].

El estrés oxidativo es considerado uno de los factores más importantes de la apertura del MPTP durante los primeros minutos de la reperfusión miocárdica, lo que lleva a muerte celular por apoptosis (salida de citocromo c al citoplasma para iniciar la vía intrínseca apoptótica), y necrosis (producto del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y a la disipación del potencial de membrana mitocondrial, generando el vaciamiento de las reservas energéticas de ATP) [11]. Además, el estrés oxidativo activa a la quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), una proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos (MAPKKK), que posee proteínas regulatorias de tioredoxina sensibles a estrés oxidativo que la mantienen inactiva, la que a su vez activa, río abajo, a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38 y quinasa c-Jun N-terminal (JNK) provocando apoptosis [16, 17]. Las vías de p38 y JNK están más relacionadas con el estrés celular, y su activación ha sido correlacionada a la apoptosis inducida por estrés oxidativo [18]. Esto último podría deberse, en parte, a que la activación de JNK induce a una inhibición directa de Bcl-2 antiapoptótico, o indirecta a través de la activación de proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticos (ej. Bax, Bak, Bim, Bid) los que a su vez oligodimerizan formando poros en la membrana externa de la mitocondria facilitando la salida de citocromo c y Smac/DIABLO. También, la fosforilación de JNK activa a p53 y AP-1 (proteína activadora 1), las cuales inducen la expresión de genes pro-apoptóticos como PUMA (modulador de la apoptosis regulada por aumento de p53), Bax, TNF- α , FasL y Bak [17]. Por último, se ha demostrado la importancia de la activación de p38 y JNK en la apoptosis inducida por isquemia/reperfusión en modelo animal de corazón aislado perfundido [19] y en modelo *in vitro* de cardiomiocitos [20].

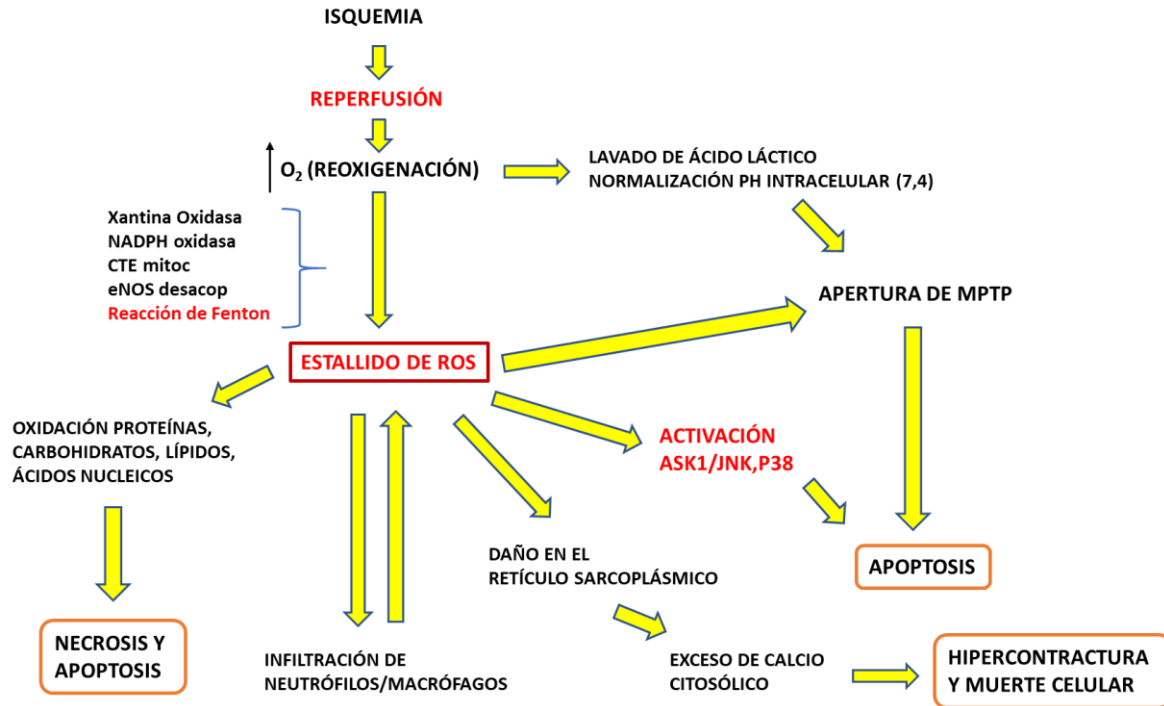


Figura 2. Esquema representativo del papel del estrés oxidativo en el daño por reperusión miocárdico. Se muestra que la reperusión miocárdica genera una recuperación de los niveles de oxígeno en las células bajo condiciones de isquemia, provocando la generación de ROS desde diversas fuentes enzimáticas y no-enzimáticas. Entre las acciones deletéreas que provoca este estallido de ROS están el daño oxidativo a diversas macromoléculas, la activación de vías pro-apoptóticas como ASK1 y la apertura del MPTP, así como también un aumento en el calcio intracelular, todas las cuales llevan a muerte celular. CTE mitocondrial = cadena transportadora de electrones mitocondrial; eNOS desacoplada = NOS endotelial desacoplada.

1.4. Proceso de cicatrización del corazón posterior al infarto: Papel del fibroblasto cardíaco

El tejido cardíaco está compuesto principalmente de cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso vascular, macrófagos, pericitos, entre otras, y su abundancia relativa varía según la especie, edad y género del organismo [4]. De acuerdo con el estudio realizado por Pinto AR y cols. [21], las células endoteliales y los cardiomiocitos son los tipos celulares más abundantes en los tejidos cardíacos de humano y de ratón adulto, mientras que los fibroblastos representan el tercer tipo celular de mayor proporción en el ventrículo de ratón adulto. La revisión de artículos científicos realizada por Tarbit E y cols. [22] señala que no se conocen marcadores celulares específicos para identificar a los fibroblastos, pero que entre los potenciales marcadores celulares más descritos se encuentran: *vimentina*, una proteína del citoesqueleto, pero que también identifica

positivamente a células endoteliales y macrófagos; *DDR2* (receptor con dominio discoidina 2), un receptor de colágeno de superficie celular que no está expresado en miocitos y células endoteliales; *Tcf21* (factor de transcripción 21), el cual también está expresado en células del sistema inmune (excepto aquellas células positivas para CD45); *PDGF- α* (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa), el cual también está expresado ampliamente en tejido mesenquimal durante el desarrollo embrionario; *α -SMA* (actina del musculo liso alfa) que es un marcador específico de miofibroblastos que no está presente en fibroblastos.

Los fibroblastos cardiacos se originan mayoritariamente de las células mesenquimales presentes en el epicardio durante el desarrollo cardiaco [23], aunque también hay evidencia que señala que pueden provenir de células madre progenitoras circulantes que son reclutadas en el miocardio ventricular durante la etapa postnatal [24]. El intersticio cardiaco contiene una gran población de fibroblastos cardiacos los cuales cumplen un papel importante en la preservación de la integridad estructural de la matriz extracelular (ECM) regulando el recambio de colágeno, un proceso que requiere de síntesis y degradación de proteínas en forma constante. En el corazón de un mamífero adulto, la ECM cumple las funciones de ser un marco estructural para los elementos celulares y de contribuir a la transmisión de la fuerza contráctil, y está compuesta predominantemente de colágenos fibrilares con un 85% de colágeno tipo I (asociadas a fibras gruesas que confieren resistencia a la extensión) y 10% de colágeno tipo III (asociadas a fibras delgadas que ayudan a mantener la elasticidad), ambos sintetizados y secretados como precursores o pro-colágenos por los fibroblastos y miofibroblastos. Además, la ECM cardiaca contiene glicosaminoglicanos, glicoproteínas y proteoglicanos, y contiene almacenadas proteasas y factores de crecimiento latentes como respuesta a un daño para desencadenar una respuesta de reparación [25]. Los fibroblastos cardiacos responden a una amplia variedad de estímulos mecánicos, eléctricos y bioquímicos contribuyendo al funcionamiento normal del ventrículo. Por ejemplo, los fibroblastos cardiacos secretan varios factores paracrinos que regulan las funciones de los cardiomiocitos, células endoteliales y células del sistema inmune. Además, forman interacciones célula-célula con cardiomiocitos y otros fibroblastos [4, 26].

Posterior a un IAM, se inician una serie de eventos fisiológicos que conducen a la reparación cardiaca. El fibroblasto cardiaco tiene una participación importante en cada una de las fases de la reparación cardiaca: a) durante la *fase inflamatoria* (duración de varios días), los fibroblastos son estimulados por diversos DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) que provienen del contenido intracelular liberado producto de la muerte celular masiva, provocando que estas células secreten una gran cantidad de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias para promover la infiltración de células del sistema inmune hacia la zona del infarto y así remover a las células muertas y el debris; b) en la *fase proliferativa* (duración de hasta 2 semanas), los fibroblastos activados migran al sitio del daño donde

prolifera, se diferencian a miofibroblastos (presentan fibras de estrés y expresan proteínas contráctiles como α -SMA) y secretan el colágeno que formará la cicatriz; c) la *fase de maduración* (duración de 1 o 2 meses) se alcanza cuando se ha terminado la formación de la cicatriz basada en colágeno y hay un entrecruzamiento de la matriz generada. En esta etapa, los miofibroblastos transitan hacia un estado quiescente (es decir, en fase G0 del ciclo celular y que pueden re-entrar a fase G1 ante un estímulo apropiado) y comienzan a reducir su número mediante apoptosis [5, 27].

1.5. Antecedentes preliminares de los efectos de la isquemia/reperfusión simulada sobre la capacidad funcional del fibroblasto cardiaco

Los efectos y las bases moleculares del daño por isquemia/reperfusión miocárdica han sido ampliamente estudiados en modelos *in vivo* de infarto cardiaco, modelos *ex vivo* de corazón aislado perfundido y modelos *in vitro* de cardiomiocitos [8, 19, 20, 28, 29]. Sin embargo, se sabe muy poco acerca del efecto que pueda tener la isquemia/reperfusión sobre la funcionalidad del fibroblasto cardiaco y cómo esto puede afectar al proceso de cicatrización. Hay trabajos científicos que establecieron modelos *in vitro* de hipoxia/reoxigenación en fibroblastos cardiacos, aunque difieren en ciertos aspectos como el origen de las células, métodos y condiciones [30, 31, 32, 33]. Vivar R y colabs. [32, 31] demostraron que la viabilidad de los fibroblastos cardiacos de ratas neonatas disminuyó proporcionalmente a la duración de la isquemia simulada. Por otro lado, al exponer a las células a 8 horas de isquemia simulada seguida de diferentes tiempos de reperfusión simulada, la viabilidad también disminuyó de manera proporcional, aunque en menor magnitud a la condición antes mencionada, y aumentó tanto la apoptosis como la necrosis según el tiempo de duración de la reperfusión simulada. Colston JT y colabs. [34] evaluaron los efectos directos del peróxido de hidrógeno sobre fibroblastos cardiacos de rata adulta macho, simulando el estrés oxidativo generado durante una isquemia/reperfusión miocárdica. Este estudio demostró que el estímulo con peróxido de hidrógeno redujo la migración inducida por fibronectina, aumentó la necrosis y no afectó la proliferación de las células, mientras que también se determinó la participación de las vías de p38 y quinasa regulada por señal extracelular (ERK) en dichos efectos. Otros estudios demostraron que la hipoxia e hipoxia/reoxigenación afectaron a la síntesis y secreción de colágeno tipo I en fibroblastos cardiacos de origen humano, de ratas adultas y de ratas neonatos [35, 36, 37].

1.6. Estrategias de cardioprotección para reducir el daño por isquemia/reperfusión cardiaca

Se han propuesto diversas estrategias para prevenir el daño por isquemia/reperfusión miocárdica las cuales se pueden dividir según su modalidad de protección (condicionamiento isquémico, protección farmacológica, intervención física con hipotermia o estimulación nerviosa eléctrica), su tiempo de aplicación (en la isquemia, al inicio de la reperfusión, o durante la reperfusión), el blanco celular (cardiomiocitos, células no miocitos u obstrucción microvascular, células circulantes), y el blanco intracelular (inhibición de las vías de muerte celular como apoptosis y necrosis, activación de vías de pro-sobrevivencia endógenas como RISK (quinasa de rescate de la lesión por reperfusión), SAFE (mejora del factor activador de sobrevivientes) y PKG (proteína quinasa G)) [38].

Las estrategias de cardioprotección basadas en el *condicionamiento isquémico* (aplicación controlada de breves episodios de isquemia y reperfusión coronaria) incluyen el pre-condicionamiento isquémico local (IPC), el post-condicionamiento isquémico local (IPost) y el condicionamiento isquémico remoto (RIC). Estas estrategias de condicionamiento isquémico comparten mecanismos moleculares y vías de señalización intracelulares similares, donde los ciclos cortos de isquemia/reperfusión estimularán la liberación de diversas moléculas (adenosina, bradiquinina, factores de crecimiento, neurohormonas, péptidos hormonales, moléculas lipídicas, citoquinas/quimioquinas), desde varios tipos de células cardíacas que, a su vez, estimularán a otras células para que de esta manera se activen cascadas de mediadores citosólicos de moléculas pequeñas y de enzimas (denominadas vías de pro-sobrevivencia como RISK, SAFE, NO/PKG), que convergerán en efectores subcelulares, principalmente la mitocondria, para así prevenir la muerte celular inducida por isquemia/reperfusión [39].

No obstante, IPC y RIC son tratamientos aplicados durante el periodo de isquemia, es decir, antes de que los pacientes con STEMI sean expuestos a procedimientos para llevar a cabo la reperfusión coronaria y, por lo tanto, tienen la gran desventaja de que, al ser administradas primero, retardan la reperfusión por ACPP. Por otro lado, el IPost y el *post-condicionamiento farmacológico* son tratamientos que se pueden aplicar en conjunto con la ACPP, protegiendo al miocardio del daño por reperfusión durante los primeros minutos (que es donde ocurre la mayor cantidad de muerte celular) [38]. Los mecanismos de acción de algunos de los agentes farmacológicos utilizados para prevenir el daño por reperfusión miocárdica en pacientes con STEMI expuestos a ACPP se relacionan con la capacidad de modular la vía RISK y/o preservar la función mitocondrial [7]. Entre estos, llaman la atención las investigaciones realizadas en modelos *in vivo* de infarto cardíaco donde el pre-tratamiento con LPS (lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas), un conocido ligando externo específico del TLR4 (receptor de tipo Toll 4), 24 horas antes de realizar la isquemia/reperfusión, redujo

el tamaño de infarto, y marcadores de apoptosis, inflamación y estrés oxidativo, a través de la activación de la vía PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa)-Akt (una quinasa de serina/treonina conocida también como proteína quinasa B o PKB) y de la inhibición de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) mediada por aumento de HSP70 (proteína de choque térmico 70) [40, 41].

Por último, es importante señalar que las revisiones realizadas a las publicaciones de diversos ensayos clínicos en pacientes con STEMI expuestos a ACPP, donde se probaron diversas estrategias de cardioprotección para prevenir el daño por reperfusión, muestran resultados tanto positivos como negativos. Además, se requieren ensayos clínicos Fase III con un mayor número de pacientes (que consideren sus características, comorbilidades, etc.) y *end-points* clínicos importantes que aseguren la robustez de los resultados obtenidos y permitan una clara demostración de algún beneficio clínico [7, 10, 42].

1.6.1. RISK y otras vías de pro-sobrevida importantes

La vía RISK fue descrita por primera vez por el grupo de Yellon DM en 2002 mientras intentaban dilucidar los mecanismos relacionados al efecto cardioprotector inducido por urocortina (neuropéptido que activa los receptores de la hormona liberadora de corticotropina o CRH) [43], y consiste en la activación temprana (fosforilación) y en forma aguda de 2 cascadas paralelas con proteínas quinasas de pro-sobrevida al inicio de la reperfusión para conferir cardioprotección: i) PI3K/Akt, y ii) MEK1 (MAPK/ERK quinasa, una proteína quinasa quinasa activada por mitógenos o MAPKK)-ERK1/2 (subunidades p44 y p42 de ERK) [44]. El punto de convergencia río abajo propuesto para las vías PI3K/Akt y MEK1/ERK1/2 es GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β), el cual es fosforilado e inactivado, resultando en una modulación del balance de los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 en favor de los elementos anti-apoptóticos para así inhibir la apertura del MPTP al conferir mayor resistencia a la mitocondria al daño por estrés oxidativo [45]. La vía RISK es considerada una cascada de señalización universal, o vía común, compartida por la mayoría de las terapias cardioprotectoras ya sea a través de condicionamiento isquémico o con agentes farmacológicos [44].

Se han sugerido otras cascadas de señalización que mediarían el efecto protector inducido por el condicionamiento isquémico o ciertos agentes farmacológicos de manera independiente a la vía RISK. La vía SAFE está conformada por la activación del receptor subtipo 2 de TNF- α , incluyendo a la citoquina TNF- α como ligando, que activa río abajo al factor de transcripción STAT3 (transductor de

señal y activador de la transcripción 3), el cual regula positivamente la transcripción a largo plazo de proteínas cardioprotectoras y mejora la respiración mitocondrial a corto plazo, atenuando la apoptosis [39]. Por otro lado, el sistema NO/PKG consiste en la activación de receptores acoplados a proteína G que, mediante PI3K/Akt, activan a la NOS endotelial para que produzca NO el cual induce la formación de GMPc (guanosín monofosfato cíclico). Este último activa a PKG cuyo blanco aparentemente es el canal de potasio dependiente de ATP mitocondrial, favoreciendo la formación de ROS, y la proteína intercambiadora de protón-sodio que retarda la normalización de la acidosis [39].

1.7. Uso de antioxidantes para prevenir el daño por isquemia/reperfusión cardiaca

Dada la importancia del estrés oxidativo en la fisiopatología del daño por reperfusión cardiaco, se han estudiado y utilizado diversos agentes farmacológicos con actividad antioxidante en pacientes con STEMI expuestos a ACP, pero los resultados de distintos ensayos clínicos de menor escala han sido variados y, en consecuencia, no se ha podido concluir la eficacia clínica de la terapia antioxidante como cardioprotectora [12, 46]. Se han propuesto diversas razones para explicar la falta de eficacia clínica en el uso de los de los antioxidantes para prevenir el daño por reperfusión miocárdica las cuales se relacionan con una dosificación subóptima, cantidad de antioxidantes insuficientes para inhibir los altos niveles de estrés oxidativo y los diversos mecanismos de generación ROS, deficiencias en el diseño del estudio o en la metodología empleada, entre otros [46]. Además, está ampliamente descrito que las ROS a bajos niveles participan de la señalización intracelular normal, en la inducción de vías de protección mitocondrial (factor inducible por hipoxia 1 alfa o HIF-1 α ; factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 o Nrf2), y en los mecanismos de cardioprotección del condicionamiento isquémico, mientras que altos niveles de ROS se consideran como deletéreos y que pueden conducir a muerte celular, por lo que son situaciones a considerar en la utilización y eficacia de la suplementación con antioxidantes [47].

1.7.1. Uso de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, solos o asociados, para prevenir el daño por isquemia/reperfusión miocárdica

Entre los antioxidantes utilizados para prevenir el daño por isquemia/reperfusión miocárdica se encuentran el ácido ascórbico (ASC), la deferoxamina (DFO) y la N-acetilcisteína (NAC). Los 3 agentes farmacológicos han demostrado prevenir el daño por reperfusión en diferentes modelos experimentales de estudio, y su amplia experiencia clínica como tratamiento para ciertas patologías, así como el gran conocimiento acerca de sus perfiles de seguridad y eficacia, han facilitado que se utilicen en ensayos

clínicos para evaluarlos como posibles terapias cardioprotectoras en pacientes con STEMI bajo indicación de ACPP.

El ASC es un atrapador de radicales libres (ej. anión superóxido, radical hidroxilo), el cual ha demostrado proteger a cardiomiocitos expuestos a condiciones de isquemia/reperfusión simulada (I/Rs), y reducir el daño por isquemia/reperfusión en modelos animales *ex vivo* de corazón aislado reperfundido e *in vivo* de infarto cardiaco [48, 49, 50, 51]. Respecto a ensayos clínicos, la administración de ASC como infusión intravenosa también ha mostrado resultados favorables reduciendo el daño por reperfusión miocárdico y los marcadores de estrés oxidativo, y mejorando la microcirculación en pacientes de elección para ACPP [52, 53, 54]. Además, la revisión realizada por Spoelstra-de Man AME y colabs. [55] señala que, en base a la gran cantidad de evidencia que hay en la literatura, la administración en forma temprana de altas dosis de vitamina C intravenosa cuando ocurre un arresto cardiaco es una intervención terapéutica prometedora para disminuir el daño por isquemia/reperfusión sistémica provocado por sobreproducción de estrés oxidativo.

La DFO es un quelante de hierro utilizado como tratamiento para niveles altos de hierro en la sangre debido a condiciones patológicas como la Talasemia [56]. Los antecedentes de la DFO como posible fármaco cardioprotector se remontan a experimentos de los años 90 en modelos de Langendorff de isquemia/reperfusión en corazón aislado donde se demostró que mejoró la capacidad funcional ventricular y redujo la producción de ROS [57, 58, 59]. Además, en un modelo de corazón aislado reperfundido de rata sometido a cardioplegia fría (isquemia) y reperfusión, fue capaz de reducir la apoptosis, y mejorar el gasto cardiaco [60]. En modelos *in vivo*, la administración de DFO en perros previa a la oclusión coronaria, pero no al momento de la reperfusión, redujo significativamente la extensión de la necrosis miocárdica comparado al grupo control [61, 62], mientras que la retroinfusión coronaria venosa de DFO previo a la reperfusión redujo significativamente el tamaño del infarto [63]. En cuanto a ensayos clínicos, en un estudio realizado en pacientes con indicación de cirugía de revascularización coronaria, la infusión de DFO redujo parámetros de producción de ROS y protegió el miocardio contra el daño por reperfusión [64].

La NAC es un fármaco que posee grupos sulfhidrilos y que, al ser desacetilado, genera al aminoácido L-cisteína que es un precursor de glutatión reducido (GSH), una molécula antioxidante endógena. NAC ha demostrado características como cardioprotector al prevenir el daño por reperfusión en cardiomiocitos expuestos a I/Rs, en modelos *ex vivo* de corazón aislado reperfundido y en modelos *in vivo* de infarto cardiaco [65, 66]. Además, NAC se ha utilizado en asociación con otros agentes farmacológicos obteniendo resultados muy favorables en cuanto a reducción del daño por isquemia/reperfusión miocárdica tanto en cardiomiocitos como en modelos animales [67, 68, 69]. No

obstante, su utilización en ensayos clínicos para reducir el daño por reperfusión en pacientes con indicación de ACPP han sido dispares. El estudio realizado por Nozari Y y colabs. [70] demostró que pacientes con STEMI bajo indicación de ACPP que recibieron administración de NAC en forma de bolus más infusiones intravenosas durante la reperfusión tuvieron menores niveles de marcadores de daño cardíaco y mejoraron los parámetros de circulación coronaria. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Thiele H y colabs. [71] se señala que la administración de altas dosis de NAC en forma intravenosa redujo el estrés oxidativo, pero no tuvo un efecto clínico adicional comparado al placebo con respecto a la nefropatía inducida por contraste y al daño por reperfusión miocárdica en pacientes con indicación de ACPP, con dosis moderadas de medio de contraste, e hidratación óptima.

A pesar de los antecedentes señalados, aún no ha sido posible una traslación apropiada de los resultados obtenidos en modelos *in vitro* e *in vivo* hacia la intervención clínica debido a las diversas razones antes mencionadas. Existen grupos de investigación que proponen el uso combinado de estrategias de cardioprotección para contrarrestar de manera más efectiva los diferentes mecanismos de muerte celular y los efectos deletéreos del daño por isquemia/reperfusión miocárdica [38], y en este sentido existen pocos antecedentes de estudios *in vivo* que hayan utilizado combinaciones de ASC, DFO y NAC que mostrasen resultados alentadores. Un estudio realizado por Phaelante A y colabs. [72] en modelo experimental de infarto cardíaco con ratas Wistar demostró que la administración de la asociación entre NAC y DFO mejoró la función cardíaca ventricular y redujo marcadores de estrés oxidativo luego de 28 días. El grupo de Karahaliou A y colabs. demostró que la asociación entre ASC y DFO protegió contra arritmias provocadas por isquemia/reperfusión miocárdica o por elevación de la presión arterial en ovejas [73], mientras que el grupo de Chatziathanasiou GN y colabs. [74] no logró probar cardioprotección con la asociación entre ASC y DFO en cerdos. Un estudio realizado por Gao F y colabs. [75] demostró que la asociación entre ASC y glutatión monoetil ester fue más efectiva que cada uno por separado en proteger un corazón aislado reperfundido de rata. Nikas DN y colabs. [76] realizaron un estudio donde se administraron conjuntamente ASC, DFO y NAC, cada uno en una dosis específica, y no redujeron los efectos deletéreos del daño por reperfusión.

Es importante destacar que el uso de asociaciones entre ASC, DFO y NAC para prevenir el daño por reperfusión miocárdica ha sido muy poco estudiado, y es un concepto que presenta más de una ventaja ya que, por un lado, el ASC puede interactuar farmacológicamente de manera favorable con DFO y NAC lo que permite un mayor reforzamiento antioxidante a nivel celular frente al estrés oxidativo generado por distintas fuentes durante la reperfusión miocárdica [77]: a) el dehidroascorbato oxidado puede ser reducido a ascorbato (la forma ionizada de ASC) por GSH intracelular, incrementando la biodisponibilidad de ascorbato para interactuar contra las ROS (ej. anión superóxido, radical hidroxilo) [78]; b) La disminución en los niveles de GSH intracelulares son suplementados por NAC; c)

DFO ejercería su efecto quelante sobre el exceso de hierro lábil libre catalítico (el cual incrementa durante la isquemia y la reperfusión cardiaca debido a la lisis celular), disminuyendo la producción de radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton, y previniendo la interacción pro-oxidante ASC-hierro [79]. Por otro lado, la utilización de más de un agente antioxidante permitiría disminuir la dosis de administración individual de cada uno de ellos para así disminuir los riesgos de posibles efectos adversos no deseados.

1.7.2. Daño por isquemia/reperfusión simulada en la capacidad funcional de los fibroblastos cardíacos y posible efecto citoprotector de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína

Como se mencionó anteriormente, el fibroblasto cardíaco cumple un papel de suma importancia en los procesos de inflamación y cicatrización posterior a un infarto cardíaco, pero hay antecedentes que señalarían que la isquemia y la reperfusión tendrían efectos nocivos sobre la viabilidad y la capacidad funcional de este tipo celular, lo que podría afectar negativamente los procesos de reparación posteriores al daño por reperfusión miocárdica.

Los estudios de Vivar R y colabs. [31, 32] muestran que el daño por I/Rs en fibroblastos cardíacos puede ser prevenido al utilizar IGF-1 (Factor de crecimiento insulínico tipo 1) y TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1) ya que activarían mecanismos antiapoptóticos y la vía de sobrevida RISK. No obstante, no se ha explorado el uso clínico de IGF-1 y TGF- β 1 como posibles fármacos cardioprotectores debido a que no se han estudiado lo suficiente sus características farmacológicas, sus perfiles de eficacia y seguridad, así como su estabilidad en la administración, dosificación, costos, entre otras desventajas.

Respecto a esto último, ASC, DFO y NAC cuentan con muchos más estudios y proyecciones en el uso clínico debido a sus numerosos estudios para prevenir el daño por reperfusión miocárdico, en forma separada o asociados en forma dual. No obstante, la asociación triple de estos agentes antioxidantes no ha sido explorada y representa una novedosa estrategia farmacológica en cardioprotección debido a las ventajas que suponen las interacciones farmacológicas favorables entre ellos para reforzar las defensas antioxidantes frente al estrés oxidativo y a la utilización de bajas cantidades de cada antioxidante que podrían llevar a menores efectos adversos [77].

A partir de lo anterior, surge la necesidad de estudiar el posible efecto citoprotector de la asociación de ASC, DFO y NAC (A/D/N) utilizando la menor concentración posible de cada agente antioxidante que en su conjunto generen el mayor efecto farmacológico benéfico. La propuesta es buscar

un sinergismo entre los distintos antioxidantes para prevenir el daño por I/Rs en fibroblastos cardiacos, tanto en la viabilidad como en la capacidad funcional relacionada a reparación tisular. Además, sería interesante describir el efecto de A/D/N sobre el estrés oxidativo, los mecanismos moleculares de muerte celular (apoptosis, necrosis) más descritos, y las posibles vías de señalización que podrían participar.

A partir de lo anterior expuesto, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

2. HIPÓTESIS

“La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína previene la muerte celular y mejora la función celular asociada a la reparación tisular en fibroblastos cardiacos en cultivo expuestos a condiciones simuladas de isquemia/reperfusión”.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que en un modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión en fibroblastos cardiacos, la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína previene la pérdida de viabilidad asociada a una activación de las vías de supervivencia ERK1/2 y Akt, una inhibición de mecanismos pro-apoptóticos y una reducción en la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno, lo que consecuentemente mejora la migración, la diferenciación y la síntesis de pro-colágeno tipo I inducidas por estímulo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1.** Determinar una asociación farmacológica óptima de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína a partir de su efecto citoprotector dependiente de la concentración sobre la viabilidad de los fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.
- 4.2.** Determinar si la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína reduce la muerte celular por necrosis y por apoptosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardíacos.
- 4.3.** Determinar si en los fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína reduce la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno, activa las vías de supervivencia ERK1/2 y Akt, inactiva las vías pro-apoptóticas p38 y JNK, reduce las fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3, y aumenta la razón Bcl-xl/Bax.
- 4.4.** Determinar si en los fibroblastos cardíacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumenta la migración inducida por suero, aumenta la diferenciación inducida por TGF- β 1, y aumenta la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos y materiales

DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium F12; No 12500062), resazurina (reactivo alamarBlue™; No DAL1100), y colagenasa tipo II en polvo (No 17101015) fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Suero fetal bovino (FBS; No 04-001-1A), solución de tripsina ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.5%), EDTA 0.2% (10X) (No 03-051-5B), solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B (No 03-033-1B), y solución de azul de tripán (0.5%) (No 03-102-1B) fueron obtenidos de Biological Industries (Cromwell, Connecticut, Estados Unidos). El TGF-beta 1 recombinante humana (TGF-β1; No 240-B) fue obtenido de R&D Systems, Inc (Minneapolis, Estados Unidos). El Pascorbin (botella para infusión de vitamina C o ácido ascórbico) fue obtenido de Pascoe Naturmedizin (Giessen, Alemania). Medio M199 (No M2520), pancreatina de páncreas porcina (No P3292), ARNasa A (No 10109142001), yoduro de propidio (No P4170), reactivo de Bradford (No B6916), tampón RIPA para extracción y lisis celular (No 89900), coctel de inhibidores de proteasas Halt™ (100X, No 78438), coctel de inhibidores de fosfatasas Halt™ (No 78427), reactivo de detección para Western blot ECL™ (No GERPN2209), deferoxamina mesilato (No D9533), N-acetil-L-cisteína (No A7250), 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA; No D6883), 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; No B5002), angiotensina II humana (No A9525), y cristal violeta (No C0775) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Todos los productos de sales inorgánicas y de metanol (No 106035) fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). El estándar de proteínas pre-teñido con peso molecular amplio (10-245 kDa) (No ab116028) fue obtenido de Abcam (Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos). El cilindro de nitrógeno gas (N₂) fue obtenido de Linde Group (Santiago, Chile). Los anticuerpos primarios para fosfo-p44/p42 (p-ERK1/2, No 9101), p44/p42 (ERK1/2, No 9102), fosfo-Akt (p-Akt, No 9271), Akt (No. 9272), fosfo-p38 (p-p38, No 9211), p38 (No 9212), fosfo-JNK (p-JNK, No 9251), JNK (JNK, No 9252), pro-caspasa 3 (No 9662), pro-caspasa 9 (No 9508), Bax (No 2772), Bcl-xl (No 2764), α-SMA (No 19245), colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1; No 84336), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; No 5174), y los anticuerpos secundarios para anti-conejo IgG (No 7074) y anti-ratón IgG (No 7076) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) fueron obtenidos de Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, Estados Unidos). Todos los materiales plásticos fueron obtenidos de Corning Incorporated (Corning, New York, Estados Unidos).

5.2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos de ratas neonatos

Los fibroblastos cardiacos fueron aislados de los ventrículos de ratas neonatas Sprague-Dawley (1-3 días de vida) según como está descrito previamente [31]. En una zona estéril, las ratas fueron decapitadas y se les extrajeron los corazones en forma rápida. Después de remover las aurículas, los ventrículos fueron picados y colocados en una solución de digestión con colagenasa (0,05% p/v) y pancreatina (0,05% p/v). Posteriormente, el producto de la digestión fue pre-plaqueado en placas plásticas de 100 mm, utilizando medio DMEM-F12/M199 (4:1) conteniendo FBS (10%) y penicilina-estreptomicina-anfotericina B, y estas se mantuvieron en una incubadora con O₂ (95%) y CO₂ (5%) a 37 °C. Los fibroblastos cardiacos se adhieren al plástico a diferencia de los cardiomiocitos, permitiendo su separación. Luego de 3 horas, los fibroblastos fueron lavados 3 veces con tampón fosfato salino estéril (PBS), se repuso el medio de cultivo y se dejaron proliferar hasta confluencia en una incubadora por 3-5 días. Se utilizó DMEM-F12 contenido FBS (3%) y penicilina-estreptomicina-anfotericina B como medio de mantención. Los pasajes celulares se realizaron con tripsina EDTA (0.5%), EDTA 0.2% (1X) seguido de inhibición de su actividad proteasa con DMEM-F12 conteniendo FBS (10%), hasta un máximo de 2 pasajes. Los fibroblastos cardiacos fueron recolectados y sembrados sobre placas plásticas (dependiendo del tipo de experimento) en medio DMEM-F12 sin FBS por 24 horas antes de los experimentos.

5.3. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatos

Los cardiomiocitos fueron aislados de los ventrículos de ratas neonatas Sprague-Dawley (1-3 días de vida) según como está descrito previamente [80]. Después de la digestión enzimática del miocardio con colagenasa (0,02% p/v) y pancreatina (0,06 % p/v), las células fueron pre-plaqueadas para descartar las células no-miocitos y la fracción enriquecida con miocitos fue plaqueada sobre placas de 35 mm pre-cubiertas con gelatina, en medio DMEM/M199 (4:1) con FBS (10%) y 100 mM de BrdU por 24 horas antes de los experimentos.

5.4. Protocolo de isquemia/reperfusión simulada y tratamiento antioxidante

El protocolo empleado se modificó de Vivar R. y colabs [31]. Luego de 24 horas de privación de suero, los fibroblastos cardiacos fueron lavados 2 veces con PBS antes de la I/Rs. El medio de cultivo fue reemplazado por un medio isquémico (pH = 6,2) el cual contenía: HEPES (25 mM, ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), NaCl (115 mM), KCl (12 mM), MgCl₂•6H₂O (1,2 mM), CaCl₂•2H₂O (2 mM) y ácido láctico (20 mM). A continuación, estas células fueron expuestas a una

condición de hipoxia al colocarlas dentro de una cámara sellada (STEMCELL Technologies Inc, Vancouver, Canadá) con ambiente de $< 1\% \text{ O}_2$ y $99\% \text{ N}_2$ a 37°C por 6 horas. Al término de este tiempo, se llevó a cabo la reperfusión simulada cambiando el medio isquémico por DMEM-F12 y colocando a los fibroblastos cardiacos en una incubadora con O_2 (95%) y CO_2 (5%) a 37°C por 16 horas. Al inicio de la reperfusión simulada, las células fueron tratadas con ASC, DFO o NAC en forma separada a 10000, 1000, 100, 10 and $1 \mu\text{M}$ cada uno para estudios preliminares de viabilidad. Posteriormente, los antioxidantes fueron administrados en diferentes combinaciones a 10 o $1 \mu\text{M}$ cada uno. Por último, la asociación A/D/N fue agregada utilizando $10 \mu\text{M}$ de cada antioxidante, y el tiempo de duración de la reperfusión simulada fue variable según el experimento. Las células control fueron incubadas bajo condiciones de normoxia en medio DMEM-F12 y mantenidas en una incubadora con O_2 (95%) y CO_2 (5%) a 37°C por el tiempo exacto de duración de la isquemia simulada y los experimentos de I/Rs (Figura 3).

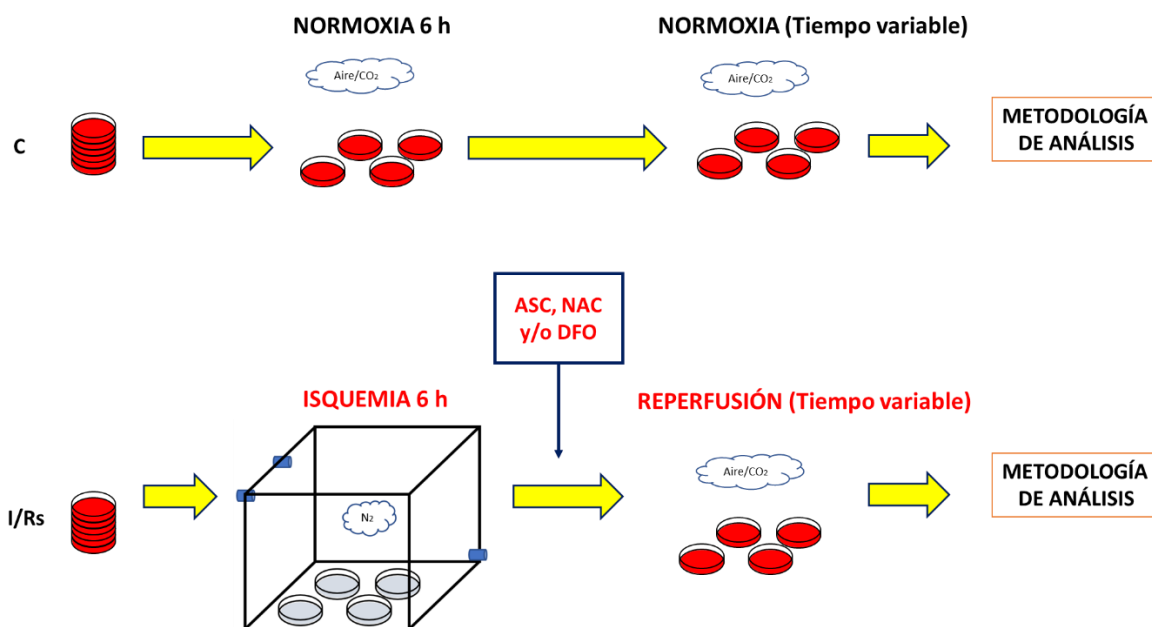


Figura 3. Esquema representativo del protocolo de isquemia/reperfusión simulada empleado en los fibroblastos cardiacos. En primer lugar, las células se incubaron en medio isquémico con ambiente de nitrógeno carente de oxígeno dentro de una cámara sellada por 6 horas, para luego llevar a cabo la reperfusión simulada con un cambio de medio por DMEM-F12 en ambiente oxigenado. Los controles se realizaron manteniendo a las células en DMEM-F12 y ambiente oxigenado en paralelo a los experimentos. Los antioxidantes se aplicaron al inicio de la reperfusión. C = control; I/Rs = isquemia/reperfusión simulada; ASC = ácido ascórbico; DFO = deferoxamina; NAC = N-acetilcisteína.

5.5. Determinación de la viabilidad celular por conteo celular

Los fibroblastos cardiacos fueron sembrados en placas de 35 mm a una densidad de 156 células/mm² para medir viabilidad utilizando tinción con azul de tripán (0,5%). Después de 16 horas de reperusión simulada, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y tratadas con tripsina EDTA (0.5%), EDTA 0.2% (1X) para soltarlas, seguidas de una administración de FBS (10%) para inducir la inactivación de esta proteasa. Después de recolectar las células, se mezcló una alícuota de 20 µl de muestra más 20 µl de azul de tripán (0,5%), y luego se transfirieron 8 µl de este homogenizado a una cámara de Neubauer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Alemania) para contar células vivas (no teñidas) usando microscopio óptico (Figura 4). La viabilidad celular fue cuantificada como un porcentaje (%) del número de células después de 6 horas de normoxia. Se contó un mínimo de 1000 células/ml en cada muestra.

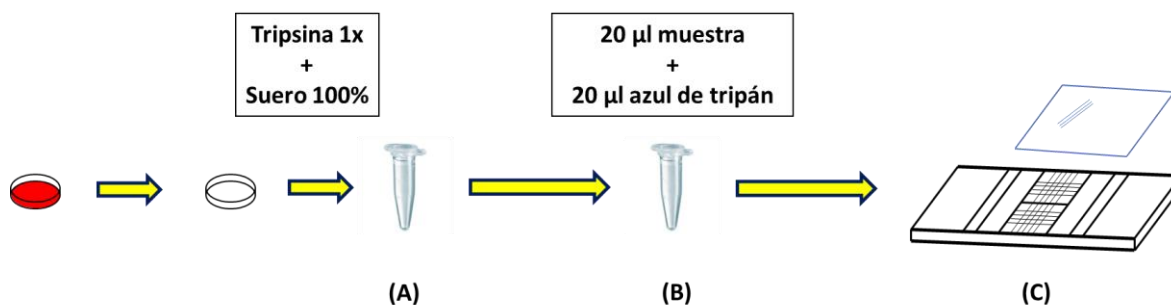


Figura 4. Esquema representativo del protocolo de conteo celular con azul de tripán. Se extrajeron 20 µl de la muestra con células recolectadas del tubo (A) y se mezclaron con 20 µl de azul de tripán en el tubo (B). De este último, se extrajo una alícuota que se colocó en la cámara de Neubauer (C) y se procedió al conteo celular en microscopio óptico.

5.6. Determinación de la viabilidad celular por ensayo de reducción de resazurina

Los fibroblastos cardiacos fueron sembrados en placas de 24 pocillos de fondo transparente a una densidad de 263 células/mm². Después de 16 horas de reperfusión simulada, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM-F12, seguido por incubación con resazurina (10%) por 4 horas en oscuridad. Las células vivas con metabolismo activo pueden reducir la resazurina no fluorescente a resorufina fluorescente. La fluorescencia fue medida a 585 nm (λ excitación) y 570 nm (λ emisión) en un lector de microplacas multimodo BioTek™ Synergy™ 2 (BioTek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, Estados Unidos) (Figura 5).

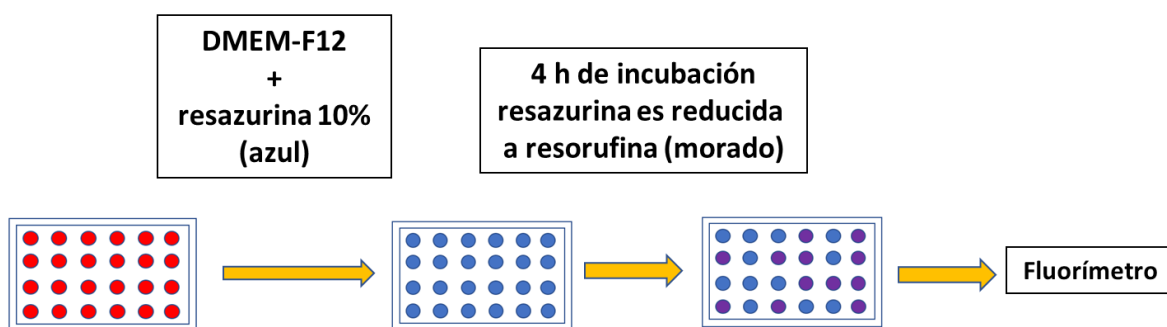


Figura 5. Esquema representativo del protocolo para determinación de la viabilidad celular por ensayo de reducción de resazurina. Al término de la reperfusión simulada, se realizó la incubación en oscuridad de las células con resazurina (10%) por 4 horas, tras lo cual se leyó la intensidad de fluorescencia del producto resorufina en un fluorímetro.

5.7. Determinación de la producción de ROS intracelular

Los fibroblastos cardiacos fueron sembrados en placas de 24 pocillos de fondo transparente a una densidad de 421 células/mm². DCFH-DA es una sonda permeable no fluorescente a la membrana celular, la cual es desesterificada intracelularmente y es oxidada a 2',7'-diclorofluoresceína fluorescente. Al término de las 6 horas de la isquemia, las células fueron incubadas con DCFH-DA (20 μ M) disuelto en medio isquémico fresco por 45 minutos a 37 °C. Rápidamente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, y se agregó DMEM-F12, con o sin la adición de los antioxidantes. La intensidad de fluorescencia fue medida a 485 nm (λ excitación) y 535 nm (λ emisión) en un lector de microplacas multimodo BioTek™ Synergy™ 2 (BioTek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

5.8. Determinación de necrosis por citometría de flujo

Los fibroblastos cardiacos fueron sembrados en placas de 60 mm a una densidad de 106 células/mm². Después de 16 horas de reperfusión simulada, las células muertas fueron recolectadas desde el medio, centrifugadas a 252x g por 5 minutos y mantenidas a 4 °C. Las células vivas en las placas fueron soltadas utilizando tripsina EDTA (0.5%), EDTA 0.2% (1X), y esta se inactivó utilizando FBS (10%). Las células vivas fueron mezcladas con las células muertas y se les agregaron yoduro de propidio (1mg/ml). Finalmente, las células muertas por necrosis fueron detectadas por citometría de flujo en un equipo BD FACSCantoA (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey, Estados Unidos). Esta técnica se basa en que al agregar yoduro de propidio (impermeable a la membrana celular de las células vivas) al medio, este se intercala en los ácidos nucleicos de las células necróticas debido a que pierden la integridad y continuidad de sus membranas, y se aprecia la aparición de una población celular con un aumento evidente de la fluorescencia a alta intensidad (Figura 6). Se analizaron en total 5000 células/muestra.

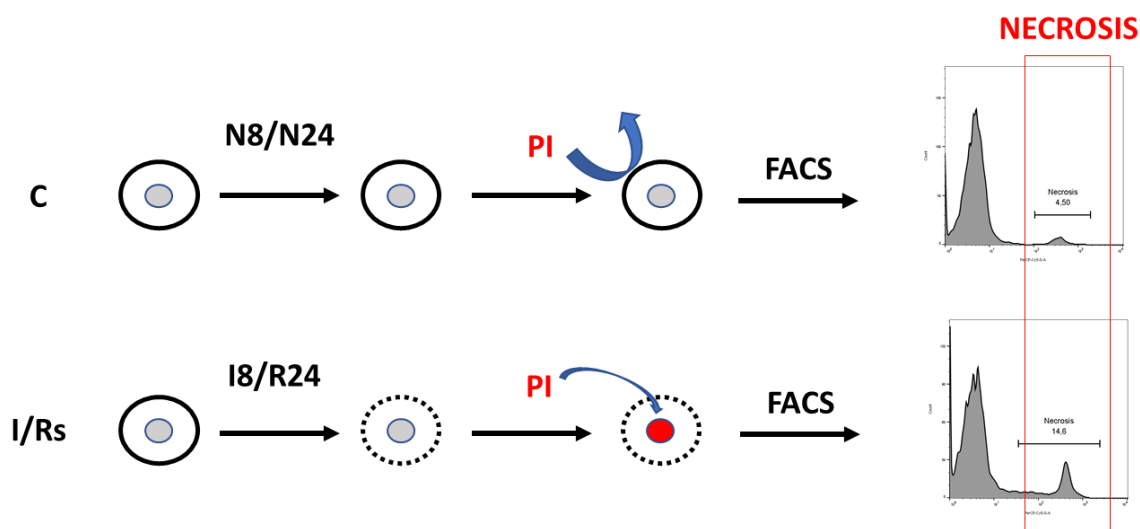


Figura 6. Esquema representativo de la metodología empleada para la determinación de necrosis. Al término de la reperfusión simulada, se evaluó la integridad de la membrana celular de los fibroblastos cardiacos utilizando yoduro de propidio (PI) y se midió la fluorescencia por citometría de flujo (a menor integridad de membrana, mayor fluorescencia y con ello mayor necrosis). C = control; I/Rs = isquemia/reperfusión simulada.

5.9. Determinación de apoptosis por citometría de flujo

Los fibroblastos cardiacos fueron sembrados en placas de 60 mm a una densidad de 106 células/mm². Después de 16 horas de reperfusión simulada, las células vivas y muertas fueron recolectadas según el protocolo de la sección 5.8. A continuación, para permeabilizar las membranas celulares se agregó metanol frío a la mezcla de células vivas y muertas por 24 horas a -20 °C. Luego se agregó ARNasa (0,1 mg/ml) a las muestras por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó yoduro de propidio (1 mg/ml) a las células y la apoptosis se determinó por citometría de flujo usando un equipo BD FACSCantoA (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey, Estados Unidos). Esta técnica es una adaptación de la utilizada para la cuantificación de las poblaciones G1, S y G2 del ciclo celular, y se basa en que en el yoduro de propidio se incorpora a la cromatina de células vivas y de células apoptóticas, pero estas tienen intensidades de fluorescencia diferentes ya que las células apoptóticas condensan su cromatina y/o poseen ADN fragmentado lo que provoca que incorporen menor cantidad de yoduro de propidio, por lo que aparece una señal de intensidad de baja (población sub-G1) por debajo de la prominente señal G1 de células vivas con ADN íntegro (Figura 7). Se analizaron en total 5000 células/muestra.

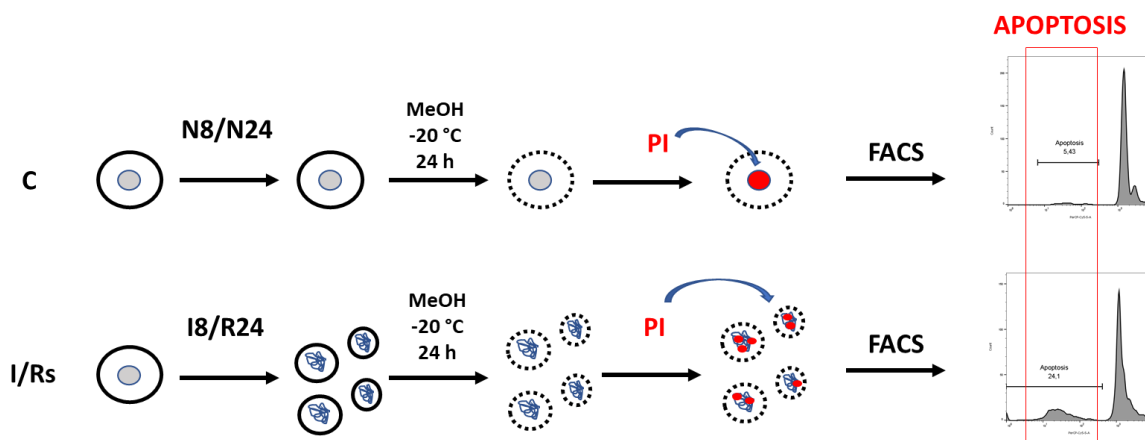


Figura 7. Esquema representativo de la metodología empleada para la determinación de apoptosis. Al término de la reperfusión simulada, los fibroblastos cardiacos fueron incubados en metanol para permeabilizar sus membranas celulares. Tras ello, se evaluó el estado de condensación de la cromatina mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI) y se midió la fluorescencia por citometría de flujo (a mayor condensación, menor fluorescencia y con ello mayor apoptosis). C = control; I/Rs = ischemia/reperfusión simulada.

5.10. Western blot

5.10.1. Preparación de extractos de proteínas totales

Para el análisis de los niveles de proteínas, los fibroblastos cardiacos fueron sembrados en placas de 60 mm con una densidad de 106 células/mm², y se utilizaron diferentes tiempos de reperfusión simulada según el tipo de proteína:

- a) 10 minutos de reperfusión simulada: proteínas fosforiladas (p-ERK1/2, p-Akt, p-p38, p-JNK).
- b) 16 horas de reperfusión simulada: proteínas relacionadas con apoptosis (pro-caspasa 3, pro-caspasa 9, Bax, Bcl-xl).
- c) 48 horas de reperfusión simulada: proteínas relacionadas con diferenciación y actividad pro-fibrótica (α -SMA, COL1A1).

Al final de la reperfusión simulada, las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío, seguido de la adición de tampón de lisis celular RIPA con inhibidores de fosfatasas y proteasas. Las muestras fueron centrifugadas a 252x g por 10 minutos a 4 °C, y se recolectaron los sobrenadantes. Se utilizaron 5 μ l de cada muestra para determinar la concentración de proteínas totales utilizando el reactivo de Bradford, y la absorbancia fue medida a 595 nm en un espectrofotómetro UV-visible Epoch (BioTek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, Estados Unidos). Se agregó tampón de carga 4X (glicerol 32%, β -mercaptoetanol 20%, SDS 9,2%, Tris base 250 mM pH 6,8, y azul de bromofenol 0,02%) al resto de la muestra y esta fue denaturada calentando a 100 °C durante 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

5.10.2. Electroforesis de geles de poliacrilamida

La separación y resolución de las proteínas de acuerdo a su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución al 30% de acrilamida:bisacrilamida (A/BA). Los geles se cargaron con 25 μ g de extracto proteico. Los geles concentradores fueron de 5% de A/BA y los geles separadores fueron de 20% o 10% de A/BA según el peso molecular de la proteína de interés. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 70 V en tampón de electroforesis durante 30 minutos y luego de 100 V durante 1,5 horas aproximadamente, o de 70 V durante 2 horas según el tipo de proteína en particular.

5.10.3. Electrotransferencia

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ M de poro durante 60 o 90 minutos según la proteína de interés, a una corriente constante de 0,35 A en tampón de transferencia.

5.10.4. Inmunodetección de proteínas

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas fueron bloqueadas con leche descremada al (5% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y, posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4 °C y agitación suave. Las diluciones de los anticuerpos se presentan a continuación:

Anticuerpo	Dilución
p-ERK1/2 y ERK1/2	1:1000
p-Akt y Akt	1:1000
p-p38 y p38	1:1000
p-JNK y JNK	1:1000
Pro-caspasa 3	1:1000
Pro-caspasa 9	1:1000
Bax	1:1000
Bcl-xl	1:1000
α -SMA	1:1000
COL1A1	1:1000
GAPDH	1:2000
Secundario anti-ratón	1:5000
Secundario anti-conejo	1:5000

Posteriormente, las membranas se lavaron durante 15 minutos en TBS (1X)/Tween-20 al 0,1% y se procedieron a incubar con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o ratón conjugado con HRP, en tampón de bloqueo TBS (1X)/Tween-20 al 0,1%, durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron con el reactivo ECL durante 5 minutos

en oscuridad y a temperatura ambiente, y se revelaron en el escáner para Western blot quimioluminiscente C-DiGit (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas en el programa Image Studio™ (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos).

5.11. Evaluación de la migración celular por ensayo de cierre de la herida

Los fibroblastos cardíacos fueron sembrados en placas de 35 mm a una densidad de 156 células/mm² y en medio DMEM-F12 conteniendo FBS (10%) y penicilina-estreptomocina-anfotericina B para que proliferasen por 24 horas hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas con DMEM-F12 por 24 horas. Pasado este tiempo, se realizó la isquemia simulada por 6 horas, seguido de una herida hecha con una punta de 200 µl sobre la monocapa de fibroblastos cardíacos al comienzo de la reperfusión simulada. Se utilizó BrdU (100 µM) como un inhibidor de la proliferación, permitiendo a los fibroblastos cardíacos migrar sin proliferar en presencia de FBS (10%). Luego de 24 horas, las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta (0,3% p/v) por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar y secar las placas, se tomaron imágenes de 4 campos por placa usando un microscopio óptico. El área de la herida por imagen fue analizada con el programa ImageJ (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos), y el promedio de los 4 campos de las áreas de las heridas fue usado para el análisis de los datos. Todos los valores de área de la herida promedio fueron normalizados con respecto al valor del área de la herida promedio de los grupos control con células incubadas en DMEM-F12.

5.12. Protocolo para inducir diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos

Los fibroblastos cardíacos fueron sembrados en placas de 60 mm con una densidad de 106 células/mm². Se utilizaron 2 métodos para inducir la diferenciación de estas células a miofibroblastos: i) Los fibroblastos cardíacos fueron expuestos a 48 horas de normoxia (grupo control) o reperfusión simulada (en presencia/ausencia de antioxidantes) para inducir diferenciación espontánea por estrés y estimulación por factores (ej. TGF-β1) secretados desde las células al medio de cultivo; ii) Al inicio de la reperfusión simulada, las células se estimularon con TGF-β1 (10 ng/ml) y fueron expuestas a 48 horas de normoxia (grupo control) o reperfusión simulada (en presencia/ausencia de antioxidantes). Al término de las 48 horas, se evaluaron los niveles de proteína de α-SMA de acuerdo con la metodología señalada en la sección 5.10.

5.13. Síntesis de pro-colágeno tipo I

Los fibroblastos cardiacos fueron sembrados en placas de 60 mm con una densidad de 106 células/mm². Al inicio de la reperfusión, las células fueron estimuladas con angiotensina II (100 nM) y con ácido ascórbico (100 nM) como cofactor para la síntesis de pro-colágeno tipo I, y fueron expuestas a 48 horas de normoxia (grupo control) o reperfusión simulada (en presencia/ausencia de antioxidantes). Al término de las 48 horas, se evaluaron los niveles de proteína de COL1A1 de acuerdo con la metodología señalada en la sección 5.10.

5.14. Representación de datos y análisis estadístico

Todos los datos son presentados como promedio \pm error estándar de la media (S.E.M.), de a los menos 3 experimentos independientes, y fueron analizados usando el programa GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad, San Diego, California, Estados Unidos). Dependiendo del tipo de experimento, se muestran figuras o histogramas representativos. Las diferencias entre 2 grupos experimentales fueron evaluadas por prueba t-Student pareados. Las diferencias entre 3 o más grupos experimentales fueron evaluadas por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de por prueba de Tukey o por prueba de Kruskall-Wallis seguido de prueba de Dunn. Las diferencias entre 2 grupos experimentales en cada tiempo fueron evaluadas por un ANOVA de dos vías seguido por prueba de Bonferroni. La significancia estadística fue aceptada como $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1.

Determinar una asociación farmacológica óptima de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína a partir de su efecto citoprotector dependiente de la concentración sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

6.1.1. Efectos de la isquemia/reperfusión simulada en la viabilidad de los fibroblastos cardiacos.

Para poder estudiar los efectos citoprotectores de los antioxidantes, lo primero que se hizo fue validar el modelo *in vitro* al exponer a los fibroblastos cardiacos a 6 horas de isquemia simulada, seguido de 16 horas de reperfusión simulada, y se evaluó la viabilidad celular mediante azul de tripán. Los resultados muestran que después de la I/Rs, la viabilidad de los fibroblastos cardiacos disminuyó significativamente con respecto al grupo control ($p < 0,001$) (Figura 8A), lo cual fue corroborado por el ensayo de reducción de resazurina ($p < 0,01$) (Figura 8B). Además, en la Figura 8A se aprecia que la isquemia simulada (I) por sí sola no tuvo efectos notorios sobre la viabilidad celular (no significativo respecto del número de células tras 6 horas de normoxia).

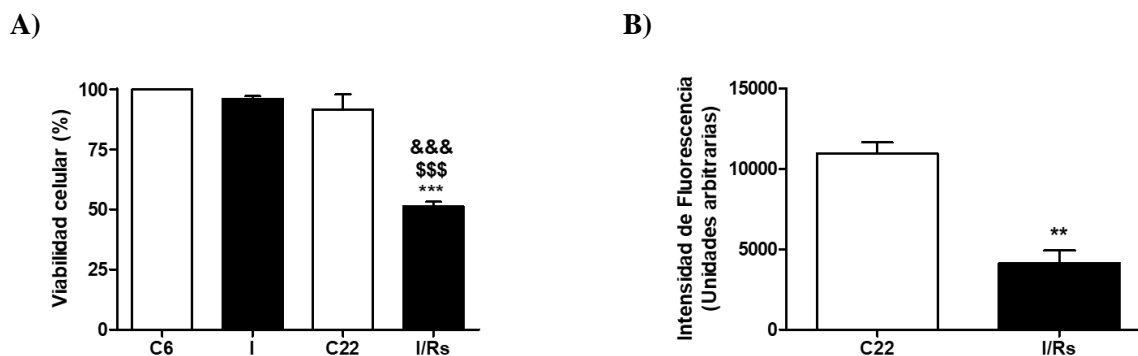


Figura 8. La viabilidad de los fibroblastos cardiacos disminuyó significativamente después de la isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). (A) La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) del número de células tras 6 horas de normoxia (C6, 100%) por conteo celular con exclusión por azul de tripán ($n = 3$). (B) La viabilidad celular fue cuantificada como la intensidad de fluorescencia por ensayo de reducción de resazurina ($n = 3$). Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. &&& $p < 0,001$ vs C6; \$\$\$ $p < 0,001$ vs I; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs C22 (Control número de células tras 22 horas normoxia). Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey en (A), mientras que en (B) se usó prueba t-student pareado.

De manera complementaria, se realizaron estudios exploratorios de diferentes condiciones de normoxia, isquemia simulada e isquemia/reperfusión simulada, de acuerdo con lo descrito en la literatura científica, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos, los cuales se encuentran en la sección ANEXO 1. En primer lugar, tanto en la isquemia simulada como en la reperfusión simulada, no hubo diferencias en cuanto al efecto de una condición de normoxia con medio control (constituido casi de la misma manera que el medio isquémico, pero además contiene glucosa y una baja cantidad de potasio, no contiene ácido láctico y se encuentra a pH 7.4), o con DMEM-F12 sobre la viabilidad celular (Figuras Suplementarias 1A y B). En segundo lugar, se aprecia que el ambiente de N₂ 100%, tanto en la isquemia simulada como en la reperfusión simulada, no tuvo mayores efectos nocivos sobre la viabilidad celular en condiciones con DMEM-F12 o medio control, pero que al combinarlo con medio isquémico hay una tendencia a una menor viabilidad celular (Figuras Suplementarias 1A y B). Por último, no hubo mayores diferencias en la viabilidad celular, tanto en la isquemia simulada como en la reperfusión simulada, al adicionar 2-Deoxi-D-glucosa (inhibe el metabolismo celular de la glucosa) al medio isquémico (Figura Suplementaria 2A y B).

6.1.2. Efecto dependiente de la concentración del ácido ascórbico, la deferoxamina y la N-acetilcisteína sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos bajo isquemia/reperfusión simulada.

Lo siguientes estudios se enfocaron en caracterizar los efectos del ASC, DFO o NAC sobre la viabilidad en fibroblastos cardiacos bajo I/Rs, ya que no han sido reportados en la literatura. Se utilizó un rango de concentraciones similares (1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM y 10000 µM) para los 3 antioxidantes, los cuales se administraron al inicio de la reperfusión, y la viabilidad celular se evaluó mediante conteo celular con azul de tripán.

En el caso de ASC, la Figura 9A muestra que la administración de la mayor concentración de 10000 µM fue muy citotóxica bajo condiciones de normoxia durante 16 horas (tiempo que dura la reperfusión simulada), reduciendo la viabilidad celular a cerca del 1% ($p < 0,001$ respecto de los grupos control). Por otro lado, al exponer a los fibroblastos cardiacos a I/Rs, el ASC no tuvo efectos sobre la viabilidad a 1, 10 y 1000 µM, pero a 100 µM se obtuvo la mayor viabilidad (aunque no estadísticamente significativo con respecto al grupo no tratado) (Figura 9B). Por último, la viabilidad disminuyó significativamente al administrar 10000 µM de ASC con respecto al grupo no tratado ($p < 0,001$) (Figura 9B).

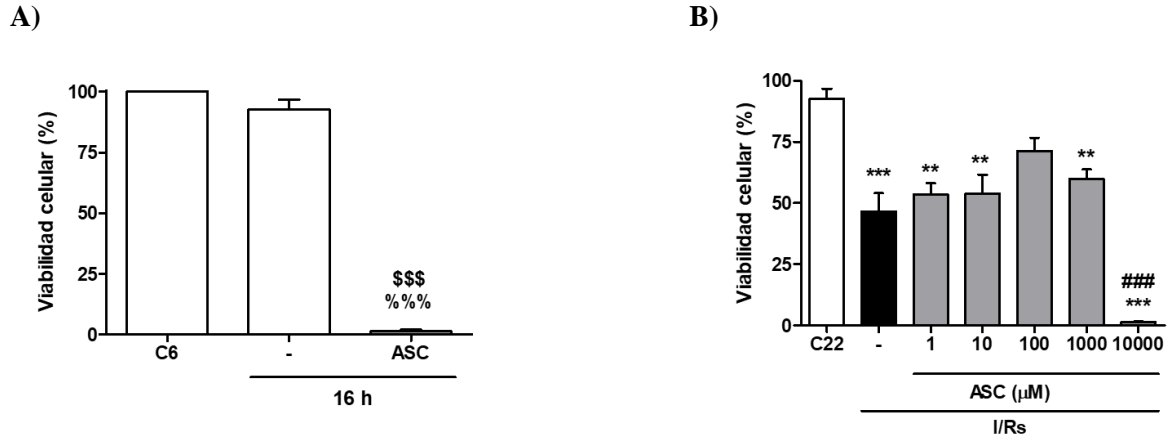
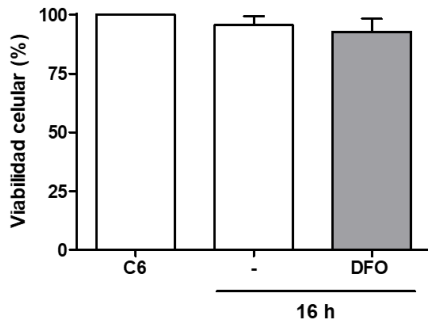


Figura 9. Efectos del ácido ascórbico, a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardíacos en normoxia y expuestos a isquemia/reperfusión simulada. (A) Los fibroblastos cardíacos fueron expuestos a una concentración de 10000 μM de ácido ascórbico (ASC) en condiciones de normoxia durante 16 horas ($n = 3$). (B) Los fibroblastos cardíacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs), y tratados con 1, 10, 100, 1000 y 10000 μM de ASC durante la reperfusión simulada ($n = 3$). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia (C6) por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. \$\$\$ $p < 0,001$ vs C6; %%% $p < 0,001$ vs C16 (Control número de células tras 16 horas de normoxia); *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs C22 (Control número de células tras 22 horas de normoxia); ### $p < 0,001$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

En cuanto a DFO, este no demostró efectos citotóxicos al administrar 10000 μM a los fibroblastos cardíacos bajo condiciones de normoxia durante 16 horas (Figura 10A). Además, al exponer a las células a I/Rs, DFO aumentó significativamente la viabilidad a 100, 1000 y 10000 μM con respecto al grupo no tratado (Figura 10B). Sin embargo, DFO no tuvo efectos sobre la viabilidad a 1 y 10 μM (Figura 10B).

Por parte de NAC, la viabilidad de los fibroblastos cardíacos disminuyó significativamente al ser expuestos a 10000 μM , con respecto a los grupos control ($p < 0,001$) (Figura 11A). Al exponer a las células a I/Rs, los resultados muestran que la viabilidad aumentó significativamente con la administración de 100 y 1000 μM de NAC respecto de las células no tratadas (Figura 11B). En cambio, pese a que la viabilidad celular fue mayor con 10000 μM de NAC, este aumento no fue estadísticamente significativo con respecto a las células no tratadas (Figura 11B). Finalmente, la administración de 1 y 10 μM de NAC no tuvo efectos sobre la viabilidad de los fibroblastos cardíacos expuestos a I/Rs (Figura 11B).

A)



B)

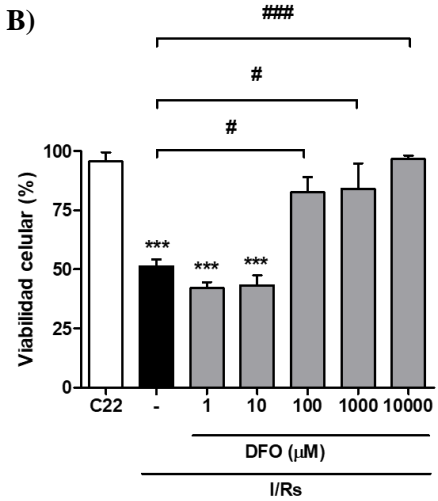
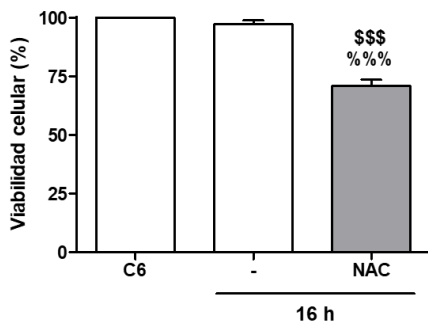


Figura 10. Efectos de la deferoxamina, a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos en normoxia y expuestos a isquemia/reperfusión simulada. (A) Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a una concentración de 10000 μ M de deferoxamina (DFO) en condiciones de normoxia durante 16 horas ($n = 3$). (B) Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs), y tratados con 1, 10, 100, 1000 y 10000 μ M de DFO durante la reperfusión simulada ($n = 3$). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia (C6) por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ vs C22 (Control número de células tras 22 horas de normoxia); ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

A)



B)

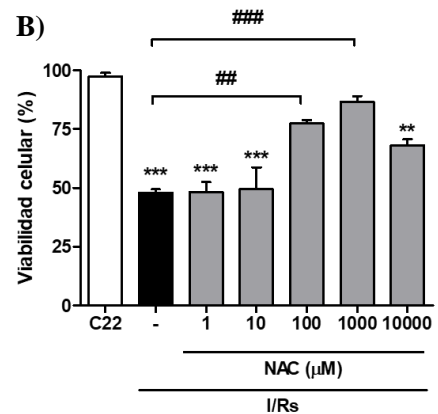
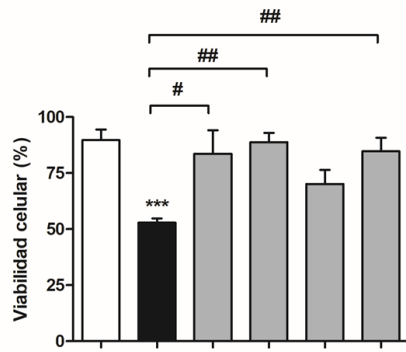


Figura 11. Efectos de la N-acetilcisteína, a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos en normoxia y expuestos a isquemia/reperfusión simulada. (A) Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a una concentración de 10000 μ M de N-acetilcisteína (NAC) en condiciones de normoxia durante 16 horas ($n = 3$). (B) Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs), y tratados con 1, 10, 100, 1000 y 10000 μ M de NAC durante la reperfusión simulada ($n = 3$). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia (C6) por conteo celular con exclusión por azul

de tripán. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. \$\$\$ $p < 0,001$ vs C6; %%% $p < 0,001$ vs C16 (Control número de células tras 16 horas de normoxia); *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs C22 (Control número de células tras 22 horas de normoxia); ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

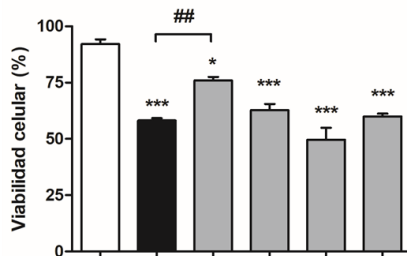
6.1.3. Efectos de asociaciones entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, a bajas concentraciones, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos bajo isquemia/reperfusión simulada.

Como el objetivo de estos estudios es poder establecer una asociación farmacológica óptima entre ASC, NAC y DFO que permita la mayor sobrevida de los fibroblastos cardiacos posterior a la I/Rs, se realizaron experimentos donde se administraron combinaciones de los 3 antioxidantes a concentraciones que no protegieron individualmente, para evaluar un posible efecto sinérgico de citoprotección. Para lograr esto, los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a las condiciones establecidas de I/Rs y se trataron simultáneamente con combinaciones de los 3 antioxidantes al inicio de la reperfusión a 1 y 10 μ M, y se evaluó la viabilidad celular usando azul de tripán. Los resultados muestran que los tratamientos con las asociaciones ASC/DFO, ASC/NAC y ASC/DFO/NAC (A/D/N), pero no DFO/NAC, incrementaron la viabilidad celular después de la I/Rs a 10 μ M cada uno, en comparación al grupo no tratado (Figura 12). En cambio, al administrar estas mismas combinaciones, a 1 μ M cada antioxidante, solo la asociación ASC/DFO aumentó la viabilidad celular (Figura 13).



Normoxia (22 h)	+	-	-	-	-	-
I/Rs	-	+	+	+	+	+
ASC (10 μM)	-	-	+	+	-	+
DFO (10 μM)	-	-	+	-	+	+
NAC (10 μM)	-	-	-	+	+	+

Figura 12. Las asociaciones entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, a 10 μM cada uno, aumentaron la viabilidad en fibroblastos cardiacos expuestos a ischemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de ischemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las asociaciones entre ácido ascórbico (ASC), deferoxamina (DFO) y N-acetilcisteína (NAC), usando 10 μM de cada uno, fueron agregados al inicio de la reperfusión simulada (n = 5). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia (100%) por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio ± S.E.M. *** p < 0,001 vs Control número de células tras 22 horas de normoxia; ## p < 0,01, # p < 0,05 vs I/Rs. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

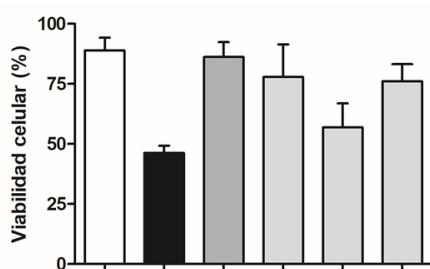


Normoxia (22 h)	+	-	-	-	-	-
I/Rs	-	+	+	+	+	+
ASC (1 μM)	-	-	+	+	-	+
DFO (1 μM)	-	-	+	-	+	+
NAC (1 μM)	-	-	-	+	+	+

Figura 13. Efectos de las asociaciones entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína, a 1 μM cada uno, sobre la viabilidad en fibroblastos cardiacos expuestos a ischemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de ischemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las asociaciones entre ácido ascórbico (ASC), deferoxamina (DFO) y N-acetilcisteína (NAC), usando 1 μM de cada uno, fueron agregados al inicio de la reperfusión simulada (n = 3). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia (100%) por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio ± S.E.M. *** p < 0,001, * p < 0,05 vs Control número de células tras 22 horas de normoxia; ## p < 0,01 vs I/Rs. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

En base a estos hallazgos, se decidió estudiar el efecto citoprotector de la asociación A/D/N a 10 μ M debido a su potencial de proveer una mayor protección frente al estrés oxidativo en I/Rs por 3 mecanismos antioxidantes diferentes, a diferencia de las asociaciones dobles, además de que no ha sido explorada en la literatura científica y representa una estrategia farmacológica novedosa.

Por último, se realizaron estudios para evaluar si la asociación A/D/N podía generar el mismo efecto citoprotector que con 10 μ M de cada antioxidante al disminuir las concentraciones de ASC y/o NAC a 1 μ M. La figura 14 muestra que las distintas asociaciones lograron una mayor viabilidad en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs, pero que este aumento no fue estadísticamente significativo debido a la alta variación en las repeticiones. Por lo tanto, en los siguientes experimentos se utilizará A/D/N a 10 μ M cada antioxidante.



Normoxia (22 h)	+	-	-	-	-	-
I/Rs	-	+	+	+	+	+
ASC (10 μ M)	-	-	+	-	+	-
DFO (10 μ M)	-	-	+	+	+	+
NAC (10 μ M)	-	-	+	+	-	-
ASC (1 μ M)	-	-	-	+	-	+
NAC (1 μ M)	-	-	-	-	+	+

Figura 14. Efectos de las diferentes concentraciones de la asociación entre ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la viabilidad en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las asociaciones entre ácido ascórbico (ASC), deferoxamina (DFO) y N-acetilcisteína (NAC) fueron agregados al inicio de la reperfusión simulada (n = 3). Se utilizaron las concentraciones de 10 y 1 μ M de ASC, 10 y 1 μ M de NAC y 10 μ M de DFO. La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia (C6) por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba estadística Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunn.

6.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2.

Determinar si la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína reduce la muerte celular por necrosis y por apoptosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.

La literatura científica señala que la necrosis y la apoptosis son tipos de muerte celular ampliamente descritos en la isquemia/reperfusión miocárdica, y que también están presentes en la I/Rs en fibroblastos cardiacos. Como la asociación A/D/N, a 10 μ M cada antioxidante, fue capaz de aumentar la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs, lo siguiente fue evaluar el efecto sobre la necrosis y la apoptosis inducida por I/Rs en este tipo celular, las cuales fueron determinadas usando análisis por citometría de flujo con tinción con yoduro de propidio.

De acuerdo con los resultados, tanto la necrosis como la apoptosis aumentaron significativamente en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs (Figuras 15 y 16 respectivamente), lo cual fue concordante con la disminución en la viabilidad celular (evaluada en forma paralela a estos experimentos por conteo celular con azul de tripán) (Figura 17). Al tratar a los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs con la asociación A/D/N, se aprecia que no hubo efecto sobre la necrosis (Figura 15), mientras que sí redujo significativamente la apoptosis en comparación al grupo no tratado ($p < 0,05$) (Figura 16). Además, en forma paralela, la asociación A/D/N aumentó significativamente la viabilidad celular ($p < 0,05$) (Figura 17).

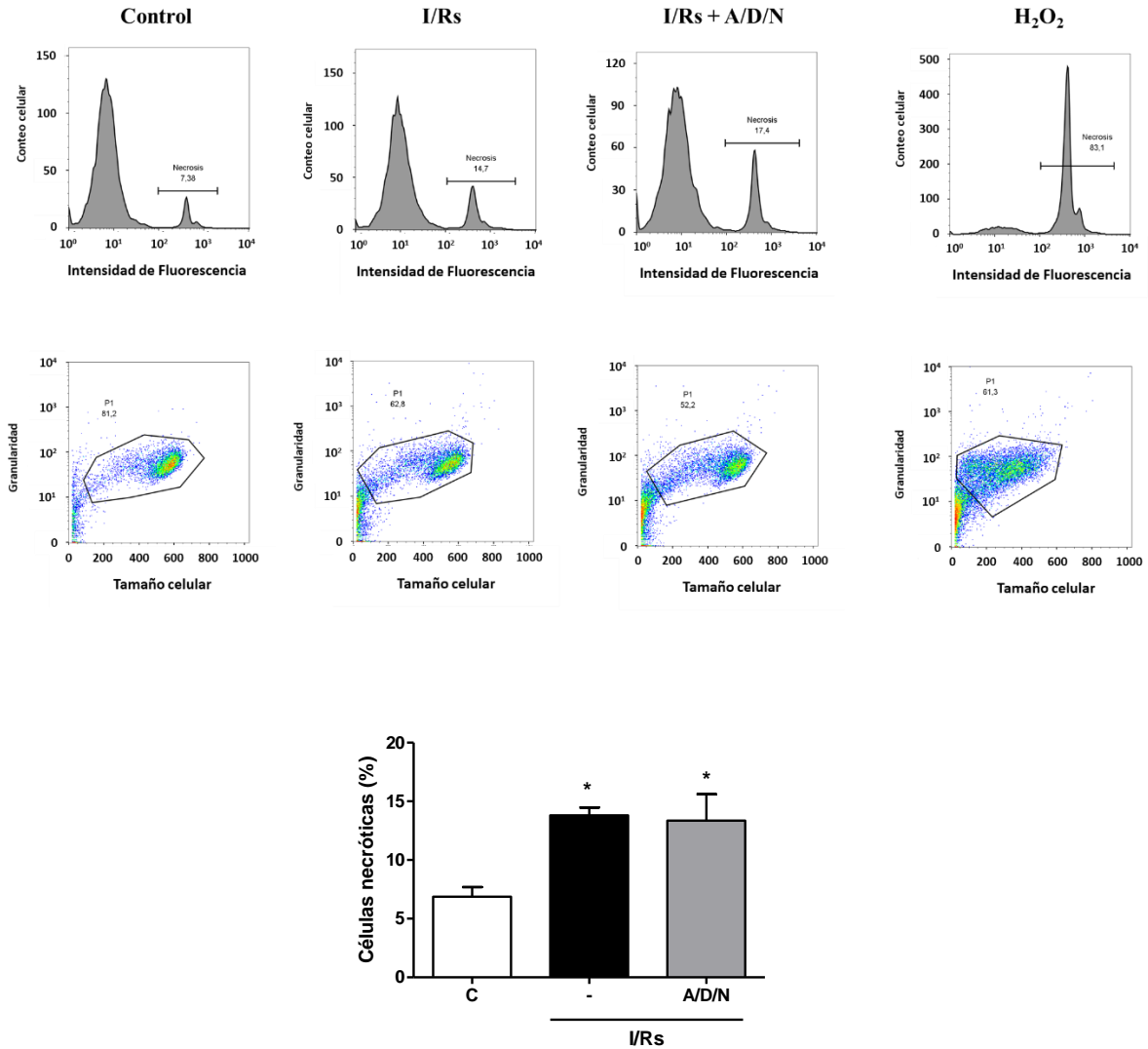


Figura 15. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína no disminuyó la necrosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N), usando 10 μ M de antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. El porcentaje (%) de células necróticas (necrosis) fue cuantificado por citometría de flujo usando yoduro de propidio (panel inferior), con histogramas representativos de cada grupo experimental (paneles superiores) (n = 4). Se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 50 μ M como control positivo. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. * p < 0,05 vs C (Control de células tras 22 horas de normoxia). Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

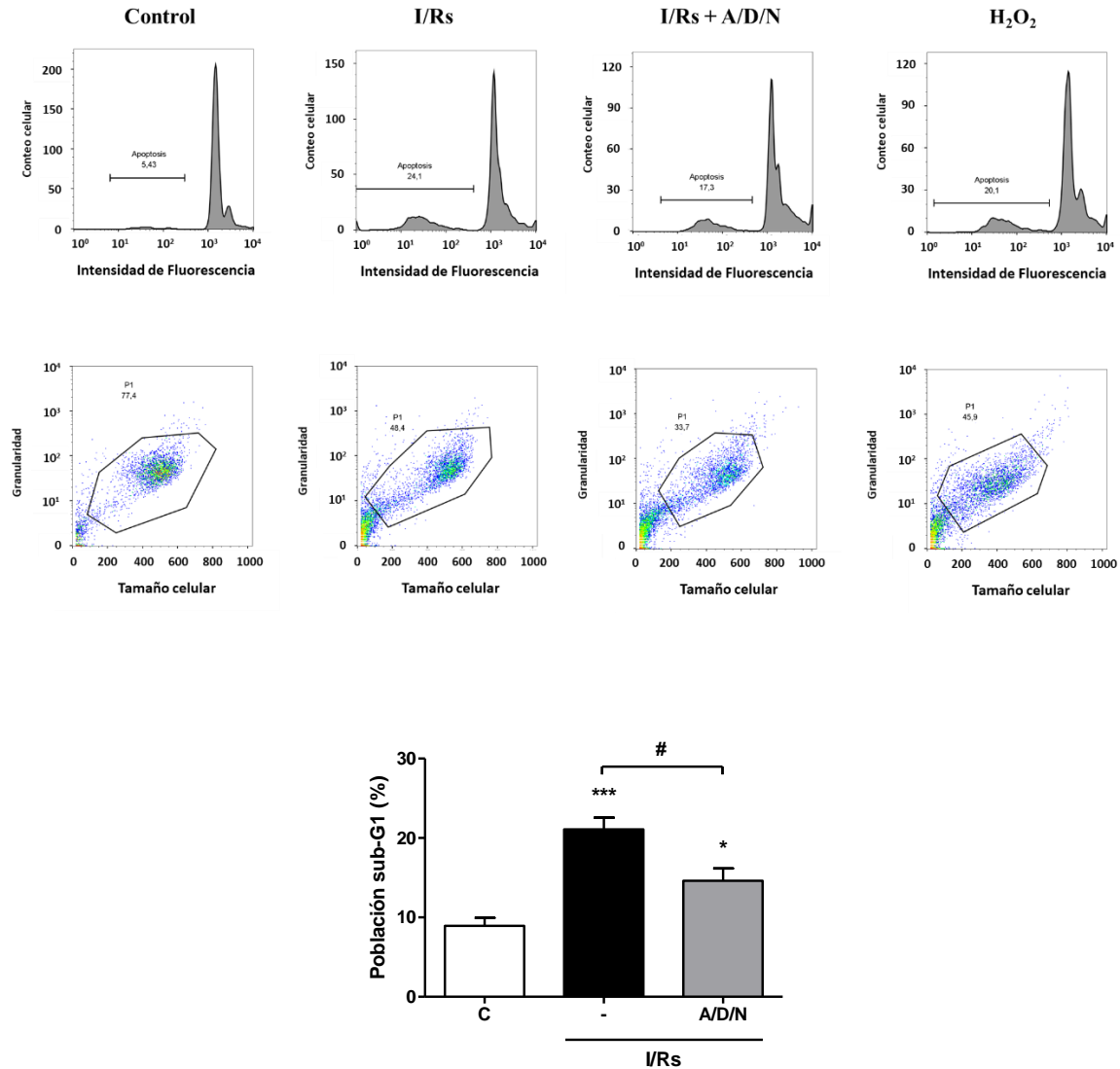


Figura 16. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína reduce la apoptosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N), usando 10 μ M de antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. El porcentaje (%) de población sub-G1 (apoptosis) fue cuantificado por citometría de flujo usando yoduro de propidio (panel inferior), con histogramas representativos de cada grupo experimental (paneles superiores) (n = 5). Se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 50 μ M como control positivo. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** p < 0,001, * p < 0,05 vs C (Control de células tras 22 horas de normoxia); # p < 0,05 vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

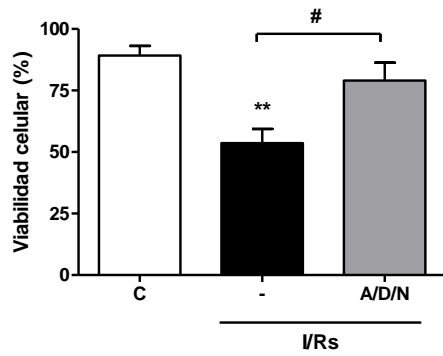


Figura 17. La asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N), usando 10 μ M de cada uno al inicio de la reperfusión simulada (n = 5). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia (100%) por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. ** p < 0,01 vs C (Control número de células tras 22 horas de normoxia); # p < 0,05 vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

6.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3.

Determinar si en los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína reduce la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno, activa las vías de supervivencia ERK1/2 y Akt, inactiva las vías pro-apoptóticas p38 y JNK, reduce las fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3, y aumenta la razón Bcl-xl/Bax.

6.3.1. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la producción de ROS intracelulares inducidas por isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.

Los resultados anteriores muestran que la asociación A/D/N, a 10 μ M cada uno, aumentó la viabilidad celular y redujo la apoptosis en fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs. El siguiente paso fue dilucidar los mecanismos moleculares y las vías de señalización que participan en dichos efectos. Se realizó un estudio para corroborar la generación de estrés oxidativo en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs y la capacidad antioxidante de la asociación A/D/N empleando la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA).

En primer lugar, se realizaron ensayos exploratorios para evaluar tanto la efectividad como la sensibilidad de la sonda DCFH-DA en medio de cultivo DMEM-F12 y al incubar los fibroblastos cardiacos con ella, frente a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (ANEXO 2, Figuras Suplementarias 3A y B). A continuación, se comprobó, mediante un ensayo piloto, el efecto antioxidante de la asociación A/D/N al tratar fibroblastos cardiacos incubados con la sonda DCFH-DA y que además fueron estimulados con peróxido de hidrógeno, los cuales mostraron menores intensidades de fluorescencia en el tiempo en comparación al grupo no tratado (ANEXO 2, Figura Suplementaria 4). Una vez realizados los ensayos preliminares de calibración de la metodología, se procedió a evaluar la generación de ROS intracelular inducida por I/Rs en los fibroblastos cardiacos y el efecto antioxidante de la asociación A/D/N. La Figura 18 muestra que la combinación de estos antioxidantes redujo significativamente la producción de ROS intracelular después de la I/Rs comparado a las células no tratadas. La Figura Suplementaria 5 del ANEXO 2 muestra la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos cardiacos incubados con la sonda DCFH-DA en condiciones de normoxia.

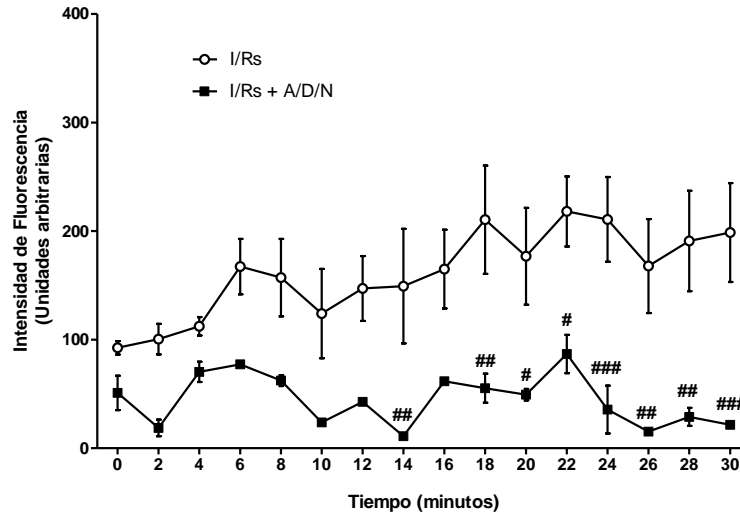
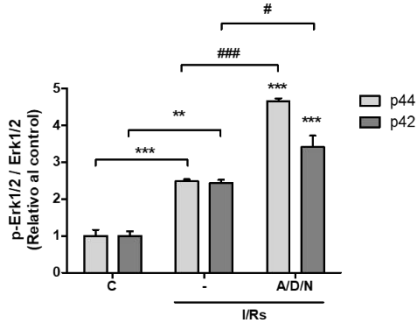
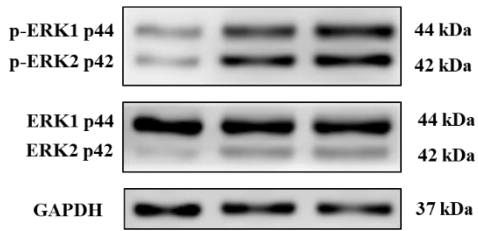


Figura 18. La asociación de ácido ascórbico/deferóxamina/N-acetilcisteína redujo la producción intracelular de ROS en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 30 minutos de reperfusión simulada (I/Rs). Al final de la isquemia, las células fueron incubadas con 2',7'-diclorofluoresceína diacetato y tratadas con A/D/N usando 10 μ M de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. La generación de ROS intracelular fue medida como la intensidad de fluorescencia en el tiempo durante los primeros 30 minutos de la reperfusión simulada (n = 3). Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni.

6.3.2. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferóxamina y N-acetilcisteína sobre las vías de supervivencia ERK1/2 y Akt, y las vías pro-apoptóticas p38 y JNK inducidas por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos.

Los siguientes experimentos se centraron en evaluar mediante western blot si hay activación temprana de las vías de supervivencia ERK1/2 y Akt, y también si hay inactivación temprana de las vías pro-apoptóticas p38 y JNK, en respuesta a la administración de la asociación A/D/N en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs. Los resultados muestran que la I/Rs aumentó la fosforilación de ERK1/2 y Akt después de 10 minutos de reperfusión simulada en las células en comparación a las condiciones de normoxia, y que el tratamiento con la asociación A/D/N potenció de manera estadísticamente significativa este efecto (Figuras 19A y B). Por otro lado, la I/Rs también aumentó la fosforilación de p38 y JNK después de 10 minutos de reperfusión simulada pero el tratamiento con la asociación A/D/N redujo significativamente este efecto (Figuras 20A y B).

A)



B)

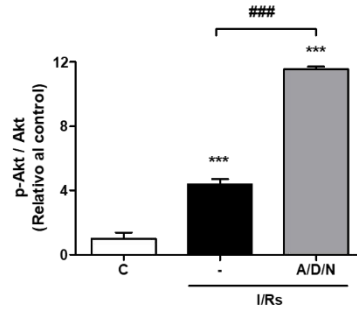
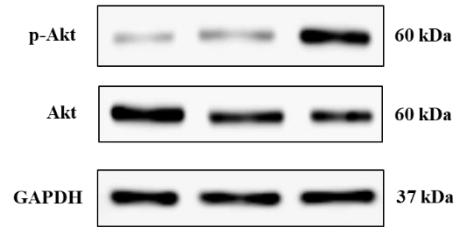
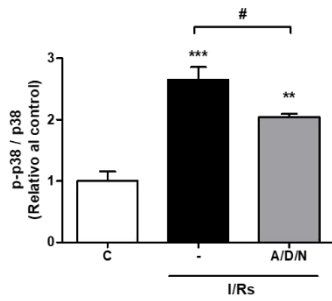
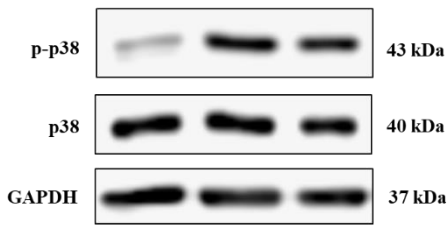


Figura 19. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la activación de las vías de sobrevida ERK1/2 y Akt en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 10 minutos de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μ M de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. (A) y (B) muestran Western blots representativos (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior) de p-ERK1/2 y ERK1/2 ($n = 3$), p-Akt y Akt ($n = 3$), respectivamente. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs C (Control de células después de 6 horas de normoxia); ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

A)



B)

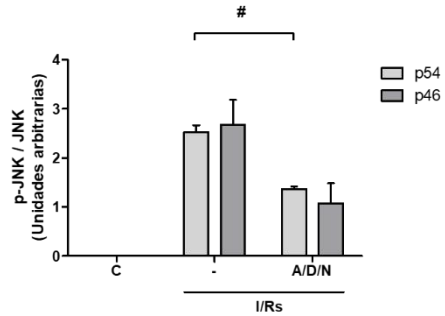
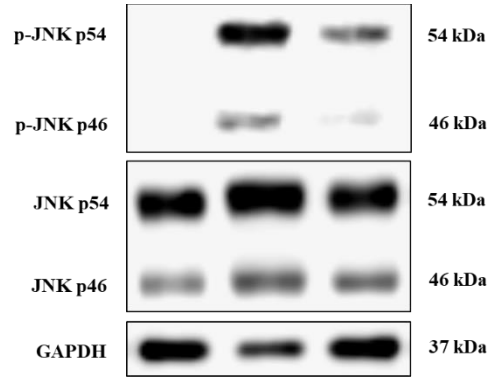


Figura 20. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína disminuyó la activación de las proteínas pro-apoptóticas p38 y JNK en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 10 minutos de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μ M de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. (A) y (B) muestran Western blots representativos (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior) de p-p38 y p38 (n = 4), p-JNK y JNK (n = 3), respectivamente. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** p < 0,001, ** p < 0,01 vs C (Control de células después de 6 horas de normoxia); # p < 0,05 vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

6.3.3. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre las fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3 y la relación Bcl-xl/Bax en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

Para confirmar el efecto antiapoptótico de la asociación A/D/N en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs, se determinaron los niveles de proteínas de las pro-caspasas 9 y 3, así como también la relación Bcl-xl/Bax, mediante western blot tras 16 horas de reperfusión simulada. Los resultados muestran que la I/Rs indujo una reducción en los niveles de pro-caspasa 9 y de pro-caspasa 3 en comparación a las células control (ambos $p < 0,001$). Estos resultados sugieren una inducción de la apoptosis, pero este efecto fue prevenido con la administración de la asociación A/D/N (Figuras 21A y B). Además, los fibroblastos expuestos a I/Rs mostraron una tendencia a una menor relación de Bcl-xl/Bax respecto de las células control (no significativa), la cual aumentó de manera estadísticamente significativa en presencia de la asociación A/D/N en comparación al grupo no tratado ($p < 0,05$) (Figura 22).

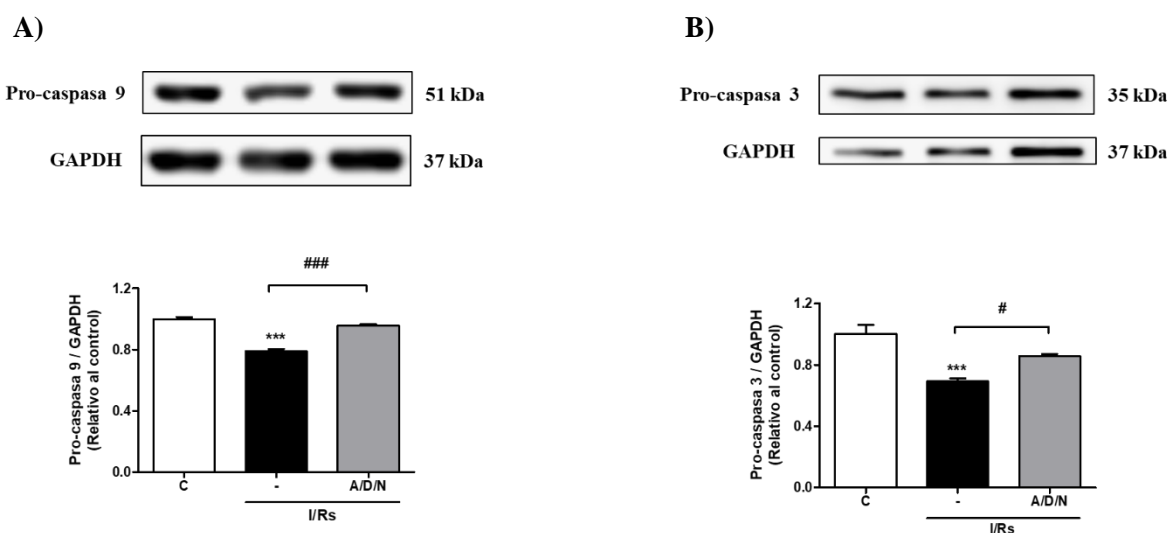


Figura 21. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína previno la disminución de los niveles de proteína de las pro-caspasas 9 y 3 en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μ M de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. (A) y (B) muestran Western blots representativos (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior) de pro-caspasa 9 ($n = 4$) y pro-caspasa 3 ($n = 5$), respectivamente. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ vs C (Control de células después de 22 horas de normoxia); ### $< 0,001$, # $p < 0,05$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

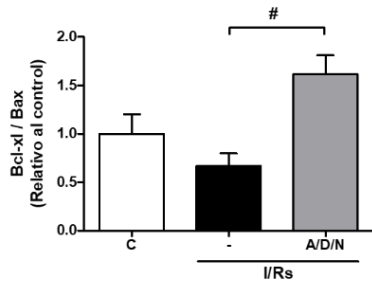
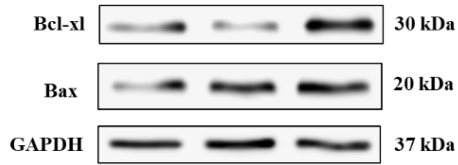


Figura 22. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la relación Bcl-xl/Bax en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μ M de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. Se muestran los Western blot representativo de Bcl-xl y Bax (panel superior), y el análisis densitométrico de la relación Bcl-xl/Bax ($n = 3$) (panel inferior). Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. # $p < 0,05$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

6.3.4 Estudios sobre citoprotección con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína en cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

De manera complementaria, se realizaron estudios preliminares en cardiomiocitos para evaluar si los resultados obtenidos en fibroblastos cardiacos con la asociación A/D/N eran reproducibles en otro tipo de células cardiacas. En este sentido, es importante señalar que los cardiomiocitos son los principales tipos celulares en el corazón y que, además, no tienen capacidad proliferativa por lo que fue importante evaluar si este tratamiento farmacológico, en condiciones similares a las de los fibroblastos cardiacos, podía prevenir la muerte por I/Rs. Los primeros estudios se enfocaron en evaluar la viabilidad celular mediante conteo celular con azul de tripán. La Figura 23 muestra que la viabilidad de los cardiomiocitos disminuyó significativamente después de la I/Rs en comparación al grupo control ($p < 0,01$), pero esto fue prevenido al administrar la asociación A/D/N, a $10 \mu\text{M}$ de cada antioxidante, con respecto al grupo no tratado ($p < 0,05$). Luego, se realizaron estudios preliminares para evaluar parámetros apoptóticos inducidos por la I/Rs en los cardiomiocitos, en presencia o ausencia de la asociación A/D/N, a través de la determinación de los niveles de proteínas de las pro-caspasas 9 y 3, así como los niveles de Bcl-xl, utilizando Western blot. La Figura 24 muestra que, luego de la I/Rs, los niveles de la pro-caspasa 9 y de la pro-caspasa 3 en los cardiomiocitos disminuyeron significativamente en comparación al grupo control ($p < 0,001$). No obstante, estos efectos fueron prevenidos por la administración de la asociación A/D/N. Por último, la Figura 25 muestra que los niveles de Bcl-xl tuvieron una tendencia a la disminución en los cardiomiocitos expuestos a I/Rs, pero cuando se agregó la asociación A/D/N los niveles de Bcl-xl aumentaron significativamente con respecto al grupo no tratado.

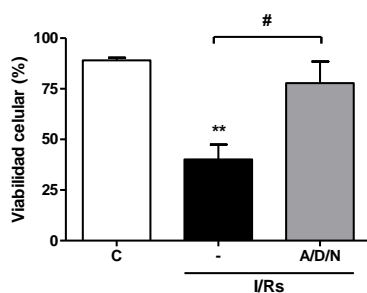


Figura 23. La asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la viabilidad de los cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los cardiomiocitos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N), usando $10 \mu\text{M}$ de cada uno al inicio de la reperfusión simulada ($n = 3$). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. ** $p < 0,01$ vs C (Control número de células tras 22 horas de normoxia); # $p < 0,05$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

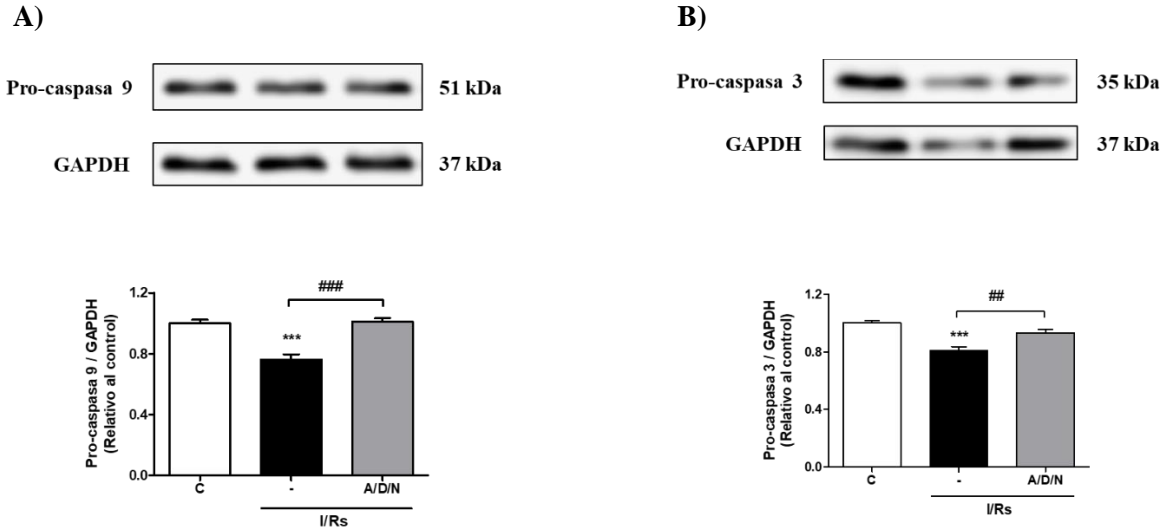


Figura 24. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína previno la disminución de los niveles de proteína de las pro-caspasas 9 y 3 en cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los cardiomiocitos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μ M de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. (A) y (B) muestran Western blots representativos (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior) de pro-caspasa 9 (n = 4) y pro-caspasa 3 (n = 4), respectivamente. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** p < 0,001 vs C (Control de células después de 22 horas de normoxia); ### < 0,001, ## p < 0,01 vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

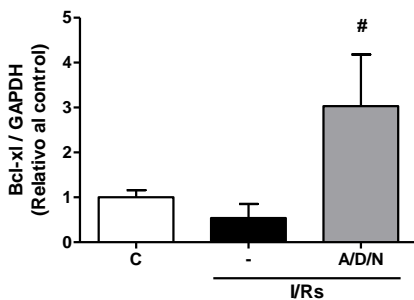


Figura 25. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la relación Bcl-x1/Bax en cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los cardiomiocitos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μ M de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. Se muestran los Western blot representativo (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior) de Bcl-x1 (n = 4). Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. # p < 0,05 vs I/Rs. C = Control número de células tras 22 horas normoxia. Se utilizó como prueba estadística Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunn.

6.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4.

Determinar si en los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumenta la migración inducida por suero, aumenta la diferenciación inducida por TGF- β 1, y aumenta la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II.

6.4.1. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la migración inducida por suero en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

Después de haber estudiado los efectos de la asociación A/D/N sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs, las vías de señalización y los mecanismos moleculares que participan del efecto citoprotector de esta combinación de antioxidantes, el último objetivo fue dilucidar si la asociación A/D/N puede proteger la funcionalidad de los fibroblastos cardiacos relacionada con la pérdida de diferenciación, migración y síntesis de colágeno después de la I/Rs.

En primer lugar, para evaluar la migración celular se llevó a cabo el ensayo por método de la herida, utilizando FBS (10%) para inducir la migración de los fibroblastos cardiacos al área de la herida durante la reperfusión simulada, y se agregó BrdU para inhibir la proliferación inducida por FBS en las células. La Figura 26 muestra que, en condiciones de normoxia, los fibroblastos cardiacos migraron en presencia de FBS (10%), con o sin BrdU, reduciendo el área de la herida sobre un 50% en comparación con las células control ($p < 0,001$). Sin embargo, las células no migraron en presencia de la asociación A/D/N por sí sola. Luego, se evaluó si los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs pueden migrar en presencia de FBS (10%) + BrdU. Después de 24 horas de reperfusión simulada, los fibroblastos cardiacos no migraron en presencia de FBS (10%) + BrdU. Además, la asociación A/D/N, por sí misma, no modificó la migración de los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs. No obstante, cuando estas células fueron expuestas a I/Rs y tratadas con A/D/N en presencia de FBS (10%) + BrdU, la migración aumentó significativamente en comparación a las células control en normoxia sin FBS (10%) ($p < 0,01$), y en comparación a las células bajo I/Rs y en presencia de FBS (10%) + BrdU ($p < 0,01$) (Figura 26).

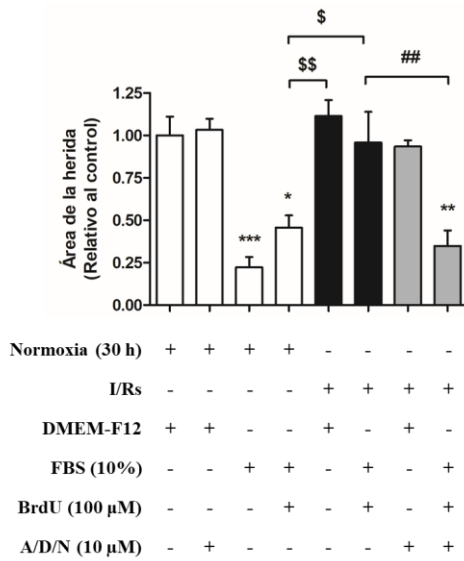
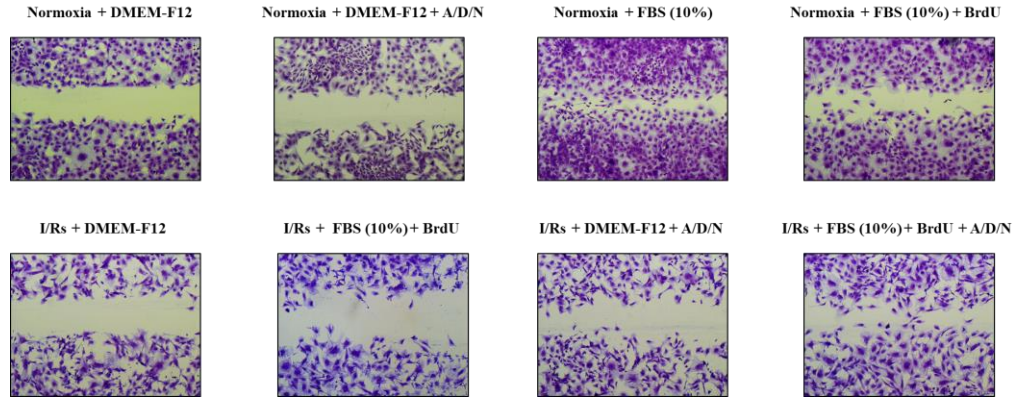


Figura 26. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumenta la migración inducida por suero en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 24 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μM de cada antioxidante al inicio de la reperfusión simulada. Se hizo una herida sobre una monocapa de células previo a la reperfusión simulada con DMEM-F12, FBS (10%) o FBS (10%) + BrdU (100 μM). Se muestran las imágenes representativas de cada grupo experimental (panel superior) y la cuantificación del área (panel inferior izquierdo) (n = 3). Los resultados están expresados como promedio ± S.E.M. *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 vs Normoxia (30 h) + DMEM-F12; \$\$ p < 0,01, \$ p < 0,05 vs Normoxia (30 h) + FBS (10%) + BrdU; ## p < 0,01 vs I/Rs + FBS (10%) + BrdU. FBS = suero fetal bovino; BrdU = 5-bromo-2'-deoxiuridina. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

6.4.2. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la diferenciación inducida por TGF-β1 en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

La diferenciación de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos se indujo mediante incubación en presencia o ausencia de TGF-β1 (10 ng/ml) durante la reperfusión simulada, y se evaluaron los niveles de proteína de α-SMA, un marcador específico de diferenciación, mediante Western blot después de 48 horas. La Figura 27 muestra que el contenido de proteína de α-SMA aumentó después de 48 horas con o sin la administración de TGF-β1 en comparación a las condiciones control ($p < 0,001$), pero estos efectos fueron inhibidos después de la I/Rs. Además, la administración de A/D/N por sí solo no indujo un aumento en los niveles de proteína de α-SMA en fibroblastos cardiacos después de I/Rs, pero la co-administración de los antioxidantes con TGF-β1 recuperó el efecto de diferenciación de esta citoquina, en comparación a las condiciones control ($p < 0,001$) (Figura 27).

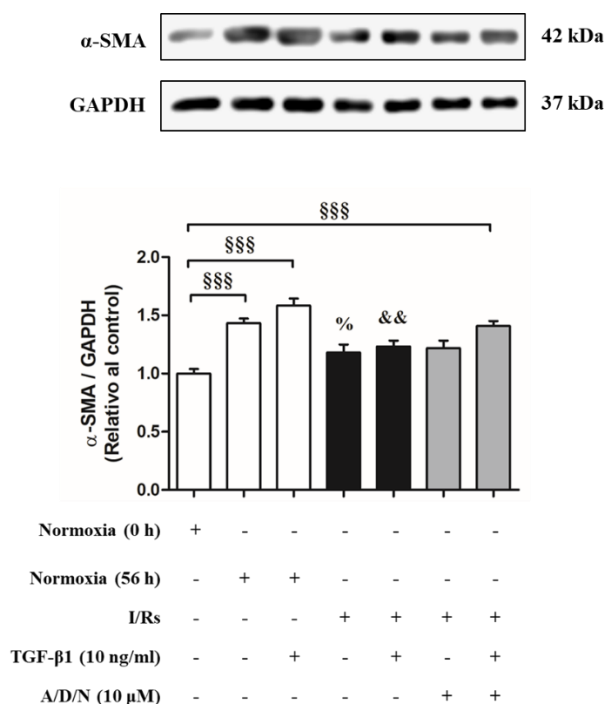


Figura 27. Los niveles de proteína de α-SMA aumentaron en los fibroblastos cardiacos luego de ser expuestos a isquemia/reperfusión simulada, estímulo de TGF-β1 y tratamiento con la asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 48 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Al inicio de la reperfusión simulada, las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μM de cada antioxidante, y estimuladas con o sin TGF-β1 (10 ng/ml). Se muestran el Western blot representativo (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior izquierdo) de α-SMA y GAPDH como control de carga (n = 5). Los resultados están expresados como promedio ± S.E.M. §§§ p < 0,001 vs Normoxia (0 h); % p < 0,05 vs Normoxia (56 h); && p < 0,01 vs Normoxia (56 h) + TGF-β1. TGF-β1 = Factor de crecimiento transformante beta 1; α-SMA = actina del músculo liso alfa. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

6.4.3. Efecto de la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína sobre la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

La síntesis de pro-colágeno tipo I en los fibroblastos cardiacos se indujo mediante la estimulación con angiotensina II (100 nM) más ácido ascórbico (100 nM) durante la reperfusión simulada, y se evaluaron los niveles de proteína de COL1A1 mediante Western blot después de 48 horas. Los resultados muestran que la estimulación con angiotensina II aumentó los niveles de COL1A1 con respecto a las células en condiciones control ($p < 0,05$), pero este efecto fue inhibido de manera significativa después de la I/Rs ($p < 0,001$) (Figura 28). El tratamiento con A/D/N por sí solo no tuvo efecto alguno sobre los niveles de COL1A1 en los fibroblastos después de la I/Rs, pero al administrar la asociación de antioxidantes en conjunto con angiotensina II se recuperó la producción de COL1A1 inducida por este péptido en comparación a las condiciones de normoxia ($p < 0,05$) y a las células bajo I/Rs tratadas con angiotensina II ($p < 0,01$) (Figura 28).

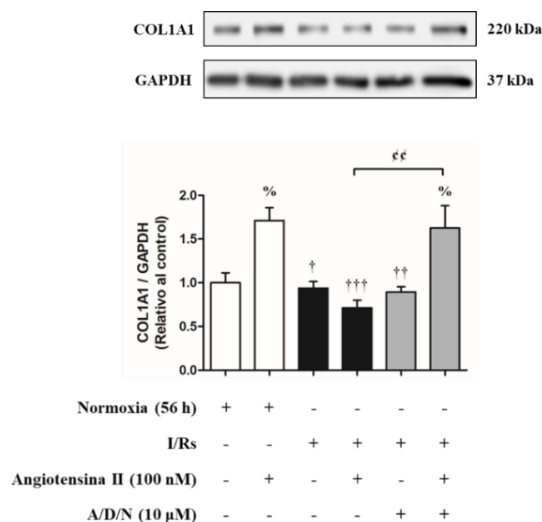


Figura 28. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína aumentó la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II en fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 48 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Al inicio de la reperfusión simulada, las células fueron tratadas con la asociación ácido ascórbico, deferoxamina y N-acetilcisteína (A/D/N) usando 10 μM de cada antioxidante, y estimuladas con o sin angiotensina II (100 nM). Se agregó ácido ascórbico (100 nM) a todos los grupos experimentales como un co-factor en la síntesis de pro-colágeno tipo I. Se muestran el Western blot representativo (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior izquierdo) de COL1A1 y GAPDH como control de carga ($n = 4$). Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$, $\dagger\dagger p < 0,01$, $\dagger p < 0,05$ vs Normoxia (56 h) + angiotensina II; % $p < 0,05$ vs Normoxia (56 h); $\zeta\zeta p < 0,01$ vs I/Rs + angiotensina II. COL1A1 = colágeno tipo 1 alfa 1. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba

estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

7. DISCUSIÓN

Los principales resultados de este trabajo y que responden la hipótesis planteada para esta Tesis se muestran en la Figura 29. Entre estos, la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs aumentó al ser tratados con ASC, DFO o NAC por separado a concentraciones $\geq 100 \mu\text{M}$, pero cuando se administraron las asociaciones ASC/DFO, ASC/NAC y A/D/N a una concentración de $10 \mu\text{M}$ cada antioxidante (concentración a la cual no mostraron efecto alguno sobre la viabilidad), se obtuvo un efecto citoprotector sinérgico frente al daño por I/Rs. Además, la asociación A/D/N, a $10 \mu\text{M}$ cada antioxidante, redujo tanto la producción de ROS intracelular como la apoptosis inducida por la I/Rs, lo cual fue corroborado por una prevención de las fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3, y un aumento de la relación Bcl-xl/Bax. Por otra parte, los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs y tratados con la asociación A/D/N mostraron mayor activación de las vías de sobrevida ERK1/2 y Akt, y una menor activación de las vías pro-apoptóticas p38 y JNK. Por último, el tratamiento con la asociación A/D/N previno la pérdida de funcionalidad de los fibroblastos cardiacos asociada a la cicatrización, provocada por la I/Rs, al restaurar la migración inducida por suero, la diferenciación mediada por TGF- β 1, y la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II.

De manera complementaria, los resultados de los estudios realizados en cardiomiocitos indicaron que las células tratadas con la asociación A/D/N, a $10 \mu\text{M}$ cada antioxidante, tuvieron una mayor sobrevida y menores fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3, mientras que hubo una tendencia a mayores niveles de proteína de Bcl-xl.

La citoprotección de los fibroblastos cardiacos frente a los efectos deletéreos de la reperfusión y del estrés oxidativo es muy importante ya que estos podrían afectar negativamente al óptimo desarrollo de la reparación tisular después de un daño en el miocardio [25]. Actualmente, hay múltiples estrategias, evaluadas en modelos animales, que protegen al miocardio del daño por I/R, pero trasladar estas terapias al ámbito clínico ha sido un enorme desafío [38, 81]. Además, se cree que la combinación de terapias con efectos sinérgicos, así como también la protección de todas las células cardiacas y no solo de los cardiomiocitos, son esenciales para alcanzar la cardioprotección. De acuerdo con esto, el uso de la asociación farmacológica entre ASC, DFO y NAC ha sido sugerida como una novedosa estrategia cardioprotectora contra el daño por reperfusión [77].

En esta Tesis se evidenciaron efectos benéficos de esta asociación de antioxidantes sobre la actividad pro-fibrótica de los fibroblastos cardiacos que no habían sido descritos con anterioridad.

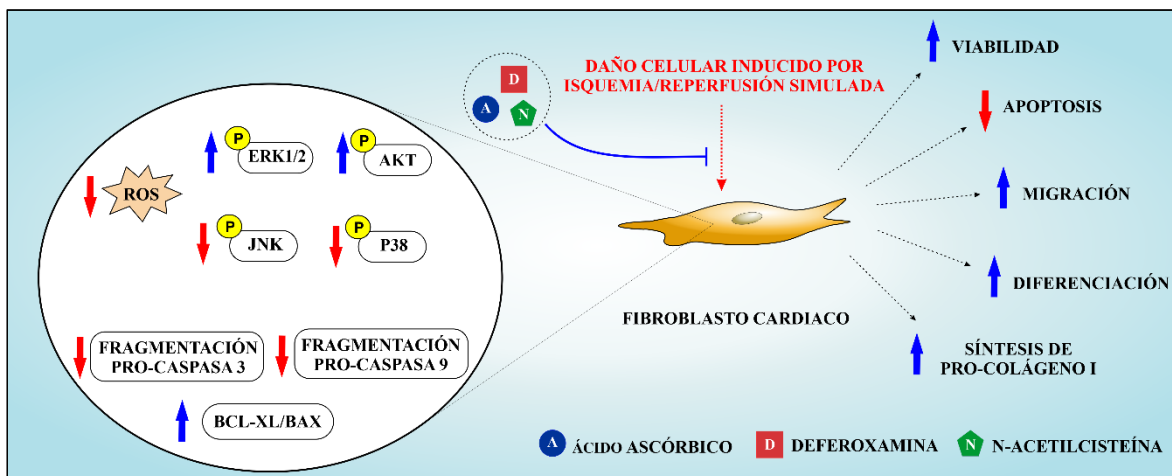


Figura 29. Esquema representativo de los principales resultados de la Tesis Doctoral. La asociación de ácido ascórbico, deferoxamina y n-acetilcisteína previno los efectos deletéreos de la isquemia/reperfusión simulada en los fibroblastos cardiacos en cultivo, aumentando la viabilidad, reduciendo la apoptosis incluyendo sus vías de señalización (JNK, p38), activando vías de supervivencia (ERK1/2, Akt) y reduciendo la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto se relacionó con una recuperación en la capacidad de migración, diferenciación y síntesis de pro-colágeno tipo I.

7.1. Efectos de los antioxidantes, solos o asociados, sobre la pérdida de viabilidad celular inducida por la isquemia/reperfusión simulada en los fibroblastos cardiacos.

De acuerdo con los primeros resultados, el modelo de I/Rs induce pérdida de viabilidad en los fibroblastos cardiacos lo cual fue corroborado por 2 metodologías distintas, acorde con lo que se señala en la literatura [31, 32]. Los antioxidantes ASC, DFO y NAC, por separado, aumentaron la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a la I/Rs de una manera dependiente de la concentración, siendo efectiva en un rango de concentraciones $\geq 100 \mu\text{M}$. Sin embargo, la concentración de $10000 \mu\text{M}$ (o 10 mM) de ASC fue citotóxica, posiblemente debido a que el ASC tiene propiedades pro-oxidantes que promueven la generación de peróxido de hidrógeno a partir de radical ascorbilo y hierro libre en el fluido extracelular [82]. Este efecto citotóxico del ASC a altas concentraciones se ha estudiado como potencial antitumoral en modelos *in vivo* e *in vitro* de células cancerígenas murinas [83], y un estudio realizado por Ma Y y cols. [84] demostró que, en células de cáncer de ovario, altas concentraciones de ASC (de orden milimolar) indujeron daño en el ADN, disminuyeron los niveles de ATP, activaron la vía ATM

(ataxia telangiectasia mutada) / AMPK (proteína quinasa activada por adenosina monofosfato) e inhibieron la vía mTOR (blanco mamífero de rapamicina). Cabe destacar que las concentraciones de ASC, DFO y NAC que aumentaron la viabilidad de los fibroblastos cardiacos son similares o se encuentran dentro de los mismos órdenes de magnitud a los reportados por otros estudios realizados para evaluar protección con estos agentes ya sea en modelo *in vivo* de infarto cardiaco, corazón aislado de animal o cardiomiocitos en cultivo expuestos a I/Rs [48, 50, 57, 65, 85]. Por otro lado, con respecto a las concentraciones mayores de ASC (10 mM) utilizadas en estos ensayos, se han reportado resultados contradictorios a los nuestros. A este respecto, en un ensayo clínico donde se alcanzaron concentraciones plasmáticas de 10 mM de ascorbato mediante infusión intravenosa se obtuvieron efectos benéficos sobre la función ventricular de los pacientes con IAM, sin efectos citotóxicos como los señalados con anterioridad [54]. Bajo estas circunstancias, en un ser humano o modelo *in vivo* ocurren procesos fisiológicos complejos de distribución, metabolismo y excreción de ASC (en el caso de una infusión intravenosa) que no son posibles en un cultivo celular, lo que explicaría que las altas concentraciones no fuesen tóxicas sino más bien necesarias para que el fármaco tuviese la biodisponibilidad óptima en la sangre y en el sitio de acción.

Otros resultados interesantes son que los antioxidantes ASC, DFO y NAC, por separado, no protegieron a concentraciones de 1 y 10 μ M contra la I/Rs. Sin embargo, cuando ellos fueron asociados (sea en una combinación doble o triple), a una concentración de 10 μ M cada uno, mostraron una posible citoprotección sinérgica ya que el efecto combinado fue mayor al esperado de sus potencias individuales [86]. Estudios previos han establecido que ASC, DFO y NAC, por sí solos o combinaciones duales entre ellos, tuvieron efectos cardioprotectores [48-51, 57-63, 65, 66, 72, 73, 75]. No obstante, hasta el momento no se había descrito un estudio que demostrara protección con la administración de A/D/N en fibroblastos cardiacos después de la I/Rs, y se requerirán futuras investigaciones que evalúen efectos dosis-respuesta de la asociación A/D/N en modelo *in vivo* de infarto al miocardio que clarifique el potencial cardioprotector de esta combinación de antioxidantes para reducir el tamaño de infarto y mejorar la cicatrización. Interesantemente, un estudio reportado por Nikas y cols. [76] mostró que la administración intravenosa de ASC, DFO y NAC, 15 min antes y 5 min después de la reperfusión, con una única dosis de cada uno, no fue capaz de reducir el tamaño del infarto ni los efectos deletéreos sobre los parámetros de función ventricular o marcadores de estrés oxidativo en un modelo *in vivo* de daño por reperfusión miocárdica en cerdos. A pesar de que los autores usan un modelo de I/R cardiaco confiable probado en animales de gran tamaño, ellos solo probaron una única dosis de cada antioxidante (3-3,5 g de ASC; 1,8-2,1 g de DFO y 3-3,5 g de NAC) los cuales son cantidades que no se pueden comparar a las concentraciones utilizadas en los estudios de esta Tesis porque no se midieron las concentraciones plasmáticas alcanzadas por cada antioxidante y, por otra parte, faltó realizar estudios dosis-respuesta

preliminares que dieran cuenta de un efecto cardioprotector que sustentaran sus elecciones en el modelo utilizado. Lo anterior da cuenta de que el escalamiento de los ensayos *in vitro* a los ensayos *in vivo* requiere de un gran esfuerzo y es complejo de llevar a cabo. Sin embargo, nuestros resultados auguran que la asociación triple sin lugar a duda puede dar una solución al daño producido por I/R.

Con respecto a los efectos citoprotectores sinérgicos de las asociaciones entre ASC/DFO, ASC/NAC y A/D/N, pero no DFO/NAC, usando cada antioxidante a una concentración de 10 μ M, sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs podría estar intrínsecamente relacionado a una interacción farmacológica favorable entre ASC con NAC y DFO, en el contexto de daño por reperfusión miocárdico mediado por estrés oxidativo [12, 77]. Como se señaló en los antecedentes, el dehidroascorbato oxidado puede ser reducido a ascorbato por GSH intracelular para aumentar la biodisponibilidad de ASC; a su vez, las defensas antioxidantes intracelulares se refuerzan con la suplementación de NAC y GSH, y la quelación del exceso de hierro lábil (producto de la lisis celular en la I/Rs) por parte de DFO contribuye a disminuir la generación de ROS a través de la reacción de Fenton, lo cual también mejoraría la biodisponibilidad de ASC [78, 79]. Además, la triple asociación presenta ventajas como la de proveer una mayor respuesta antioxidante contra el incremento de las ROS intracelulares durante la reperfusión simulada por tener 3 mecanismos diferentes de acción antioxidante. Finalmente, el uso de bajas concentraciones de cada antioxidante (iguales a 10 μ M), en comparación a las utilizadas en la administración independiente para alcanzar un efecto farmacológico en los fibroblastos cardiacos, podría disminuir la probabilidad de aparición de efectos tóxicos dependientes de la concentración.

7.2. Efectos de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre los tipos de muerte celular inducidos por la isquemia/reperfusión simulada en los fibroblastos cardiacos.

De acuerdo con los datos obtenidos por citometría de flujo, se demostró que la pérdida de viabilidad de los fibroblastos cardiacos bajo I/Rs está asociada tanto a necrosis como a apoptosis, siendo esta última quien contribuye en mayor porcentaje en la muerte celular, lo cual es corroborado por estudios en modelos *in vivo* de infarto cardiaco que señalan que la apoptosis es mayoritaria en la muerte celular inducida por la reperfusión miocárdica [8]. Además, en el modelo de I/Rs se observó que hay participación de la vía intrínseca de la apoptosis ya que hay una disminución en los niveles de proteína de la pro-caspasa 9, lo cual se puede interpretar como mayor fragmentación y activación, conduciendo a

la activación de la caspasa 3 ejecutora (se observó disminución en los niveles de proteína de la pro-caspasa 3). Si bien en esta tesis no se evaluó la participación de la vía extrínseca de la apoptosis, Vivar R y colabs. [31] demostraron que en fibroblastos cardiacos bajo I/Rs esto sí ocurrió, pero no se evaluó si contribuyó en mayor, menor o igual medida que la vía intrínseca a la muerte celular por apoptosis. Por otro lado, se evaluó la relación Bcl-xl/Bax, que es un reflejo de los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 anti-apoptóticas y pro-apoptóticas, y cuya participación es importante para la formación de poros en las membranas de la mitocondria, lo que facilita la salida de citocromo c hacia el citosol y con ello la activación de la vía intrínseca de la apoptosis [9]. Nuestros resultados mostraron una tendencia a la disminución de esta relación, así como también en otros estudios realizados en cardiomiocitos bajo I/Rs y modelo *in vivo* de I/R cardiaca, lo que finalmente corrobora que efectivamente ocurre un aumento en los niveles de proteínas de pro-apoptóticas y una disminución de anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 [48, 87].

El empleo de la asociación A/D/N al inicio de la reperfusión simulada redujo la apoptosis, lo cual fue concordante con una menor activación de las caspasas 9 y 3, así como un incremento de la relación Bcl-xl/Bax (dado principalmente por un aumento en los niveles de proteína de Bcl-xl). Estos resultados son consistentes con los efectos anti-apoptóticos reportados previamente para ASC, DFO y NAC [48, 50, 60, 65]. Sin embargo, aún falta por dilucidar la forma en cómo participan las vías de señalización estudiadas en esta Tesis (vía RISK). Además, la asociación A/D/N inhibió la producción de ROS intracelulares inducidas por la I/Rs en los fibroblastos cardiacos, siendo el estrés oxidativo un factor muy importante en la generación de la apoptosis a través de la modulación de proteínas de la familia Bcl-2, activación de caspasas, etc, de acuerdo con lo señalado en la literatura [17, 88].

Los resultados obtenidos relacionados con los efectos de la asociación A/D/N sobre la apoptosis inducida por I/Rs en los fibroblastos cardiacos contribuyen a una mejor caracterización del papel del estrés oxidativo como un potencial blanco farmacológico a intervenir. Por otro lado, no se observó un efecto protector de la asociación A/D/N sobre la necrosis inducida por la I/Rs, lo que podría sugerir inicialmente que hay otros factores distintos al estrés oxidativo (ej. disminución del metabolismo energético), que podrían contribuir en forma más importante a este tipo de muerte celular durante la reperfusión simulada. Ahora bien, está descrito que la vía RISK protege contra la muerte celular por apoptosis y necrosis, y en nuestro modelo *in vitro* esta vía de sobrevida es activada por la asociación A/D/N en los fibroblastos cardiacos, por lo que se requerirán de futuros estudios que permitan dilucidar los mecanismos moleculares asociados a esta protección diferencial sobre ambos tipos de muerte celular. Además, se utilizó un número limitado de ensayos de muerte celular en estos experimentos, por lo que se requerirán estudios futuros que evalúen con mayor precisión el tipo de muerte celular prevenida por la asociación A/D/N.

7.3. Efectos de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre las vías ERK1/2, Akt, p38 y JNK en los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

Las vías de señalización intracelular tienen una participación importante en el destino de la célula cuando están en condiciones de I/R. En esta tesis se observó que la I/Rs indujo activación temprana de las vías ERK1/2 y Akt (componentes claves de la vía RISK) en los fibroblastos cardiacos, corroborando los datos obtenidos por Vivar R y colabs. [31, 32] lo que se puede interpretar como una respuesta celular de sobrevida frente al estrés de las condiciones de isquemia y reperfusión simulada. Además, en el artículo de revisión de Zhang J. y colabs. [89] se encuentran más antecedentes de cómo las ROS inducen la activación de las vías de ERK1/2 y PI3K-Akt ya sea en forma directa o indirecta. En cambio, en otro tipo de células cardiacas como los cardiomiocitos puede darse el caso de que la I/Rs no active estas vías [90]. La administración de la asociación A/D/N aumentó la activación de las vías ERK1/2 y Akt en los fibroblastos expuestos a I/Rs, indicando que hay participación de la vía RISK en el efecto citoprotector de los antioxidantes lo cual es esencial para proteger a las células cardiacas expuestas a la I/Rs de una muerte celular inducida por la reperfusión [44, 91]. De acuerdo con datos no mostrados en esta Tesis, A/D/N no indujo la activación de las vías ERK1/2 y Akt en los fibroblastos bajo condiciones control, y a la fecha, hay pocos estudios que relacionen la activación de la vía RISK (sea ERK1/2 y/o Akt) a ASC y NAC [48, 50, 67], por lo que nuestros hallazgos suponen un nexo entre estas vías de señalización de sobrevida bien estudiadas y los efectos de citoprotección de la asociación A/D/N. Si bien la presentación de estos resultados de la tesis son más bien descriptivos y requieren de estudios adicionales con experimentos de causa-efecto para confirmar si la inhibición de la vía RISK resulta en la pérdida de la protección conferida por A/D/N a los fibroblastos cardiacos, existen estudios que han corroborado que la inhibición de la vía RISK revierte el efecto cardioprotector del agente farmacológico empleado [80, 90].

Por otro lado, los resultados también muestran que, en los fibroblastos cardiacos, la I/Rs activó en forma temprana las vías p38 y JNK las cuales son mediadores importantes de la apoptosis en el contexto de la I/R cardiaca [20, 92], y que el tratamiento con A/D/N redujo la activación de estas vías pro-apoptóticas. Es importante señalar que en la literatura se describe que p38 y JNK se encuentran río debajo de ASK1, una MAPKKK sensible a estrés oxidativo, y cuya participación es importante en la muerte celular inducida por la I/R miocárdica [16, 93]. De esta forma, se puede suponer que el efecto antioxidante de la asociación podría estar actuando a nivel de ASK1 inhibiendo su activación mediante ROS y consecuentemente disminuyendo la activación de p38 y JNK, reflejando también un efecto anti-apoptótico que no había sido descrito con anterioridad en fibroblastos cardiacos bajo I/Rs. Sin embargo,

se requerirá investigación adicional que corrobore esto último y que evalúe los mecanismos moleculares por los cuales la asociación de antioxidantes inactivó a p38 y JNK.

7.4. Efectos citoprotectores de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre la pérdida de viabilidad de los cardiomiocitos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

Con el objetivo de comprobar que la asociación A/D/N puede ejercer efectos citoprotectores en otro tipo de células cardiacas, se llevaron a cabo estudios comparativos en cardiomiocitos expuestos a I/Rs, un modelo de estudio *in vitro* que se ha utilizado ampliamente para evaluar a ciertos agentes farmacológicos como posibles cardioprotectores [94, 95]. De acuerdo con los resultados, la asociación A/D/N, a una concentración de 10 μ M de cada antioxidante, fue capaz de aumentar la viabilidad celular, reducir la activación de la caspasa 9 y la caspasa 3, y se observó una tendencia a mayores niveles de proteína de Bcl-x1, correspondiéndose con los resultados obtenidos en fibroblastos cardiacos y dando cuenta que el estrés oxidativo es un blanco farmacológico importante en este tipo celular en particular expuesto a I/Rs. Como se mencionó en un principio, se han descrito efectos beneficiosos de ASC y NAC en cardiomiocitos expuestos a I/Rs pero no se habían descrito para la asociación combinada A/D/N. No obstante, serán necesarios más experimentos que caractericen de mejor manera su efecto cardioprotector, ya sea evaluando *in vitro* las vías de señalización y los mecanismos moleculares involucrados, y confirmando en modelos animales los hallazgos encontrados en la presente Tesis.

7.5. Efectos citoprotectores de la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre la pérdida de migración inducida por suero, diferenciación inducida por TGF- β 1 y síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II en los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

La migración de los fibroblastos cardiacos es un paso clave en el proceso de cicatrización ya que les permite a las células que se encuentran cercanas a la zona de infarto poder trasladarse al área necrótica para repoblar en respuesta a quimioquinas (Fractalquina/CX3CL1), factores de crecimiento (TGF- β y factor de crecimiento del fibroblasto) y citoquinas (interleuquina-1 β , TNF- α and cardiotrofina-1) secretadas por otros tipos celulares. Adicionalmente, los fibroblastos cardiacos secretan proteínas de la ECM, citoquinas y quimioquinas (como MCP-1 o Proteína quimiotáctica de monocitos 1) para inducir migración de las células del sistema inmune y asegurar una rápida reparación tisular, puesto que la respuesta inflamatoria es necesaria para iniciar el proceso de cicatrización [27, 96]. El FBS posee un alto

contenido de factores que promueven el crecimiento celular, y se ha utilizado para inducir migración *in vitro* en fibroblastos cardiacos y otros tipos celulares [97, 98]. Ahora bien, nuestros resultados mostraron que el daño celular causado por la I/Rs produjo una disminución en la capacidad migratoria inducida por suero en los fibroblastos cardiacos. Se han reportado resultados similares en fibroblastos cardiacos de ratas adultas, donde la estimulación con 10 y 100 μM de peróxido de hidrógeno provocó una disminución en la capacidad de migración celular inducida por gradiente de fibronectina en comparación a células control no tratadas [99], indicando el efecto deletéreo del estrés oxidativo sobre la migración de estas células, lo que sugiere que la asociación A/D/N ejerce un mecanismo molecular de protección antioxidante sobre el daño en los mecanismos que gobiernan el proceso de migración. Interesantemente, también existen antecedentes que proponen a las ROS, en particular al peróxido de hidrógeno, como un activador de receptores de superficie celular que dirigen los cambios necesarios para que ocurra el movimiento celular (polarización y extensión de lamelipodias celulares que proveen tracción para migración), así como un quimioattractante primario producido durante una injuria [100].

Una de las principales características de los fibroblastos cardiacos es su habilidad para diferenciarse en miofibroblastos cardiacos, los cuales son caracterizados por un fenotipo pro-fibrótico [101]. Estos cambios celulares son inducidos por muchos estímulos, como TGF- β 1, interleuquina-10, trombospondina-10, angiotensina II, estimulación de cardiomiocitos y células vasculares del sitio de daño, entre otras [25]. Los miofibroblastos son la principal fuente de secreción de proteínas de la ECM, así como también metaloproteinasas de la matriz, en el remodelamiento fibrótico cardiaco [25]. En esta Tesis se indujo la diferenciación espontánea del fibroblasto a miofibroblasto, el cual se produce debido a efectos autocrinos del TGF- β 1 secretado por el fibroblasto cardiaco en cultivo, así como también con estimulación exógena con TGF- β 1. Ambos métodos indujeron un incremento en los niveles de α -SMA en los fibroblastos cardiacos después de 48 horas de reperfusión simulada. A pesar de que la estimulación con TGF- β 1 no fue significativamente mayor en comparación con la diferenciación espontánea, estos experimentos y los de otros grupos de investigación han demostrado que el incremento en los niveles de α -SMA en los fibroblastos cardiacos inducidos por TGF- β 1 es dependiente del tiempo [98, 102]. Ahora bien, el efecto inhibitorio de la I/Rs sobre el incremento en los niveles de α -SMA inducidos por TGF- β 1 o por diferenciación espontánea en los fibroblastos cardiacos no había sido descrito previamente. De manera similar, otros grupos de investigación observaron que la hipoxia previno la transformación de cardiomiocitos H9c2 y queratocitos corneales en miofibroblastos inducida por TGF- β 1, y esto estuvo asociado a cambios en las vías de señalización de esta citoquina [103, 104]. Se requieren estudios adicionales para dilucidar los efectos de la asociación A/D/N sobre las vías de señalización implicadas en los efectos de diferenciación de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos cardiacos inducidos por TGF- β 1 después de la I/Rs.

Los fibroblastos cardiacos y miofibroblastos secretan y degradan varios tipos de colágeno para mantener la homeostasis de la ECM. Entre estos, el colágeno tipo I forma fibras gruesas y rígidas, y se encuentra ampliamente expresado en tejido cardiaco de mamíferos [25]. Por otro lado, está ampliamente descrito que la angiotensina II es un péptido que puede inducir a fibrosis cardiaca por estimular la producción y secreción de colágeno [105, 106, 107, 108]. De acuerdo con los resultados obtenidos, la I/Rs previno el incremento de la síntesis de pro-colágeno tipo I gatillado por angiotensina II y no indujo la producción de pro-colágeno tipo I por sí misma en los fibroblastos cardiacos. El estudio realizado por Siwik y cols. [109] demostró que el estrés oxidativo disminuyó la síntesis de colágeno fibrilar en los fibroblastos cardiacos. Otros grupos de investigación han reportado que 72 h de hipoxia indujeron un aumento en los niveles de ARNm y de proteína de pro-colágeno tipo I α en fibroblastos cardiacos humanos [110], mientras que 6 h de hipoxia también incrementaron los niveles de colágeno tipo I en los fibroblastos cardiacos de ratas adultas [111]. Adicionalmente, otro estudio encontró que 1 h de hipoxia seguida por 12 h de reoxigenación aumentó la secreción de colágeno soluble desde los fibroblastos cardiacos de ratas neonatas [112]. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diversos factores como la duración de la hipoxia/reoxigenación, la edad y las especies desde las cuales provienen estas células. El efecto protector de la asociación A/D/N mitigó los efectos deletéreos de las ROS y otros mecanismos de daño inducidos por la I/Rs sobre el incremento de pro-colágeno tipo I inducido por angiotensina II en los fibroblastos cardiacos, pero otras vías de señalización deberán ser exploradas en estudios futuros.

Finalmente, las observaciones de que la asociación A/D/N previno la muerte celular, redujo el estrés oxidativo y previno la pérdida de funciones asociadas con la reparación tisular inducidas por la I/Rs en fibroblastos cardiacos ciertamente sustenta los efectos cardioprotectores señalados anteriormente en los antecedentes para ASC, DFO y NAC, separados o asociados, sobre la función ventricular en modelos animales de I/R miocárdica. Estos hallazgos necesitan ser confirmados mediante ensayos *in vitro* en fibroblastos cardiacos humanos, así como también modelos *ex vivo* e *in vivo* de infarto cardiaco para evaluar si la prevención de la muerte de los fibroblastos cardiacos por A/D/N, a corto o largo plazo, tendrá efectos beneficiosos sobre la reducción del tamaño de infarto, la calidad de la cicatrización, la reducción de la fibrosis cardiaca y una mejora en la función ventricular, permitiendo la generación de evidencia más robusta que refuerce el potencial traslacional de los resultados obtenidos en esta Tesis.

8. LIMITACIONES

Una de las limitaciones de este estudio es que no se midieron otros parámetros o marcadores relacionados ya sea con la apoptosis inducida por I/Rs o con el efecto citoprotector de la asociación A/D/N como por ejemplo los niveles de glutatión (reducido, oxidado) intracelulares en los fibroblastos cardiacos, los niveles de proteína de Nrf2, o los productos de lipoperoxidación como MDA, los que podrían haber aportado una mayor cantidad de información a esta Tesis.

También, es importante señalar que el estudio se centró en los efectos de la reperfusión en los fibroblastos cardiacos, y no en la isquemia, ya que clínicamente es más relevante la intervención farmacológica en esta etapa.

Por último, el modelo *in vitro* utilizado fue apropiado para estudiar específicamente los efectos de la I/Rs en la viabilidad y funcionalidad de los fibroblastos cardiacos, así como el efecto citoprotector de la asociación A/D/N, pero no es posible extrapolar estos resultados a un modelo animal de infarto cardiaco ya que poseen características farmacocinéticas distintas, y se requerirá realizar estudios dosis-respuesta que permitan encontrar la dosis más eficaz para cada antioxidante en este tipo de modelo experimental.

8.1. Limitaciones en el análisis estadístico

En esta tesis doctoral, en la mayoría de los experimentos se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas (ej. ANOVA de una vía) sobre valores de “n” bajos para determinar diferencias significativas entre grupos. No obstante, las pruebas paramétricas ciertamente se aplican sobre un conjunto de datos que siguen una distribución normal o Gaussiana, y no fue posible demostrar normalidad con tan pocos datos. Además, se podrían haber aplicado pruebas no-paramétricas para realizar el análisis estadístico en cada uno pero el gran inconveniente es que este tipo de pruebas tienen bajo *poder estadístico* (probabilidad de detectar un efecto significativo cuando realmente existe) comparado a las pruebas paramétricas, sobre todo habiendo tan pocos datos [113].

Al momento de diseñar los experimentos y calcular el tamaño muestral para cada uno [114], el “n” para demostrar significancia estadística de cada experimento varía entre 3-5, lo cual sigue siendo insuficiente para determinar si los datos tendrán una distribución normal. Además, el aumentar el “n” experimental para lograr obtener suficientes datos que permitan determinar una distribución normal iría en contra de las normas de bioética y del tamaño muestral previamente calculado, por lo que se tomó la decisión de realizar, en algunos experimentos, un análisis estadístico con un $n = 3$ con una prueba paramétrica (mayor poder estadístico que las pruebas no-paramétricas) para evaluar si esa cantidad era

suficiente para determinar significancia estadística (dada por una observación previa de los datos que indicaban una clara tendencia en los valores de cada grupo experimental).

9. CONCLUSIONES

En base a los principales hallazgos de esta Tesis, podemos concluir lo siguiente:

- a) El ácido ascórbico, la deferoxamina y la N-acetilcisteína, por separados y a determinadas concentraciones, protegen a los fibroblastos cardiacos del daño por isquemia/reperfusión simulada.
- b) Las asociaciones ácido ascórbico/deferoxamina, ácido ascórbico/N-acetilcisteína, y ácido ascórbico/deferoxamina/N-acetilcisteína, a una determinada concentración en la que cada antioxidante no demostró protección en forma individual, mostraron un efecto citoprotector sinérgico frente al daño por isquemia/reperfusión simulada.
- c) La asociación ácido ascórbico/deferoxamina/N-acetilcisteína redujo la producción de ROS intracelular y disminuyó la muerte celular por apoptosis, pero no la necrosis, inducida por la isquemia/reperfusión simulada en los fibroblastos cardiacos.
- d) La asociación ácido ascórbico/deferoxamina/N-acetilcisteína activó en forma temprana las quinasas de pro-sobrevivencia ERK1/2 y Akt, mientras que también inhibió las quinasas pro-apoptóticas p38 y JNK en los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.
- e) La asociación ácido ascórbico/deferoxamina/N-acetilcisteína previno la pérdida de función de los fibroblastos cardiacos, asociada con la reparación tisular, inducida por la isquemia/reperfusión simulada por recuperar la migración inducida por suero, la diferenciación a miofibroblastos cardiacos mediada por TGF- β 1 y la síntesis de pro-colágeno tipo I inducida por angiotensina II.
- f) La asociación ácido ascórbico/deferoxamina/N-acetilcisteína, bajo las mismas condiciones que en los fibroblastos cardiacos, protegió a los cardiomiocitos del daño por isquemia/reperfusión simulada relacionada a una menor apoptosis inducida por la reperfusión.

10. ESTUDIOS PRELIMINARES DE CITOPROTECCIÓN CON LPS EN FIBROBLASTOS CARDIACOS EXPUESTOS A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN SIMULADA.

Antecedentes no publicados de nuestro laboratorio demuestran que en fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs, el bloqueo de la señalización intracelular gatillada por activación del TLR4 induce a una menor activación de las vías ERK1/2 y Akt y, consecuentemente, a una disminución de la viabilidad celular. En base a esto y de manera complementaria, se realizaron estudios preliminares en fibroblastos cardiacos expuestos a las mismas condiciones de I/Rs y tratados con LPS, ultrapuro y utilizado sólo como agonista específico del TLR4, para comparar los efectos de citoprotección de un agente farmacológico no antioxidante y que puede activar vías de sobrevida, con los efectos de citoprotección de la asociación A/D/N evaluados hasta el momento.

Primero se evaluó el efecto del tratamiento con LPS sobre la viabilidad celular mediante conteo celular con azul de tripán. En la Figura 30 se muestra que el estímulo con LPS, tanto al inicio de la isquemia simulada como de la reperfusión simulada, aumentó la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs en comparación al grupo no tratado ($p < 0,05$). Luego, se evaluó el efecto del tratamiento con LPS sobre la necrosis y la apoptosis inducida por I/Rs, los cuales se determinaron mediante análisis por citometría de flujo con tinción con yoduro de propidio. La Figura 31 muestra que los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs y tratados con LPS mostraron una tendencia a un menor valor de necrosis en comparación al grupo no tratado, pero no logró ser una diferencia estadísticamente significativa. No obstante, el tratamiento con LPS sí redujo de manera significativa la apoptosis en las células expuestas a I/Rs en comparación al grupo no tratado ($p < 0,01$) (Figura 32).

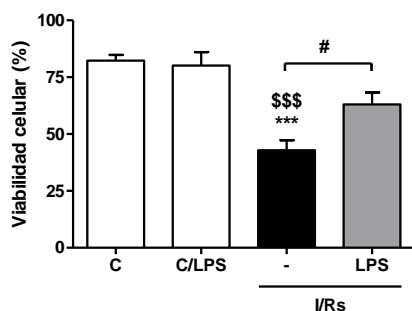


Figura 30. El LPS aumentó la viabilidad de los fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) al inicio de isquemia simulada y al inicio de la reperfusión simulada ($n = 4$). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia por conteo celular con exclusión por azul de tripán. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ vs C (Control número de células tras 22 horas de normoxia); \$\$\$ $p < 0,001$ vs C/LPS (Control número de células tras 22 horas de normoxia estimuladas con LPS); # $p < 0,05$ vs I/Rs. Se utilizó como prueba

estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

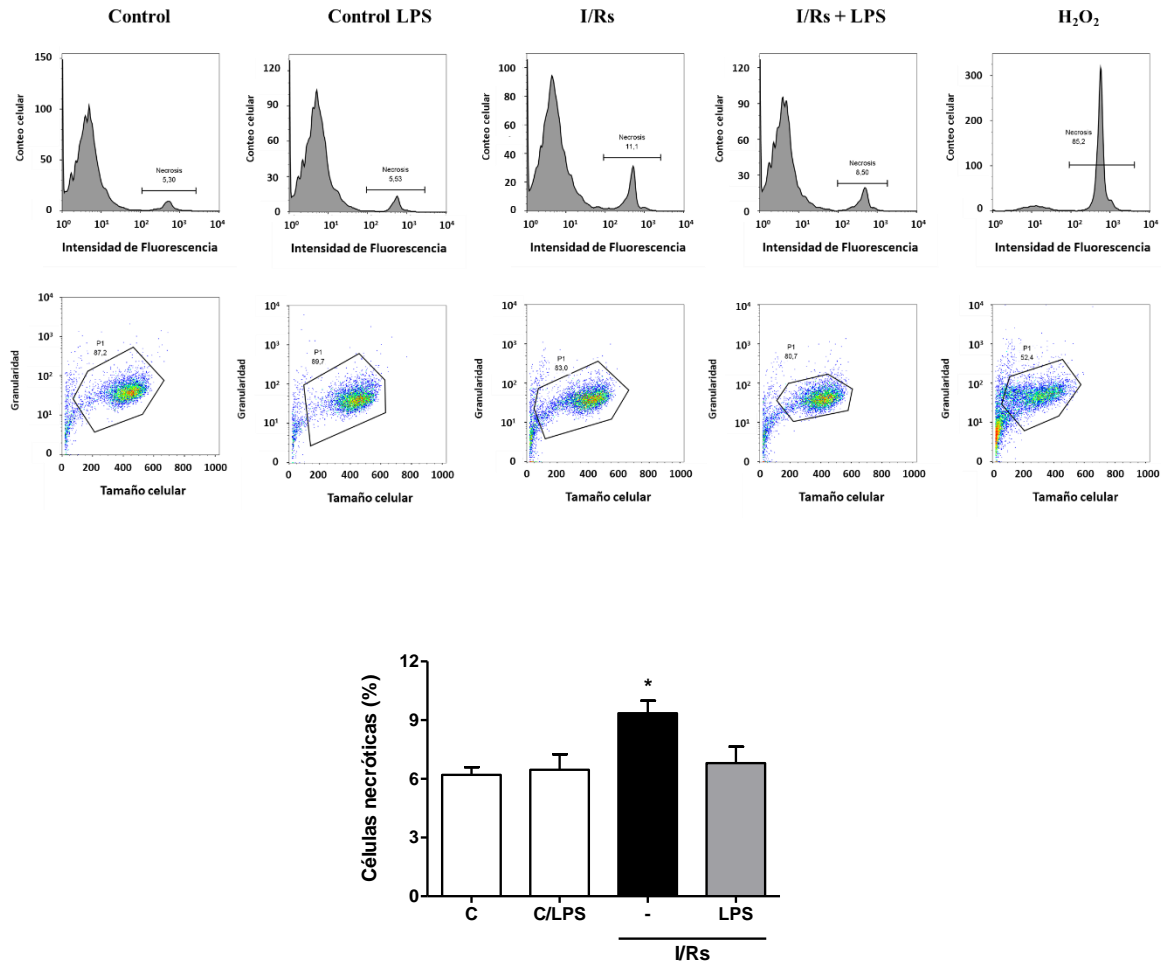


Figura 31. El LPS no disminuyó la necrosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con LPS (1 µg/ml) al inicio de isquemia simulada y al inicio de la reperfusión simulada. El porcentaje (%) de células necróticas (necrosis) fue cuantificado por citometría de flujo usando yoduro de propidio (panel inferior), con histogramas representativos de cada grupo experimental (paneles superiores) (n = 4). Se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 50 µM como control positivo. Los resultados están expresados como promedio ± S.E.M. * p < 0,05 vs C (Control de células tras 22 horas de normoxia). Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

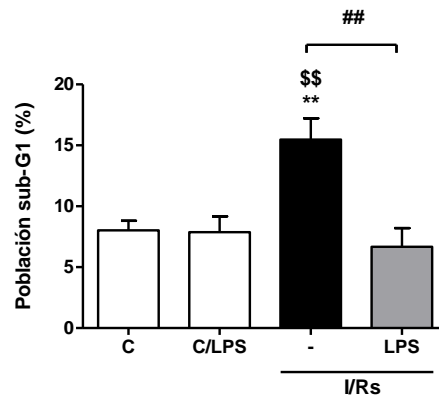
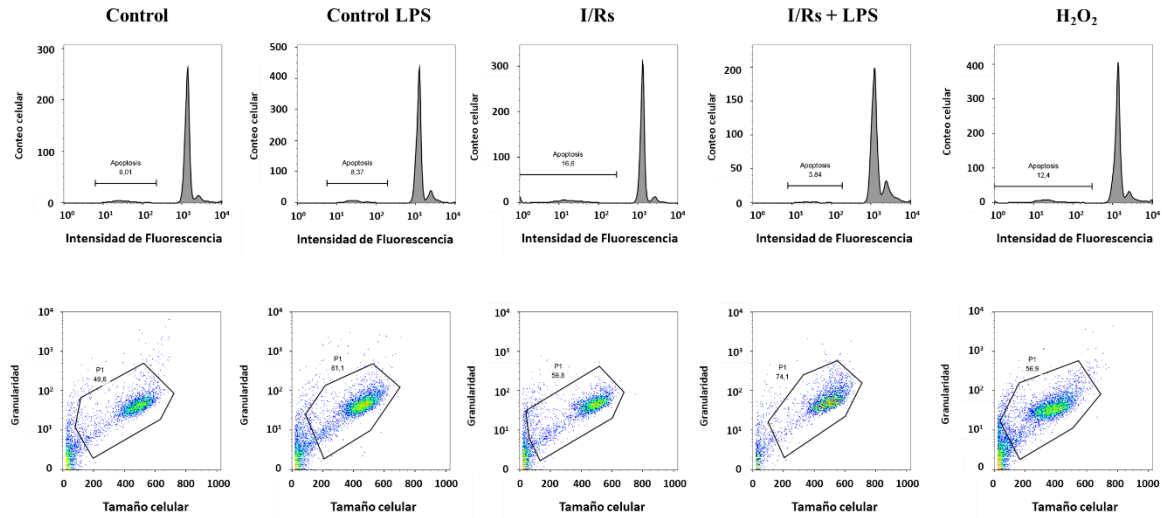


Figura 32. El LPS redujo la apoptosis inducida por la isquemia/reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con LPS (1 µg/ml) al inicio de isquemia simulada y al inicio de la reperfusión simulada. El porcentaje (%) de población sub-G1 (apoptosis) fue cuantificado por citometría de flujo usando yoduro de propidio (panel inferior), con histogramas representativos de cada grupo experimental (paneles superiores) (n = 5). Se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 50 µM como control positivo. Los resultados están expresados como promedio ± S.E.M. ** p < 0,01 vs C (Control de células tras 22 horas de normoxia); \$\$ p < 0,01 vs C/LPS (Control número de células tras 22 horas de normoxia estimuladas con LPS); ## p < 0,01 vs I/Rs. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

En vista de que el tratamiento con LPS aumentó la viabilidad y redujo principalmente la apoptosis en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs, se decidió profundizar en el efecto antiapoptótico explorando la activación de las caspasas 9 y 3 al evaluar los niveles de proteínas respectivas mediante Western blot. La Figura 33 muestra que el tratamiento con LPS previno las fragmentaciones de la pro-caspasa 9 y de la pro-caspasa 3 inducidas por la I/Rs de manera estadísticamente significativa en comparación al grupo no tratado ($p < 0,05$). A continuación, se evaluó si estos efectos inducidos por el tratamiento con LPS sobre la fragmentación de las pro-caspasas 9 y 3 eran mediados a través de TLR4 y por las vías ERK1/2 y Akt (ya que son vías de sobrevida y son importantes en la señalización de este receptor). De acuerdo con los resultados, al utilizar los inhibidores específicos de las vías ERK1/2 y Akt, el efecto del tratamiento con LPS sobre los niveles de las pro-caspasas 9 y 3 en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs fue revertido (Figura 33). Así mismo, al inhibir la señalización intracelular del TLR4, el efecto del tratamiento con LPS sobre los niveles de la pro-caspasa 9 en los fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs también fue revertido (Figura 34).

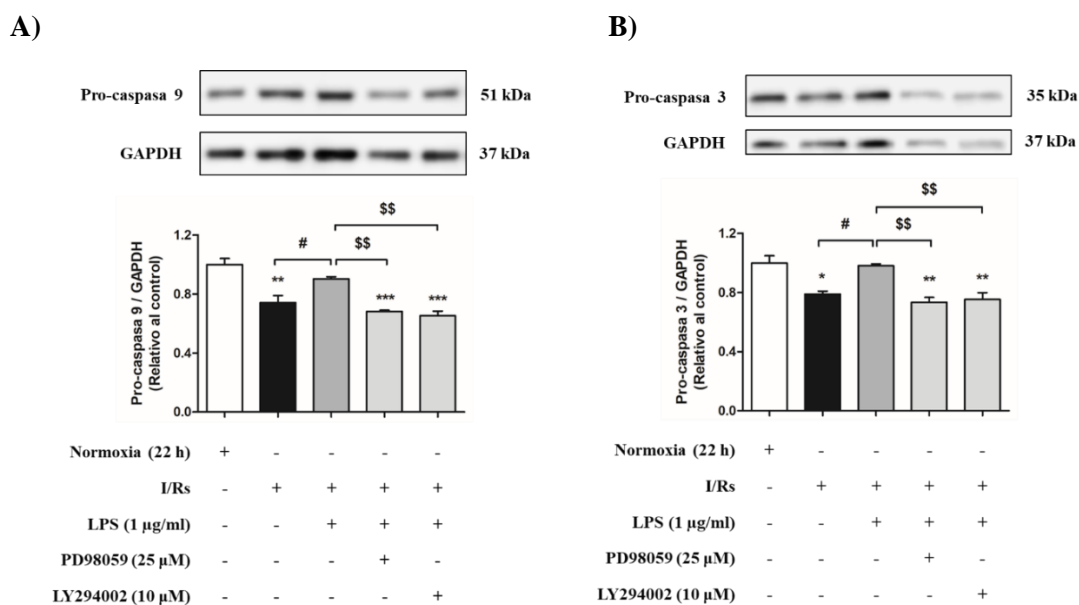


Figura 33. El LPS previno las fragmentaciones de las pros-caspasas 9 y 3 inducidas por la isquemia/reperfusión simulada a través de las vías ERK1/2 y Akt en fibroblastos cardiacos. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con LPS (1 µg/ml), PD98059 (25 µM) y LY294002 (10 µM) al inicio de isquemia simulada y al inicio de la reperfusión simulada. (A) y (B) muestran Western blots representativos (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior) de pro-caspasa 9 (n = 3) y pro-caspasa 3 (n =

3), respectivamente. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs C (Control de células después de 22 horas de normoxia); # $p < 0,05$ vs I/Rs; \$\$ $p < 0,01$ vs I/Rs + LPS. PD98059 = Inhibidor específico de MEK1/2; LY294002 = inhibidor específico de PI3K. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

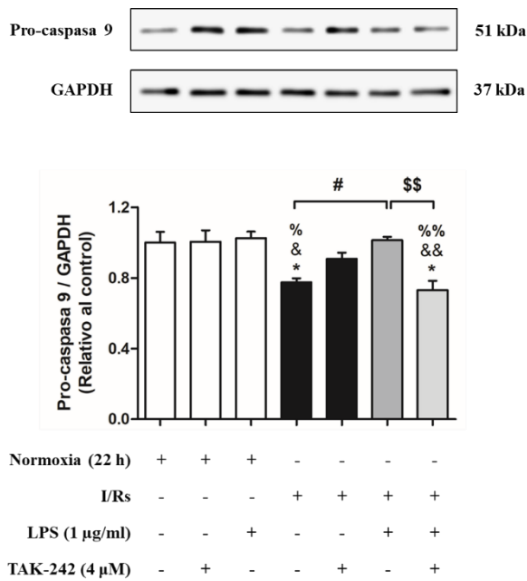


Figura 34. El LPS previno la fragmentación de la pro-caspasa 9 inducida por la isquemia/reperfusión simulada a través de TLR4. Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada seguida de 16 horas de reperfusión simulada (I/Rs). Las células fueron tratadas con LPS (1 μ g/ml) y TAK-242 (4 μ M) al inicio de isquemia simulada y al inicio de la reperfusión simulada. Se muestran los Western blot representativos (panel superior) y el análisis densitométrico (panel inferior) de pro-caspasa 9 (n = 3). Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados están expresados como promedio \pm S.E.M. * $p < 0,05$ vs C (Control de células después de 22 horas de normoxia); && $p < 0,01$, & $p < 0,05$ vs C + TAK-242; %% $p < 0,01$, % $p < 0,05$ vs C + LPS; # $p < 0,05$ vs I/Rs; \$\$ $p < 0,01$ vs I/Rs + LPS. TAK-242 = Inhibidor específico de la señalización intracelular de TLR4. Símbolo “+” representa presencia de la condición y símbolo “-” representa ausencia de condición. Se utilizó como prueba estadística un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

10.1.Comparación entre los efectos del LPS y la asociación ácido ascórbico, N-acetilcisteína y deferoxamina sobre fibroblastos cardiacos expuestos a isquemia/reperfusión simulada.

Los principales hallazgos de los resultados presentados anteriormente son que en fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs y tratados con LPS aumentó la viabilidad y disminuyó la apoptosis, lo cual se relacionó a menores fragmentaciones de las pro-caspasas 9 y 3 a través de las vías ERK1/2 y Akt, y a través de TLR4 en el caso particular de pro-caspasa 9.

El LPS es un agente bacteriano que se une en forma específica al TLR4 desencadenando así una respuesta inmune inflamatoria. Además, a diferencia del ácido ascórbico, la deferoxamina y la N-acetilcisteína, el LPS no es un antioxidante y demostró tener un efecto citoprotector frente al daño por I/Rs en fibroblastos cardiacos al igual que la asociación A/D/N. Existen investigaciones donde evalúan la participación del TLR4 en la muerte celular inducida por la reperfusión o en la cardioprotección frente al daño por reperfusión, pero esto se ha mantenido controversial [40, 41, 115, 116]. Antecedentes de nuestro laboratorio (no publicados) indican que, en los fibroblastos cardiacos, el TLR4 sería importante en la sobrevida celular frente al daño por I/Rs a través de las vías ERK1/2 y Akt que son parte de la señalización intracelular río abajo no canónica [116], siendo un potencial blanco farmacológico de estudio. Los resultados que aquí se presentan no se habían descrito con anterioridad para fibroblastos cardiacos y están acordes con los reportados en otros modelos experimentales [40, 41].

La activación del TLR4 puede desencadenar vías inflamatorias en distintos tipos celulares, lo que haría casi imposible pensar en la activación del TLR4 como una vía factible de modular en los procesos de I/R. Por lo tanto, el significado de estos estudios para la Tesis está en que tanto el LPS como la asociación A/D/N protegieron a los fibroblastos cardiacos del daño por I/Rs aumentando la viabilidad y reduciendo la apoptosis (pero no la necrosis), y que en ambos efectos hubo participación de la vía RISK. Por otro lado, el efecto citoprotector del LPS, de acuerdo con los experimentos realizados y con lo descrito en la literatura, se debería a una señalización a través de TLR4-Akt/ERK1/2 y sin un efecto antioxidante mayoritario, mientras que en el caso de la asociación A/D/N habría una participación importante de su capacidad antioxidante, dada por la combinación de 3 mecanismos distintos, para prevenir la activación de vías de señalización y mecanismos moleculares apoptóticos, y favorecer la activación de la vía RISK no explorada previamente. Ahora bien, el TLR4 como blanco farmacológico está aún en estudio y se conocen pocos ligandos farmacológicos específicos con proyecciones terapéuticas en el ámbito clínico, mientras que la asociación A/D/N cuenta con mayores ventajas al respecto ya que existe una mayor cantidad de información acerca de los perfiles de seguridad y eficacia de cada antioxidante, así como numerosos estudios que sustentan su utilización como cardioprotectores tanto en animales como en ensayos clínicos, y su uso combinado como una triple asociación representa

una novedosa estrategia terapéutica para prevenir el daño por reperfusión miocárdico, con la posibilidad de utilizar bajas concentraciones o dosis de cada antioxidante para lograr el mayor efecto beneficioso y reducir los posibles efectos tóxicos.

Finalmente, el conjunto de resultados sobre citoprotección obtenidos tanto con el tratamiento con A/D/N en fibroblastos cardiacos y cardiomiocitos expuestos a I/Rs, así como con el tratamiento con LPS en fibroblastos cardiacos expuestos a I/Rs, sugieren a la activación de la vía RISK y una acción antioxidante potente como efectos importantes a estar presentes en una terapia cardioprotectora para prevenir el daño por reperfusión.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization, «The top 10 causes of death,» 24 mayo 2018. [En línea]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. [Último acceso: 02 marzo 2019].
- [2] H. D. White y D. P. Chew, «Acute myocardial infarction,» *Lancet*, vol. 372, n° 9638, pp. 570-584, 2008.
- [3] S. Yusuf, S. Hawken, S. Ounpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, M. McQueen, A. Budaj, P. Pais, J. Varigos y L. Lisheng, «Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study.,» *Lancet*, vol. 364, n° 9438, pp. 937-952, 2004.
- [4] V. Talman y H. Ruskoaho, «Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration,» *Cell Tissue Res*, vol. 365, n° 3, pp. 563-581, 2016.
- [5] S. D. Prabhu y N. G. Frangogiannis, «The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis,» *Circ Res*, vol. 119, n° 1, pp. 91-112, 2016.
- [6] J. L. Anderson y D. A. Morrow, «Acute Myocardial Infarction,» *N Engl J Med*, vol. 376, n° 21, pp. 2053-2064, 2017.
- [7] D. J. Hausenloy y D. M. Yellon, «Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target,» *J Clin Invest*, vol. 123, n° 1, pp. 92-100, 2013.
- [8] G. Vilahur, O. Juan-Babot, E. Peña, B. Oñate, L. Casaní y L. Badimon, «Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 50, n° 3, pp. 522-533, 2011.
- [9] S. Elmore, «Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,» *Toxicol Pathol*, vol. 35, n° 4, pp. 495-516, 2007.
- [10] D. Garcia-Dorado, A. Rodríguez-Sinovas, M. Ruiz-Meana y J. Inserte, «Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in clinical practice,» *Rev Esp Cardiol*, vol. 67, n° 5, pp. 394-404, 2014.

- [11] K. Raedschelders, D. M. Ansley y D. D. Chen, «The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion,» *Pharmacol Ther*, vol. 133, n° 2, pp. 230-255, 2012.
- [12] V. Braunersreuther y V. Jaquet, «Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches,» *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 13, n° 1, pp. 97-114, 2012.
- [13] M. Chevion, Y. Jiang, R. Har-El, E. Berenshtein, G. Uretzky y N. Kitrossky, «Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury,» *Proc Natl Acad Sci*, vol. 90, n° 3, pp. 1102-1106, 1993.
- [14] E. Berenshtein, B. Mayer, C. Goldberg, N. Kitrossky y M. Chevion, «Patterns of Mobilization of Copper and Iron Following Myocardial Ischemia: Possible Predictive Criteria for Tissue Injury,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 29, n° 11, pp. 3025-3034, 1997.
- [15] F. Funk, J. P. Lenders, R. R. Crichton y W. Schneider, «Reductive mobilisation of ferritin iron,» *Eur J Biochem*, vol. 152, n° 1, pp. 167-172, 1985.
- [16] K. Tobiume, A. Matsuzawa, T. Takahashi, H. Nishitoh, K. Morita, K. Takeda, O. Minowa, K. Miyazono, T. Noda y H. Ichijo, «ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis,» *EMBO Rep*, vol. 2, n° 3, pp. 222-228, 2001.
- [17] K. Sinha, J. Das, P. B. Pal y P. C. Sil, «Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis,» *Arch Toxicol*, vol. 87, n° 7, pp. 1157-1180, 2013.
- [18] F. Bagheri, V. Khorrami, A. M. Alizadeh, S. Khalighfard, S. Khodayari y H. Khodayari, «Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies,» *Life Sci*, vol. 165, pp. 43-55, 2016.
- [19] D. Wang, T. Chen y F. Liu, «Betulinic acid alleviates myocardial hypoxia/reoxygenation injury via inducing Nrf2/HO-1 and inhibiting p38 and JNK pathways,» *Eur J Pharmacol*, vol. 838, pp. 53-59, 2018.

- [20] W. Guo, X. Liu, J. Li, Y. Shen, Z. Zhou, M. Wang, Y. Xie, X. Feng, L. Wang y X. Wu, «Prdx1 alleviates cardiomyocyte apoptosis through ROS-activated MAPK pathway during myocardial ischemia/reperfusion injury,» *Int J Biol Macromol*, vol. 112, pp. 608-615, 2018.
- [21] A. R. Pinto, A. Ilinykh, M. J. Ivey, J. T. Kuwabara, M. L. D'Antoni, R. Debuque, A. Chandran, L. Wang, K. Arora, N. A. Rosenthal y M. D. Tallquist, «Revisiting cardiac cellular composition,» *Circ Res*, vol. 118, n° 3, pp. 400-409, 2016.
- [22] E. Tarbit, I. Singh, J. N. Peart y R. B. Rose'Meyer, «Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells,» *Heart Fail Rev*, vol. 24, n° 1, pp. 1-15, 2019.
- [23] T. Moore-Morris, P. Cattaneo, M. Puceat y S. M. Evans, «Origins of cardiac fibroblasts,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 91, pp. 1-5, 2016.
- [24] R. P. Visconti y R. R. Markwald, «Recruitment of new cells into the postnatal heart: potential modification of phenotype by periostin,» *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1080, n° 1, pp. 19-33, 2006.
- [25] N. G. Frangogiannis, «Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities,» *Mol Aspects Med*, vol. 65, pp. 70-99, 2019.
- [26] A. V. Shinde y N. G. Frangogiannis, «Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 70, pp. 74-82, 2014.
- [27] D. A. Chistiakov, A. N. Orekhov y Y. V. Bobryshev, «The role of cardiac fibroblasts in post-myocardial heart tissue repair,» *Exp Mol Pathol*, vol. 101, n° 2, pp. 231-240, 2016.
- [28] V. Braunersreuther, F. Montecucco, M. Asrih, G. Pelli, K. Galan, M. Frias, F. Burger, A. L. Quinderé, C. Montessuit, K. H. Krause, F. Mach y V. Jaquet, «Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 64, pp. 99-107, 2013.
- [29] L. Yang, Y. Zhang, M. Zhu, Q. Zhang, X. Wang, Y. Wang, J. Zhang, J. Li, L. Yang, J. Liu, F. Liu, Y. Yang, L. Kang, Y. Shen y Z. Qi, «Resveratrol attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through upregulation of vascular endothelial growth factor B,» *Free Radic Biol Med*, vol. 101, pp. 1-9, 2016.

- [30] Y. Zhou, A. M. Richards y P. Wang, «Characterization and Standardization of Cultured Cardiac Fibroblasts for ex vivo Models of Heart Fibrosis and Heart Ischemia,» *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 23, n° 7, pp. 422-433, 2017.
- [31] R. Vivar, C. Humeres, P. Ayala, I. Olmedo, M. Catalán, L. García, S. Lavandero y G. Díaz-Araya, «TGF- β 1 prevents simulated ischemia/reperfusion-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of both canonical and non-canonical signaling pathways,» *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, vol. 1832, n° 6, pp. 754-762, 2013.
- [32] R. Vivar, C. Humeres, M. Varela, P. Ayala, N. Guzmán, I. Olmedo, M. Catalán, P. Boza, C. Muñoz y G. Díaz-Araya, «Cardiac fibroblast death by ischemia/reperfusion is partially inhibited by IGF-1 through both PI3K/Akt and MEK-ERK pathways,» *Exp Mol Pathol*, vol. 93, n° 1, pp. 1-7, 2012.
- [33] C. Lefort, L. Benoist, S. Chadet, M. Piollet, A. Heraud, D. Babuty, C. Baron, F. Ivanès y D. Angoulvant, «Stimulation of P2Y₁₁ receptor modulates cardiac fibroblasts secretome toward immunomodulatory and protective roles after Hypoxia/Reoxygenation injury,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 121, pp. 212-222, 2018.
- [34] J. T. Colston, S. D. de la Rosa y G. L. Freeman, «Impact of brief oxidant stress on primary adult cardiac fibroblasts,» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 316, n° 1, pp. 256-262, 2004.
- [35] A. Agocha, H. W. Lee y M. Eghbali-Webb, «Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 29, n° 8, pp. 2233-2244, 1997.
- [36] K. G. Shyu, B. W. Wang, W. J. Chen, P. Kuan y C. M. Lin, «Angiotensin II mediates urotensin II expression by hypoxia in cultured cardiac fibroblast,» *Eur J Clin Invest*, vol. 42, n° 1, pp. 17-26, 2012.
- [37] J. L. Grobe, S. Der Sarkissian, J. M. Stewart, J. G. Meszaros, M. K. Raizada y M. J. Katovich, «ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts,» *Clin Sci*, vol. 113, n° 8, pp. 357-364, 2007.

- [38] S. M. Davidson, P. Ferdinandy, I. Andreadou, H. E. Bøtker, G. Heusch, B. Ibáñez, M. Ovize, R. Schulz, D. M. Yellon, D. J. Hausenloy y D. Garcia-Dorado, «Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury,» *J Am Coll Cardiol*, vol. 73, nº 1, pp. 89-99, 2019.
- [39] G. Heusch, «Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning,» *Circ Res*, vol. 116, nº 4, pp. 674-699, 2015.
- [40] T. Ha, F. Hua, X. Liu, J. Ma, J. R. McMullen, T. Shioi, S. Izumo, J. Kelley, X. Gao, W. Browder, D. L. Williams, R. L. Kao y C. Li, «Lipopolysaccharide-induced myocardial protection against ischaemia/reperfusion injury is mediated through a PI3K/Akt-dependent mechanism,» *Cardiovasc Res*, vol. 78, nº 3, pp. 546-553, 2008.
- [41] Y. W. Yao, G. H. Zhang, Y. Y. Zhang, W. D. Li, C. H. Wang, C. Y. Yin y F. M. Zhang, «Lipopolysaccharide pretreatment protects against ischemia/reperfusion injury via increase of HSP70 and inhibition of NF- κ B,» *Cell Stress Chaperones*, vol. 16, nº 3, pp. 287-296, 2011.
- [42] B. Ibáñez, G. Heusch, M. Ovize y F. Van de Werf, «Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury,» *J Am Coll Cardiol*, vol. 65, nº 14, pp. 1454-1471, 2015.
- [43] D. Schulman, D. S. Latchman y D. M. Yellon, «Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/ p44 MAPK signaling pathway,» *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 283, p. H1481–H1488, 2002.
- [44] X. Rossello y D. M. Yellon, «The RISK pathway and beyond,» *Basic Res Cardiol*, vol. 113, nº 1, p. 2, 2017.
- [45] M. Juhaszova, D. B. Zorov, Y. Yaniv, H. B. Nuss, S. Wang y S. J. Sollott, «Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection,» *Circ Res*, vol. 104, nº 11, pp. 1240-1252, 2009.
- [46] S. Ekeløf, S. E. Jensen, J. Rosenberg y I. Gögenur, «Reduced oxidative stress in STEMI patients treated by primary percutaneous coronary intervention and with antioxidant therapy: a systematic review,» *Cardiovasc Drugs Ther*, vol. 28, nº 2, pp. 173-181, 2014.
- [47] S. Cadenas, «ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection,» *Free Radic Biol Med*, vol. 117, pp. 76-89, 2018.

- [48] V. H. Guaiquil, D. W. Golde, D. L. Beckles, E. J. Mascareno y M. A. Siddiqui, «Vitamin C inhibits hypoxia-induced damage and apoptotic signaling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts,» *Free Radic Biol Med*, vol. 37, n° 9, pp. 1419-1429, 2004.
- [49] M. Eguchi, M. Fujiwara, Y. Mizukami y N. Miwa, «Cytoprotection by pro-vitamin C against ischemic injuries in perfused rat heart together with differential activation of MAP kinase family,» *J Cell Biochem*, vol. 89, n° 5, pp. 863-867, 2003.
- [50] J. Hao, W. W. Li, H. Du, Z. F. Zhao, F. Liu, J. C. Lu, X. C. Yang y W. Cui, «Role of vitamin C in cardioprotection of ischemia/reperfusion injury by activation of mitochondrial KATP channel,» *Chem Pharm Bull*, vol. 64, n° 6, pp. 548-557, 2016.
- [51] Y. Nishinaka, S. Sugiyama, M. Yokota, H. Saito y T. Ozawa, «The effects of a high dose of ascorbate on ischemia-reperfusion-induced mitochondrial dysfunction in canine hearts,» *Heart Vessels*, vol. 7, n° 1, pp. 18-23, 1992.
- [52] S. Basili, G. Tanzilli, E. Mangieri, V. Raparelli, S. Di Santo, P. Pignatelli y F. Violi, «Intravenous ascorbic acid infusion improves myocardial perfusion grade during elective percutaneous coronary intervention: relationship with oxidative stress markers,» *JACC Cardiovasc Interv*, vol. 3, n° 2, pp. 221-229, 2010.
- [53] Z. J. Wang, W. K. Hu, Y. Y. Liu, D. M. Shi, W. J. Cheng, Y. H. Guo, Q. Yang, Y. X. Zhao y Y. J. Zhou, «The effect of intravenous vitamin C infusion on periprocedural myocardial injury for patients undergoing elective percutaneous coronary intervention,» *Can J Cardiol*, vol. 30, n° 1, pp. 96-101, 2014.
- [54] N. Valls, J. G. Gormaz, R. Aguayo, J. González, R. Brito, D. Hasson, M. Libuy, C. Ramos, R. Carrasco, J. C. Prieto, G. Dussailant, Á. Puentes, V. Noriega y R. Rodrigo, «Amelioration of persistent left ventricular function impairment through increased plasma ascorbate levels following myocardial infarction,» *Redox Rep*, vol. 21, n° 2, pp. 75-83, 2016.
- [55] A. Spoelstra-de Man, P. Elbers y H. M. Oudemans-van Straaten, «Making sense of early high-dose intravenous vitamin C in ischemia/reperfusion injury,» *Crit Care*, vol. 22, n° 1, p. 70, 2018.
- [56] G. Calvaruso, A. Vitrano, R. Di Maggio, E. Lai, G. Colletta, A. Quota, C. Gerardi, L. C. Rigoli, M. Sacco, L. Pitrolo y A. Maggio, «Deferiprone versus deferoxamine in thalassemia intermedia:

Results from a 5-year long-term Italian multicenter randomized clinical trial,» *Am J Hematol*, vol. 90, n° 7, pp. 634-638, 2015.

- [57] G. Ambrosio, J. L. Zweier, W. E. Jacobus, M. L. Weisfeldt y J. T. Flaherty, «Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury,» *Circulation*, vol. 76, n° 4, pp. 906-915, 1987.
- [58] G. W. Mergner, W. B. Weglicki y J. H. Kramer, «Postischemic free radical production in the venous blood of the regionally ischemic swine heart. Effect of deferoxamine,» *Circulation*, vol. 84, n° 5, pp. 2079-2090, 1991.
- [59] R. E. Williams, J. L. Zweier y J. T. Flaherty, «Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts,» *Circulation*, vol. 83, n° 3, pp. 1006-1014, 1991.
- [60] P. Dobsák, J. Siegelova, J. E. Wolf, L. Rochette, J. C. Eicher, J. Vasku, S. Kuchtickova y M. Horky, «Prevention of apoptosis by deferoxamine during 4 hours of cold cardioplegia and reperfusion: in vitro study of isolated working rat heart model,» *Pathophysiology*, vol. 9, n° 1, pp. 27-32, 2002.
- [61] B. R. Reddy, R. A. Kloner y K. Przyklenk, «Early treatment with deferoxamine limits myocardial ischemic/reperfusion injury,» *Free Radic Biol Med*, vol. 7, n° 1, pp. 45-52, 1989.
- [62] E. J. Lesnefsky, J. E. Repine y L. D. Horwitz, «Deferoxamine pretreatment reduces canine infarct size and oxidative injury,» *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 253, n° 3, pp. 1103-1109, 1990.
- [63] S. Kobayashi, H. Tadokoro, Y. Wakida, S. Kar, R. Nordlander, R. V. Haendchen y E. Corday, «Coronary venous retroinfusion of deferoxamine reduces infarct size in pigs,» *J Am Coll Cardiol*, vol. 18, n° 2, pp. 621-627, 1991.
- [64] I. A. Paraskevaïdis, E. K. Iliodromitis, D. Vlahakos, D. P. Tsiapras, A. Nikolaidis, A. Marathias, A. Michalis y D. T. Kremastinos, «Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance,» *Eur Heart J*, vol. 26, n° 3, pp. 263-270, 2005.

- [65] Y. W. Peng, C. L. Buller y J. R. Charpie, «Impact of N-acetylcysteine on neonatal cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury,» *Pediatr Res*, vol. 70, n° 1, pp. 61-66, 2011.
- [66] M. Abe, Y. Takiguchi, S. Ichimaru, K. Tsuchiya y K. Wada, «Comparison of the protective effect of N-acetylcysteine by different treatments on rat myocardial ischemia-reperfusion injury,» *J Pharmacol Sci*, vol. 106, n° 4, pp. 571-577, 2008.
- [67] T. Wang, X. Mao, H. Li, S. Qiao, A. Xu, J. Wang, S. Lei, Z. Liu, K. F. Ng, G. T. Wong, P. M. Vanhoutte, M. G. Irwin y Z. Xia, «N-Acetylcysteine and allopurinol up-regulated the Jak/STAT3 and PI3K/Akt pathways via adiponectin and attenuated myocardial postischemic injury in diabetes,» *Free Radic Biol Med*, vol. 63, pp. 291-303, 2013.
- [68] H. K. Saini-Chohan y N. S. Dhalla, «Attenuation of ischemia–reperfusion-induced alterations in intracellular Ca²⁺ in cardiomyocytes from hearts treated with N-acetylcysteine and N-mercaptopropionylglycine,» *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 87, n° 12, pp. 1110-1119, 2009.
- [69] T. Şentürk, S. Çavun, B. Avcı, A. Yermezler, Z. Serdar y V. Savcı, «Effective inhibition of cardiomyocyte apoptosis through the combination of trimetazidine and N-acetylcysteine in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion injury,» *Atherosclerosis*, vol. 237, n° 2, pp. 760-766, 2014.
- [70] Y. Nozari, A. Eshraghi, A. H. Talasaz, M. Bahremand, J. Salamzadeh, M. Salarifar, H. Pourhosseini, A. Jalali y S. H. Mortazavi, «Protection from Reperfusion Injury with Intracoronary N-Acetylcysteine in Patients with STEMI Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention in a Cardiac Tertiary Center,» *Am J Cardiovasc Drugs*, vol. 18, n° 3, pp. 213-221, 2018.
- [71] H. Thiele, L. Hildebrand, C. Schirdewahn, I. Eitel, V. Adams, G. Fuernau, S. Erbs, A. Linke, K. W. Diederich, M. Nowak, S. Desch, M. Gutberlet y G. Schuler, «Impact of high-dose N-acetylcysteine versus placebo on contrast-induced nephropathy and myocardial reperfusion injury in unselected patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention,» *J Am Coll Cardiol*, vol. 55, n° 20, pp. 2201-2209, 2010.
- [72] A. Phaelante, L. E. Rohde, A. Lopes, V. Olsen, S. A. Tobar, C. Cohen, N. Martinelli, A. Biolo, F. Dal-Pizzol, N. Clausell y M. Andrades, «N-acetylcysteine Plus Deferoxamine Improves Cardiac Function in Wistar Rats After Non-reperfused Acute Myocardial Infarction,» *J Cardiovasc Transl Res*, vol. 8, n° 5, pp. 328-337, 2015.

- [73] A. Karahaliou, C. Katsouras, V. Koulouras, D. Nikas, D. Niokou, G. Papadopoulos, G. Nakos, D. Sideris y L. Michalis, «Ventricular arrhythmias and antioxidative medication: experimental study,» *Hellenic J Cardiol*, vol. 49, n° 5, pp. 320-328, 2008.
- [74] G. N. Chatziathanasiou, D. N. Nikas, C. S. Katsouras, N. D. Kazakos, V. Bouba, T. Vougiouklakis, K. K. Naka y L. K. Michalis, «Combined intravenous treatment with ascorbic acid and desferrioxamine to reduce myocardial reperfusion injury in an experimental model resembling the clinical setting of primary PCI,» *Hellenic J Cardiol*, vol. 53, n° 3, pp. 195-204, 2012.
- [75] F. Gao, C. L. Yao, E. Gao, Q. Z. Mo, W. L. Yan, R. McLaughlin, B. L. Lopez, T. A. Christopher y X. L. Ma, «Enhancement of glutathione cardioprotection by ascorbic acid in myocardial reperfusion injury,» *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 301, n° 2, pp. 543-550, 2002.
- [76] D. N. Nikas, G. Chatziathanasiou, A. Kotsia, N. Papamichael, C. Thomas, M. Papafaklis, K. K. Naka, N. Kazakos, H. J. Milionis, K. Vakalis, C. S. Katsouras, V. Mpoumpa, T. Vougiouklakis y L. Michalis, «Effect of intravenous administration of antioxidants alone and in combination on myocardial reperfusion injury in an experimental pig model,» *Curr Ther Res Clin Exp*, vol. 69, n° 5, pp. 423-439, 2008.
- [77] J. González-Montero, R. Brito, A. Gajardo y R. Rodrigo, «Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities,» *World J Cardiol*, vol. 10, n° 9, pp. 74-86, 2018.
- [78] J. M. May, Z. C. Qu, D. R. Neel y X. Li, «Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells,» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1640, n° 2-3, pp. 153-161, 2003.
- [79] M. Levine, S. J. Padayatty y M. G. Espey, «Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries,» *Adv Nutr*, vol. 2, n° 2, pp. 78-88, 2011.
- [80] E. Mendoza-Torres, J. A. Riquelme, A. Vielma, A. R. Sagredo, L. Gabrielli, R. Bravo-Sagua, J. E. Jalil, B. A. Rothermel, G. Sanchez, M. P. Ocaranza y S. Lavandero, «Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1-9) through an AT2R and Akt-dependent mechanism.,» *Pharmacol Res*, vol. 135, pp. 112-121, 2018.
- [81] M. Chen, M. Zhang, X. Zhang, J. Li, Y. Wang, Y. Fan y R. Shi, «Limb ischemic preconditioning protects endothelium from oxidative stress by enhancing nrf2 translocation and upregulating expression of antioxidases,» *PLoS One*, vol. 10, n° 6, p. e0128455, 2015.

- [82] Q. Chen, M. G. Espey, A. Y. Sun, J. H. Lee, M. C. Krishna, E. Shacter, P. L. Choyke, C. Pooput, K. L. Kirk, G. R. Buettner y M. Levine, «Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo,» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 104, n° 21, pp. 8749-8754, 2007.
- [83] G. Wang, T. Yin y Y. Wang, «In vitro and in vivo assessment of high-dose vitamin C against murine tumors,» *Exp Ther Med*, vol. 12, n° 5, pp. 3058-3062, 2016.
- [84] Y. Ma, J. Chapman, M. Levine, K. Polireddy, J. Drisko y Q. Chen, «High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy.,» *Sci Transl Med*, vol. 6, n° 222, p. 222ra18, 2014.
- [85] C. A. Molyneux, M. C. Glyn y B. J. Ward, «Oxidative stress and cardiac microvascular structure in ischemia and reperfusion: the protective effect of antioxidant vitamins,» *Microvasc Res*, vol. 64, n° 2, pp. 265-277, 2002.
- [86] R. J. Tallarida, «Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism,» *Genes Cancer*, vol. 2, n° 11, p. 1003–1008, 2011.
- [87] D. Liu, «Effects of procyanidin on cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia reperfusion in rats,» *BMC Cardiovasc Disord*, vol. 18, n° 1, p. 35, 2018.
- [88] S. W. Ryter, H. P. Kim, A. Hoetzel, J. W. Park, K. Nakahira, X. Wang y A. M. Choi, «Mechanisms of cell death in oxidative stress.,» *Antioxid Redox Signal*, vol. 9, n° 1, pp. 49-89, 2007.
- [89] J. Zhang, X. Wang, V. Vikash, Q. Ye, D. Wu, Y. Liu y W. Dong, «ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling,» *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2016, p. 4350965, 2016.
- [90] Y. Yin, Y. Guan, J. Duan, G. Wei, Y. Zhu, W. Quan, C. Guo, D. Zhou, Y. Wang, M. Xi y A. Wen, «Cardioprotective effect of Danshensu against myocardial ischemia/reperfusion injury and inhibits apoptosis of H9c2 cardiomyocytes via Akt and ERK1/2 phosphorylation,» *Eur J Pharmacol*, vol. 699, n° 1-3, pp. 219-226, 2013.
- [91] X. Rossello, J. A. Riquelme, S. M. Davidson y D. M. Yellon , «Role of PI3K in myocardial ischaemic preconditioning: mapping pro-survival cascades at the trigger phase and at reperfusion,» *J Cell Mol Med*, vol. 22, n° 2, pp. 926-935, 2018.

- [92] D. Wang, T. Chen y F. Liu, «Betulinic acid alleviates myocardial hypoxia/reoxygenation injury via inducing Nrf2/HO-1 and inhibiting p38 and JNK pathways,» *Eur J Pharmacol*, vol. 838, pp. 53-59, 2018.
- [93] S. Toldo, D. G. Breckenridge, E. Mezzaroma, B. W. Van Tassell, J. Shryock, H. Kannan, D. Phan, G. Budas, D. Farkas, E. Lesnefsky, N. Voelkel y A. Abbate, «Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in the mouse,» *J Am Heart Assoc*, vol. 5, n° e002360, p. 1, 2012.
- [94] P. Zhu, M. Yang, H. He, Z. Kuang, M. Liang, A. Lin, S. Liang, Q. Wen, Z. Cheng y C. Sun, «Curcumin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by downregulating Notch signaling,» *Mol Med Rep*, vol. 20, n° 2, pp. 1541-1550, 2019.
- [95] D. W. Sun, Q. Gao y X. Qi, «Danshensu Ameliorates Cardiac Ischaemia Reperfusion Injury through Activating Sirt1/FoxO1/Rab7 Signal Pathway,» *Chin J Integr Med*, 2019.
- [96] C. Humeres, R. Vivar, P. Boza, C. Muñoz, S. Bolivar, R. Anfossi, J. M. Osorio, F. Olivares-Silva, L. García y G. Díaz-Araya, «Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 101, pp. 69-80, 2016.
- [97] M. F. Wu, T. Stachon, B. Seitz, A. Langenbacher y N. Szentmáry, «Effect of human autologous serum and fetal bovine serum on human corneal epithelial cell viability, migration and proliferation in vitro,» *Int J Ophthalmol*, vol. 10, n° 6, pp. 908-913, 2017.
- [98] I. Olmedo, C. Muñoz, N. Guzmán, M. Catalán, R. Vivar, P. Ayala, C. Humeres, P. Aránguiz, L. García, V. Velarde y G. Díaz-Araya, «EPAC expression and function in cardiac fibroblasts and myofibroblasts,» *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 272, n° 2, pp. 414-422, 2013.
- [99] J. T. Colston, S. D. de la Rosa y G. L. Freeman, «Impact of brief oxidant stress on primary adult cardiac fibroblasts,» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 316, n° 1, pp. 256-262, 2004.
- [100] T. R. Hurd, M. DeGennaro y R. Lehmann, «Redox regulation of cell migration and adhesion,» *Trends Cell Biol*, vol. 22, n° 2, p. 107-115, 2012.

- [101] A. V. Shinde, C. Humeres y N. G. Frangogiannis, «The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling,» *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, vol. 1863, n° 1, pp. 298-309, 2017.
- [102] R. B. Driesen, C. K. Nagaraju, J. Abi-Char, T. Coenen, P. J. Lijnen, R. H. Fagard, K. R. Sipido y V. V. Petrov, «Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts,» *Cardiovasc Res*, vol. 101, n° 3, pp. 411-422, 2014.
- [103] D. Xing y J. A. Bonanno, «Hypoxia reduces TGF β 1-induced corneal keratocyte myofibroblast transformation,» *Mol Vis*, vol. 15, pp. 1827-1834, 2009.
- [104] Z. Yan, D. Shen, J. Liao, Y. Zhang, Y. Chen, G. Shi y F. Gao, «Hypoxia Suppresses TGF-B1-Induced Cardiac Myocyte Myofibroblast Transformation by Inhibiting Smad2/3 and Rhoa Signaling Pathways,» *Cell Physiol Biochem*, vol. 45, n° 1, pp. 250-257, 2018.
- [105] Q. Shu, S. Lai, X. M. Wang, Y. L. Zhang, X. L. Yang, H. L. Bi y H. H. Li, «Administration of ubiquitin-activating enzyme UBA1 inhibitor PYR-41 attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling in mice,» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 505, n° 1, pp. 317-324, 2018.
- [106] H. X. Wang, W. J. Li, C. L. Hou, S. Lai, Y. L. Zhang, C. Tian, H. Yang, J. Du y H. H. Li, «CD1d-dependent natural killer T cells attenuate angiotensin II-induced cardiac remodelling via IL-10 signalling in mice,» *Cardiovasc Res*, vol. 115, n° 1, pp. 83-93, 2019.
- [107] H. P. Tian, Y. H. Sun, L. He, Y. F. Yi, X. Gao y D. L. Xu, «Single-stranded DNA-binding protein 1 abrogates cardiac fibroblast proliferation and collagen expression induced by angiotensin II,» *Int Heart J*, vol. 59, n° 6, pp. 1398-1408, 2018.
- [108] C. Yu, W. Wang y X. Jin, «Hirudin Protects Ang II-Induced Myocardial Fibroblasts Fibrosis by Inhibiting the Extracellular Signal-Regulated Kinase1/2 (ERK1/2) Pathway,» *Med Sci Monit*, vol. 8, pp. 6264-6272, 2018.
- [109] D. A. Siwik, P. J. Pagano y W. S. Colucci, «Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts,» *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 280, n° 1, pp. C53-60, 2001.
- [110] A. Agocha, H. W. Lee y M. Eghbali-Webb, «Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth

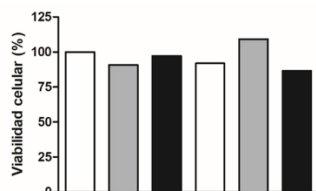
factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor,» *J Mol Cell Cardiol*, vol. 29, n° 8, pp. 2233-2244, 1997.

- [111] K. G. Shyu, B. W. Wang, W. J. Chen, P. Kuan y C. M. Lin, «Angiotensin II mediates urotensin II expression by hypoxia in cultured cardiac fibroblast.,» *Eur J Clin Invest*, vol. 42, n° 1, pp. 17-26, 2012.
- [112] J. L. Grobe, S. Der Sarkissian, J. M. Stewart, J. G. Meszaros, M. K. Raizada y M. J. Katovich, «ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts,» *Clin Sci*, vol. 113, n° 8, pp. 357-364, 2007.
- [113] Z. Ali y S. B. Bhaskar, «Basic statistical tools in research and data analysis,» *Indian J Anaesth*, vol. 60, n° 9, p. 662–669, 2016.
- [114] M. Noordzij, F. W. Dekker, C. Zoccali y K. J. Jager, «Sample size calculations,» *Nephron Clin Pract*, vol. 118, n° 4, pp. c319-23, 2011.
- [115] F. Hua, T. Ha, J. Ma, Y. Li, J. Kelley, X. Gao, I. W. Browder, R. L. Kao, D. L. Williams y C. Li, «Protection against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism,» *J Immunol*, vol. 178, n° 11, pp. 7317-7324, 2007.
- [116] Y. Yang, J. Lv, S. Jiang, Z. Ma, D. Wang, W. Hu, C. Deng, C. Fan, S. Di, Y. Sun y W. Yi, «The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation,» *Cell Death Dis*, vol. 7, n° 5, p. e2234, 2016.

12. ANEXOS

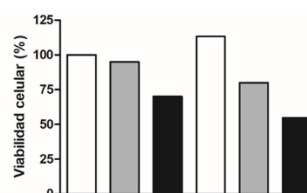
ANEXO 1

A)



DMEM-F12 (6 h)	+	-	-	+	-	-
Medio Control (6 h)	-	+	-	-	+	-
Medio Isquémico (6 h)	-	-	+	-	-	+
Aire 95% / CO ₂ 5% (6 h)	+	+	+	-	-	-
Nitrógeno 100 % (6 h)	-	-	-	+	+	+

B)



DMEM-F12 (22 h)	+	-	-	+	-	-
Medio Control (22 h)	-	+	-	-	-	-
Medio Isquémico (6 h) + DMEM-F12 (16 h)	-	-	+	-	-	+
Medio Control (6 h) + DMEM-F12 (16 h)	-	-	-	-	+	-
Aire 95% / CO ₂ 5% (22 h)	+	+	+	-	-	-
Nitrógeno 100 % (6 h) + Aire 95% / CO ₂ 5% (16 h)	-	-	-	+	+	+

Figura Suplementaria 1. Estudios preliminares sobre los efectos de las diferentes condiciones de normoxia, isquemia simulada e isquemia/reperfusión simulada sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos. (A) Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a diferentes condiciones de isquemia simulada (nitrógeno 100% por 6 horas) y de normoxia (aire 95% / CO₂ 5% por 6 horas). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células en DMEM-F12 + ambiente de aire 95% / CO₂ 5% por conteo celular con exclusión por azul de tripán (n = 1). (B) Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a diferentes condiciones de isquemia/reperfusión simulada (nitrógeno 100% por 6 horas + aire 95% / CO₂ 5% por 16 horas) y de normoxia (aire 95% / CO₂ 5% por 22 horas). La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células en DMEM-F12 (22 horas) + ambiente de aire 95% / CO₂ 5% (22 horas) por conteo celular con exclusión por azul de tripán (n = 1). El Medio Control (pH = 7.4) contiene: HEPES (25 mM), D-glucosa (11 mM), NaCl (115 mM), KCl (4.7 mM), MgCl₂•6H₂O (1.2 mM), CaCl₂•2H₂O (2 mM).

A)

B)

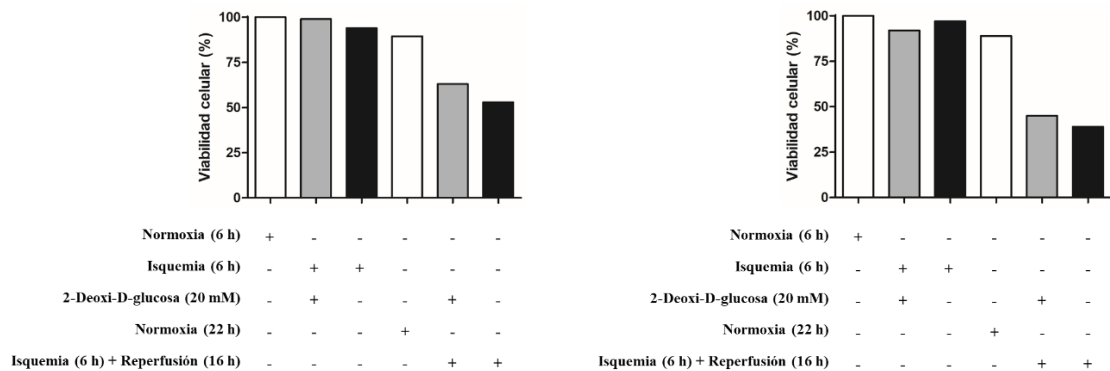
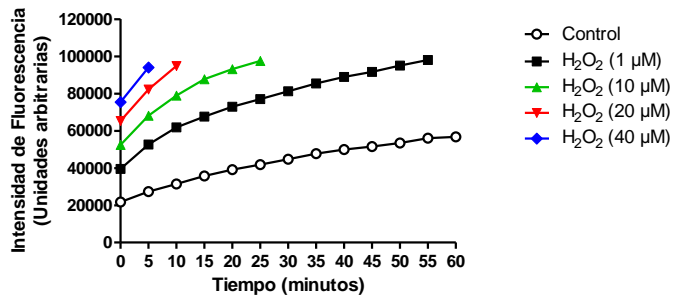


Figura Suplementaria 2. Estudios preliminares sobre el efecto de la 2-deoxi-D-glucosa en las condiciones de isquemia simulada e isquemia/reperusión simulada sobre la viabilidad de los fibroblastos cardiacos. (A y B) Los fibroblastos cardiacos fueron expuestos a 6 horas de isquemia simulada en presencia/ausencia de 2-Deoxi-D-glucosa (20 mM) en la isquemia simulada, y a 6 horas de isquemia simulada seguidas de 16 horas de reperusión simulada en presencia/ausencia de 2-Deoxi-D-glucosa en la isquemia simulada. La viabilidad celular fue cuantificada como porcentaje (%) respecto del número de células tras 6 horas de normoxia por conteo celular con exclusión por azul de tripán (n = 1 en **A** y **B**).

ANEXO 2

A)



B)

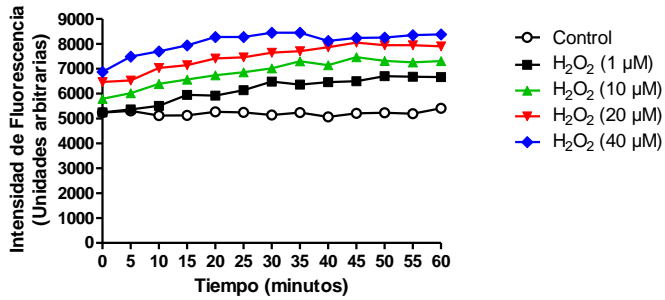


Figura Suplementaria 3. Evaluación preliminar de la sensibilidad de la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato en medio de cultivo y en fibroblastos cardiacos incubados con ella frente a estímulos de peróxido de hidrógeno a distintas concentraciones. (A) La sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) a 20 μM fue agregada al medio de cultivo y luego de 45 minutos se agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 1, 10, 20 y 40 μM separadamente. **(B)** Los fibroblastos cardiacos se incubaron por 45 minutos con la sonda DCFH-DA (20 μM) y luego fueron estimulados con H₂O₂ a 1, 10, 20 y 40 μM. La generación de ROS fue medida como la intensidad de fluorescencia en el tiempo durante 60 minutos con lecturas cada 5 minutos. Se consideró el promedio del duplicado de cada condición (n = 1).

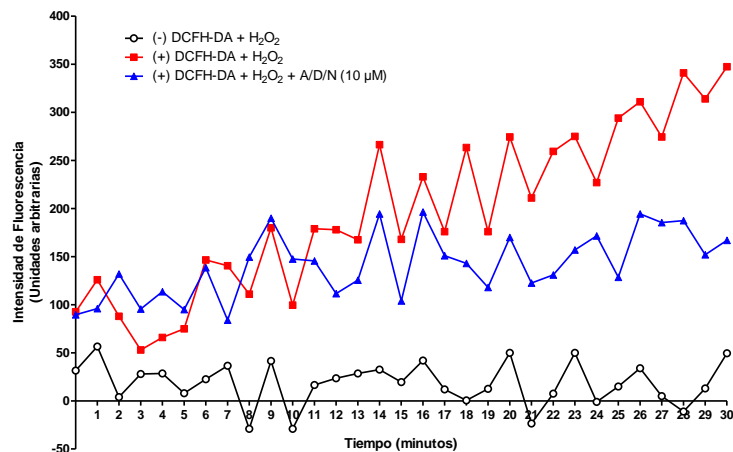


Figura Suplementaria 4. Evaluación preliminar del efecto antioxidante de la asociación de ácido ascórbico/deferroxamina/N-acetilcisteína, a 10 μM cada uno, en fibroblastos cardiacos estimulados con peróxido de hidrógeno. Los fibroblastos cardiacos fueron incubados con 20 μM de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) por 45 minutos y luego fueron estimulados con 10 μM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Inmediatamente después, las células fueron tratadas con A/D/N usando 10 μM de cada antioxidante. La generación de ROS intracelular fue medida como la intensidad de fluorescencia en el tiempo durante 30 minutos con lecturas cada 1 minuto. Se consideró el promedio del duplicado de cada condición ($n = 1$).

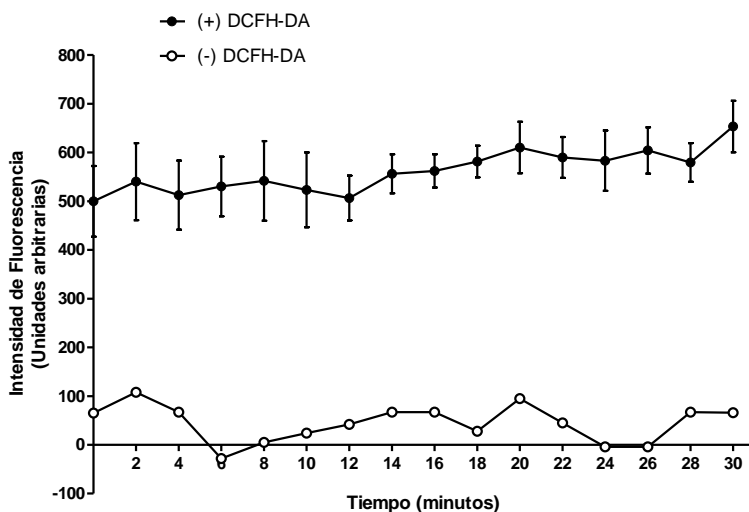


Figura Suplementaria 5. Intensidad de fluorescencia de los fibroblastos cardiacos incubados con 2',7'-diclorofluorescina diacetato en condiciones de normoxia. Luego de 6 horas en condiciones de normoxia, los fibroblastos cardiacos fueron incubados con 20 μM de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) por 45 minutos y luego se procedió a evaluar la generación de ROS intracelular como la intensidad de fluorescencia en el tiempo durante 30 minutos. Se consideró el promedio del duplicado de la condición de normoxia ($n = 3$).