



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

IGF-1 PREVIENE LA PÉRDIDA DE VIABILIDAD DE FIBROBLASTOS CARDIACOS DE RATAS
NEONATAS SOMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN SIMULADA.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

CLAUDIO DIEGO HUMERES MARTINEZ

Patrocinante : Dr. Guillermo Díaz-Araya

Directores de tesis : Dr. Guillermo Díaz-Araya

Raúl Vivar Sánchez

Santiago, Chile 2011

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia; por su apoyo incondicional, durante toda mi carrera profesional y especialmente durante este episodio final. Siempre estuvieron presentes y espero que mediante mi desarrollo como futuro profesional, pueda retribuirles las esperanzas y esfuerzos puestos en mi persona.

Junto a lo anterior, quiero agradecer al Dr. Guillermo Díaz, por haberme aceptado a trabajar en su laboratorio. Fue gracias a su confianza y ayuda que termine por convencerme de que la ciencia es lo que me interesa y apasiona. Mis sinceros agradecimientos y espero poder seguir en contacto con usted ya sea como su alumno o amigo.

Muchas gracias a todos los integrantes “fibros”, Raúl, Pedro, Ivonne, Mabel, Yenni, Gaby, Marcelo y Nancy porque creo que son un grupo increíble de personas; de los cuales no solo aprendí en el día a día, sino que además me reí y disfrute de los momentos de ocio que ocurrían “solo” ocasionalmente. Quisiera agradecer en particular a mi tutor de tesis, Raúl, el cual siempre demostró paciencia e interés en enseñarme y resolver mis dudas. Honestamente creo que esta experiencia de tesis hubiese sido muy distinta si no hubiese contando con su ayuda y conocimientos. Siempre tendré presente que haya dedicado parte de su tiempo en conducir mis experimentos y que lo haga de tan buena manera.

No puedo dejar de mencionar a otras personas muy importantes que me ayudaron a hacer mis experimentos y a los cuales les deseo lo mejor en sus proyectos: Maestrazo Fidel, Ruth, Dani y Ceci. Sin ustedes no me habría resultado nada jaja.

Finalmente agradecer a mis compañeros y amigos de la carrera de farmacia: Liz, Nancy, Jaime, Daniel, Maribel, Coni, Lili Jime, Fabian, Isa, Cartawa, Cata, Rosita, Ruby y Vivi. Así como también a la Meche por su amistad incondicional a todas las situaciones. Con ustedes viví todo tipo de momentos y disfrute de unos muy buenos carretes.

Quiero dar las gracias a todos y cada uno de los que me ayudaron en este camino y me permitieron alcanzar mis metas. Espero poder continuar con su apoyo en lo que se venga para mi..... Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
1.INTRODUCCIÓN	11
1.1. Generalidades	11
1.2. Corazón	11
1.3. Fibroblastos cardíacos	11
1.4. Infarto cardíaco.....	12
1.5. Isquemia / reperfusión.....	12
1.6. Muerte celular	14
1.6.1. Tipos de muerte celular.....	14
1.6.1.1. <i>Apoptosis</i>	14
1.6.1.2. <i>Necrosis</i>	14
1.6.2. Muerte celular durante isquemia	14
1.6.3. Muerte celular durante reperfusión	15
1.6.4. Muerte celular durante I/R cardíaca.....	15
1.7. Modelos de I/R.....	16
1.8. Factor de crecimiento de tipo insulínico	17
1.8.1. Receptor de IGF-1.....	18
1.8.2. Vías de señalización activadas por IGF-1.....	19
1.9. Efectos de IGF-1 sobre I/R	20
2. HIPÓTESIS.....	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Reactivos	22
5.2. Modelo animal	22
5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas	22
5.4. Protocolo de I/R simulada.....	23
5.5. Preparación de extractos celulares totales	24
5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida	24
5.7. Electrotransferencia de proteínas	24
5.8. Western blot	25
5.9. Viabilidad por conteo celular	25
5.10. Cuantificación de la fragmentación y condensación del ADN mediante ioduro de propidio.....	26
5.11. Determinación de la actividad L-lactato deshidrogenasa	26
5.12. Análisis estadístico	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 Evaluación del efecto en la sobrevivencia de FCN sometidos a I/R simulada.	28
6.1.1. Efecto de la isquemia sobre la viabilidad.....	28
6.1.2. Efecto de I/R sobre la viabilidad.....	29
6.2. Evaluación del tipo de muerte ocasionado por I/R simulada	30
6.2.1. Determinación de la incorporación de yoduro de propidio en FCN sometidos a I/R simulada	30
6.2.2. Determinación de actividad LDH liberada por FCN sometidos a I/R	32
6.3. Efecto de IGF-1 sobre la pérdida de viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada.....	33
6.3.1. Efecto de la concentración de IGF-1 sobre la viabilidad de FCN sometidos a I/R simulada.....	34
6.3.2. Efecto del momento de estimulación con IGF-1 sobre la viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada	36
6.4. Participación de la vía PI3K/Akt y MAPK en los efectos inducidos por IGF-1 sobre la viabilidad de los FCN sometidos a I/R simulada y tratados con IGF-1	38
6.4.1. Activación de la vía PI3K/Akt en FCN sometidos a I/R y tratados con IGF-1	38

6.4.2. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt.....	41
6.4.3. Participación de la vía MAPK en los efectos inducidos por IGF-1 sobre la viabilidad de los FCN sometidos a I/R simulada	42
6.4.4. Participación de la vía ERK en FCN sometidos a I/R y tratados con IGF-1	44
7. DISCUSIÓN.....	47
7.1. Efecto de I/R sobre la viabilidad celular del FCN	47
7.2. I/R gatilla apoptosis y necrosis en FCN	50
7.3. Efecto de IGF-1 sobre pérdida de viabilidad y apoptosis inducido por I/R	53
7.4 Participación de la vía PI3K/Akt en la citoprotección otorgada por IGF-1 en FCN sometidos a I/R.....	55
7.5 Participación de la vía MEK-ERK en la citoprotección otorgada por IGF-1 en FCN sometidos a I/R.....	58
8. CONCLUSIONES.....	64
9. REFERENCIAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muerte celular inducida por isquemia	28
Figura 2. Muerte celular inducida por I/R	29
Figura 3. Fragmentación del ADN en FCN sometidos a I/R simulada.....	31
Figura 4. Actividad LDH en FCN sometidos a I/R simulada	32
Figura 5. Efecto de IGF-1 sobre la pérdida de viabilidad inducida por I/R simulada	33
Figura 6. Efecto Dosis-respuesta de IGF-1.....	35
Figura 7. Efecto del momento de estimulación con IGF-1 sobre la viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada	37
Figura 8. Activación de p-Akt en FCN sometidos a I/R y estimulados con IGF-1	40
Figura 9. Neutralización del efecto protector sobre la viabilidad por LY29042.....	41
Figura 10. Activación de p-ERK 1/2 en FCN sometidos a I/R y estimulados con IGF-1.....	43
Figura 11. Neutralización del efecto protector sobre la viabilidad por PD98059.....	44
Figura 12. Neutralización del efecto antiapoptótico por PD98059	46

ABREVIATURAS

ADN	: Ácido desoxirribonucleico
APS	: Persulfato de amonio
ATP	: Adenosina trifosfato
BSA	: Albúmina de suero de bovino
Bax	: Proteína proapoptótica de la familia Bcl-2
Bcl-2	: Proteína Antiapoptótica de la familia Bcl-2
Ca ⁺²	: Ión calcio
csp	: Cantidad suficiente para
C/R	: Control de Reperfusión
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DMEM	: Medio de mantención modificado Dulbecco
ECL	: Enhanced chemiluminescence
ERK	: Proteína quinasa regulada extracelularmente
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
FACS	: Sorteador de células activadas por fluorescencia
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero fetal de cabra
FCN	: Fibroblastos cardiacos neonatos
Fig.	: Figura
Grb2	: proteína de unión al receptor de factor de crecimiento
hr	: Hora
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
I/R	: Isquemia / Reperfusión
IGF-1	: Factor de crecimiento análogo a insulina tipo I
IGF-1R	: Receptor de IGF-1
IP ₃	: Inositol 1, 4, 5 trifosfato
IRS	: Sustrato del receptor de Insulina
IWB	: Inmuno western blot
JNK	: Kinasa N-terminal de <i>c-Jun</i>
kDa	: Kilo Dalton
LDH	: Lactato Deshidrogenasa
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógenos
min	: Minutos
mM	: Milimolar
NaCl	: Cloruro de sodio
NaOH	: Hidróxido de sodio
Na ₃ VO ₄	: Ortovanadato de sodio
NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD ⁺	: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
nm	: Nanómetro
nM	: Nanomolar

nmol	: Nanomol
PBS	: Tampón fosfato salino
PI	: Yoduro de propidio
PI3K	: Fosfoinositol-3-kinasa
PMSF	: Fenilmetilsulfonilfluoruro
RNAse	: Ribonucleasa
rpm	: Revoluciones por minuto
SD	: Desviación estándar
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturante
SEM	: Error estándar de la media
SOS	: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Acido tricloroacético
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
µg	: Microgramo
µl	: Microlitro
µM	: Micromolar
µm	: Micrómetro

RESUMEN

El daño ocasionado por la ocurrencia de un infarto cardíaco es complejo, generando la muerte celular cardíaca entre otros efectos deletéreos tanto en el periodo isquémico de falta de oxígeno y nutrientes, así como también en la posterior perfusión sanguínea. Frente a esta condición patológica los fibroblastos cardíacos son capaces de reaccionar, secretando y renovando la matriz extracelular; lo que los convierte en elementos celulares claves en la cicatrización y remodelado del tejido cardíaco dañado post-infarto al miocardio. Esto hace necesario el intentar preservar la viabilidad de estas células para una correcta cicatrización y mantención de la función cardíaca. En relación a esto se ha reportado el uso de factores de crecimiento como elementos cardioprotectores frente al daño ocasionado por I/R, entre los cuales destaca el factor de crecimiento análogo a insulina de tipo I (IGF-1); cuyas propiedades cardioprotectoras han sido reportadas frente a I/R. Sin embargo, estos efectos citoprotectores en corazón, otorgados por IGF-1 solo han sido estudiados en cardiomiocitos, por lo que sus efectos en fibroblastos cardíacos son aun desconocidos.

Nuestro trabajo estudió la capacidad de IGF-1 de proteger a los fibroblastos cardíacos de ratas neonatas sometidos a un modelo *in vitro* de I/R e indagó en las vías de transducción implicadas con esta protección. El tratamiento con IGF-1 (10 ng/mL) previno la pérdida de viabilidad y apoptosis de fibroblastos cardíacos ocasionado por el daño por I/R. Más aun, esta protección se observó al incubar con IGF-1 durante el momento de perfusión e I/R, pero no así en el período isquémico, lo que sugiere que la muerte de los fibroblastos cardíacos es causada principalmente por el daño por perfusión. Akt fue rápidamente fosforilado por IGF-1 tanto en isquemia como en perfusión, mientras que ERK 1/2 sólo se fosforiló en el momento de perfusión. La utilización de los inhibidores LY29002 y PD98059, neutralizó la protección conferida por IGF-1. Por lo que nuestros resultados demuestran que el tratamiento con IGF-1 durante la perfusión previene la muerte de los fibroblastos cardíacos sometidos a I/R mediante la activación de las vías PI3K/Akt y MEK-ERK 1/2.

SUMMARY

IGF-1 prevents viability loss of cardiac fibroblasts subjected to ischemia / reperfusion *in vitro*

Myocardial infarction causes complex injury, involving cell death among other detrimental effects in both ischemia and reperfusion periods. To face this pathological condition, cardiac fibroblasts are key cellular elements, capable of extracellular matrix secretion and renewal, allowing the healing and remodeling of damaged heart tissue post-myocardial infarction. It necessary then, to preserve the viability of these cells for a proper healing and maintenance of cardiac function. In regards to this, it has been demonstrated the use of several growth factors to protect cardiac cells from the effects of acute ischemia/reperfusion. Among these, insulin-like growth factor (IGF-1) has showed several cardioprotective properties in hearts exposed to ischemia/reperfusion. However these cytoprotective effects granted by IGF-1 have been studied only in cardiomyocytes, while their effects on cardiac fibroblasts remain unknown.

In this study we have determined the ability of IGF-1 to protect cardiac fibroblasts against simulated *in vitro* I/R injury and investigated the potential mechanisms underlying this protection. Treatment with IGF-1 (10 ng/mL) promoted a increase in cell survival against I/R dependent cell death and a decrease in apoptosis induced by this injury. Furthermore, the IGF-1 induced protection was observed with treatment at the time of reperfusion but not with IGF-1 at the time of ischemia, suggesting that cardiac fibroblast death is induced by reperfusion injury. Akt was rapidly phosphorylated by IGF-1 at both ischemia and reperfusion, but ERK 1/2 was only phosphorylated by IGF-1 at the onset of reperfusion. IGF-1 induced protection was abolished when LY294002 and PD98059 were used, suggesting that the protection is mediated via a Akt and ERK 1/2 dependent pathways. Thus, the results suggest that IGF-1 treatment at reperfusion prevents cardiac fibroblast death induced by simulated *in vitro* I/R via the activation of PI3K/Akt and MEK-ERK 1/2 pathways.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Actualmente las enfermedades cardiovasculares (enfermedades coronarias, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca, etc.) representan el 27% de la mortalidad en los países desarrollados, siendo el principal órgano afectado el corazón. Se espera que para el año 2020 estas enfermedades sean causantes del 73% de las defunciones y del 60% de la morbilidad, incluso superando a las del cáncer e infecciones (1). El deterioro en la calidad y expectativa de vida causado por estas patologías hace necesario conocer las causas de estas enfermedades a nivel celular y molecular.

1.2. Corazón

El corazón posee principalmente dos tipos celulares: células musculares contráctiles conocidas como cardiomiocitos, y células no musculares, tales como fibroblastos, células de músculo liso vascular, células endoteliales, mastocitos y células inmunes. Los fibroblastos son los más abundantes ya que representan 2/3 de la población celular del corazón. Tanto cardiomiocitos como fibroblastos son esenciales para mantener la homogeneidad estructural y funcional del corazón, al recibir señales estimuladoras e inhibitorias que regulan procesos de crecimiento, proliferación, muerte y recambio de proteínas de la matriz extracelular [2].

1.3. Fibroblastos cardíacos

Los fibroblastos cardíacos son los principales responsables de la síntesis y depósito de las proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágeno y fibronectina, formando una red tridimensional de soporte para cardiomiocitos y vasos sanguíneos [2]. Sin embargo su función no solo radica en mantener la integridad estructural de la matriz extracelular, sino que son elementos celulares muy activos que sensan cambios en el entorno celular y reaccionan frente a estímulos externos, migrando, proliferando, secretando citoquinas y factores de crecimiento con acciones autocrinas y/o paracrinas [3] y además son capaces de diferenciarse a un fenotipo mucho más activo [4]. Estas propiedades permiten al

fibroblasto cardíaco ser determinante en los cambios estructurales del miocardio y en la regulación homeostásica de la matriz extracelular, así como también les permite participar activamente en el proceso de cicatrización del corazón en estados patológicos o de daño tisular.

1.4. Infarto cardíaco

De las muchas patologías que afectan al miocardio, una de las más importantes, es el infarto miocárdico. En la ocurrencia de un infarto al miocardio, el corazón recibe un riego sanguíneo insuficiente, con daño tisular concomitante, producido por una obstrucción en una de las arterias coronarias. Al mantenerse deficiente el suministro de oxígeno y nutrientes al tejido isquémico (infarto), se comienza a producir una perpetuación del daño, llevando finalmente a la muerte celular [5]. Los productos resultantes de la destrucción del tejido por muerte celular, actúan como quimioattractantes para distintas células inflamatorias que infiltran el área dañada para poder eliminar estos restos y así comenzar a coordinar la respuesta de cicatrización. Este infiltrado activará una serie de procesos tales como proliferación de fibroblastos cardíacos; incremento en la producción y depósito de proteínas de la matriz extracelular, y diferenciación de fibroblastos cardíacos a miofibroblastos.

1.5. Isquemia-reperfusión

Posterior al evento isquémico, el organismo intenta restituir el flujo sanguíneo, entregando los nutrientes y oxígeno necesarios, para así disminuir el daño y limitar la necrosis cardíaca, lo que se conoce como perfusión sanguínea. Paradójicamente la perfusión, en su intento por restaurar la funcionalidad cardíaca, ocasiona efectos complejos e incluye efectos deletéreos, lo que se conoce como daño por perfusión. La sumatoria de los eventos ocurridos en I/R cardíaca, ocasionan una importante pérdida de cardiomiocitos por muerte celular y un debilitamiento de aquellas células sobrevivientes, alterando las demandas metabólicas que terminarán por afectar las características morfológicas y funcionales del corazón [6].

El mecanismo de muerte celular inducido por el proceso de isquemia se debe principalmente a: i) la disminución de oxígeno que provoca la detención de la cadena de fosforilación oxidativa de la mitocondria y por consecuencia la baja de ATP y el aumento compensatorio de la glicólisis anaerobia ocasionando acidosis intracelular. ii) Inhibición de bombas ATPasa dependientes, lo que genera acumulación de sodio y disminución de potasio intracelular, gatillando el hinchamiento celular. iii) Activación de la bomba reversa $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{+2}$, aumentando el calcio intracelular y activando proteasas dependientes de calcio provocando alteraciones en la contractibilidad y citoesqueleto [7]. Como resultado final de estos procesos la permeabilidad de la membrana aumenta, se pierde la homeostasis electrolítica de la célula y esta sufre de agotamiento de ATP. Finalmente, se llega a la desorganización funcional de los organelos y a la muerte celular por hinchamiento o necrosis.

El daño por reperfusión es ocasionado principalmente por radicales libres, sobrecarga de Ca^{+2} y neutrófilos que llegan desde la sangre reperfundida [6]. Producto de estos estímulos ocurren los siguientes fenómenos: i) Pérdida de la homeostasis debido a la acidosis intracelular que causa el retorno del flujo sanguíneo. ii) Recambio de electrolitos a nivel extracelular debido a la reperfusión que ocasiona un gradiente osmótico que ingresa agua a la célula, hinchándola y aumentando la presión sobre ella, lo que conduce al deterioro de los organelos y el citoesqueleto. iii) Activación de proteasas dependientes de calcio. iv) Sobrestimulación mecánica y ruptura de las fibras sarcoméricas debido a la sobrecarga de calcio en el retículo sarcoplásmico.

Si bien los eventos antes descritos de I/R han sido identificados y estudiados en cardiomiocitos por su importancia en la mantención de la función contráctil del corazón, se desconoce que ocurre con otras células importantes involucradas en el proceso y encargadas de mantener la estructura y función del corazón como lo son los fibroblastos cardíacos.

1.6 Muerte celular

1.6.1 Tipos de muerte celular.

La muerte celular producida por I/R puede ser de dos tipos, necrosis (hinchamiento) o apoptosis (encogimiento) [5] .

1.6.1.1 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular cuya función es remover las células dañadas. Este proceso es necesario para el desarrollo normal de todo organismo. Sin embargo tanto su exceso (insuficiencia cardíaca), como la ausencia (cáncer) de este tipo de muerte celular, repercuten negativamente en la vida [8]. La apoptosis se caracteriza por generar una contracción del volumen intracelular ocasionando encogimiento celular, formación de “bleebings” en la membrana plasmática, mantención en la integridad de los organelos celulares y condensación y fraccionamiento de ADN [9]. Existe extensa literatura acerca de cómo el fibroblasto cardíaco experimenta apoptosis a través de distintos estímulos, tales como tales como etopósido, c-Myc, IL-1, catepsina D, entre otros [10] [11].

1.6.1.2 Necrosis

La necrosis en tanto, es el tipo de muerte celular causado por la alteración severa de la homeostasis celular. Se caracteriza por una ruptura de la membrana plasmática y de los organelos intracelulares, así como un hinchamiento de la célula. La liberación del contenido celular desencadena una respuesta inflamatoria [12]. Mientras la necrosis se desarrolla en procesos patológicos gatillados por estímulos externos a la célula; la apoptosis o muerte celular programada ocurre tanto en situaciones fisiológicas o patológicas en respuesta a estímulos endógenos o exógenos a la célula.

1.6.2 Muerte celular durante la isquemia

Períodos prolongados de isquemia provocan la muerte inevitable de cardiomiocitos por Necrosis. Sin embargo, esta necrosis es un evento que ocurre muy tarde dentro de la cronología de eventos isquémicos e inclusive mucho más tarde que el momento en el que

la reperfusión ha comenzado a ejercer sus efectos [13], por lo que la necrosis miocárdica solo ocurriría en aquellas oclusiones sostenidas del flujo sanguíneo. Por otro lado, el papel que juega la apoptosis en la isquemia es controvertido. Mientras algunos autores han demostrado que en este periodo existen potentes estímulos capaces de iniciar este mecanismo de muerte [14] otros, dudan de su participación en la isquemia [15]. En esta etapa la apoptosis se ejecuta lentamente [16], debido a la ausencia de ATP, molécula importante para gatillar apoptosis, pero que se recupera durante la reperfusión.

1.6.3 Muerte celular durante la reperfusión

Uno de los objetivos de la reperfusión es limitar el grado de necrosis miocárdica (7), pero paradójicamente, algunos estudios indican que producto de la sobrecarga de Ca^{+2} , radicales libres y otros eventos anteriormente descritos, la muerte por necrosis de células cardíacas, especialmente cardiomiocitos, ocurre de manera inmediata en los primeros min de la reperfusión [17]. Otros autores describen que estos efectos deletéreos son consecuencia de la necrosis isquémica [18]. Sin embargo, en los últimos años numerosos estudios han destacado el papel que juega la muerte apoptótica en la reperfusión, especialmente en tejido cardíaco durante un infarto al miocardio [19] [20].

1.6.4 Muerte celular durante I/R cardíaca.

Debido a lo anterior, lo más probable es que el daño producido por I/R involucre a ambos tipos de muerte. Se desconoce con exactitud la contribución de la necrosis y apoptosis a la muerte celular total ocasionada por I/R. La decisión que toma la célula entre muerte por necrosis o apoptosis dependería de muchos factores tales como; concentración de ATP, duración de la isquemia, rapidez con la que se inicia la reperfusión, etc. A pesar de ello, recientemente, la apoptosis ha emergido como el evento clave en el deterioro tisular de varios tipos de patologías cardiovasculares, incluida la isquemia coronaria [21]. Apoptosis sería también la forma de muerte celular más importante en daño miocárdico por I/R, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Más aún, se ha demostrado la ocurrencia de este tipo de muerte en otros tejidos como hígado, piel y cerebro [22]. Sin embargo no existen estudios satisfactorios en cuanto al efecto de la I/R sobre otros tipos de células cardíacas no-

miocíticas como lo son fibroblastos cardíacos y su sobrevida ante este proceso. Tampoco se ha descrito qué factores podrían regular la sobrevida o muerte de estas células luego de un infarto cardíaco, especialmente los elementos protectores frente a este evento deletéreo. Uno de estos elementos sería el factor de crecimiento análogo a la insulina tipo I, IGF-1, que desempeña actividades cardioprotectoras luego de I/R [23].

1.7 Modelos de I/R

Para poder estudiar los efectos causados por I/R cardíaca se han caracterizado diversos modelos experimentales que buscan “simular” las características y condiciones a las cuales se ven sometidas las células cardíacas frente a la ocurrencia de un infarto cardíaco. Para ello se han planteado modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*:

a) *In vivo*: Para poder simular un proceso de I/R *in vivo*, se realiza la ligación de la arteria coronaria izquierda de manera de limitar el flujo de sangre y nutrientes hacia el corazón. Esta técnica se realiza en modelos animales vivos, los cuales son anestesiados para luego exteriorizar su corazón mediante cirugía y realizar la oclusión del vaso con un nudo de seda esterilizado, por el tiempo que se desea simular la isquemia. Posteriormente este nudo se suelta, iniciándose la restitución del flujo sanguíneo o reperfusión. Una variación de esta técnica es mediante la utilización de un globo que permite controlar la velocidad a la cual ocurre la reperfusión [24].

b) *ex vivo*: La simulación por métodos *ex vivo* se realiza mediante la aislación y perfusión del corazón del animal mediante el método de Langendorff [25]. El corazón ya aislado del animal es bombeado con una solución buffer a 37 °C, 5% CO₂/95% O₂ y pH 7,4 a presión y flujo constante. La isquemia global del corazón se aplica al cesar este flujo por el tiempo deseado, y posteriormente se restablece la perfusión, lo que se traduce como la reperfusión sanguínea del corazón.

c) *In vitro*: Los modelos *in vitro* utilizan cultivos celulares aislados para estudiar el efecto sobre algún tipo celular en particular frente a I/R. Para la simulación de la isquemia *in vitro*, las células son expuestas a un medio o buffer isquémico a 37 °C y pH 6,2 cuya composición en sales se asemeja a la concentraciones fisiológicas de estas durante infarto cardiaco, mientras que el pH ácido y la adición de ácido láctico permiten asemejar la acidosis intracelular producto de la glicólisis anaerobia de las células cardiacas isquémicas. Para simular la hipoxia presente en esta etapa, se utilizan elementos que bloquean la fosforilación oxidativa como cianuro de potasio, o que remueven el oxígeno presente como ditionito de sodio. Mientras que la falta de nutrientes y ATP a la cual se ven expuestas las células durante la isquemia es simulado mediante la utilización de 2-deoxi-D-glucosa, la cual es incapaz de continuar la reacción de glicólisis. Tras terminada la isquemia simulada, el buffer es removido de los cultivos celulares y estos son reperfundidos con medio de mantención, con lo que efectivamente regresa el suministro de oxígeno y nutrientes a la célula. Una modificación de esta técnica es simular las condiciones de hipoxia mediante la utilización de una cámara hipóxica/isquémica la cual mantiene a las células en un ambiente nitrogenado carente de oxígeno [26].

1.8. Factor de crecimiento análogo a insulina tipo I (IGF-1)

IGF-1 es un polipéptido de 7,2 kDa sintetizado por la gran mayoría de tejidos del organismo, (placenta, corazón, riñon, hígado, páncreas, intestino delgado y grueso, testículos, cerebro, etc.), implicado en la proliferación, crecimiento, desarrollo, diferenciación y supervivencia de distintos tipos celulares [27]. IGF-1 consta de 70 aminoácidos, presentes en una sola cadena peptídica con tres puentes disulfuro intramoleculares. Esta estructura presenta un alto grado de homología con Insulina (aproximadamente 49%) e IGF-II (61%), lo que determina que IGF-1 pueda actuar sobre otros receptores con cierta afinidad [28].

A diferencia de la Insulina, la secreción de IGF-1 es constitutiva (siendo regulada en parte por la hormona del crecimiento), y liberada hacia el sistema circulatorio junto a proteínas de unión de IGF (IGFBP) como complejos ternarios inactivos entre IGF-1, IGFBP-3 e IGFBP-5.

Bajo situaciones de estrés la afinidad de estas proteínas de unión por IGF-1 disminuye, lo que le permite a este último unirse a otras proteínas de menor tamaño, para atravesar membranas y así llegar a tejidos periféricos donde ejercerá su acción a través de la unión y activación del receptor de IGF-1 (IGF-1R) [29].

1.8.1 Receptor de IGF-1

El gen del receptor de IGF-1, ubicado en el cromosoma 15, se compone de 21 exones y se extiende a más de 309 kpb. Al igual que su ligando, la estructura del receptor posee un alto grado de semejanza con el del receptor de insulina e IGF-II (60% homología); el receptor consiste en un heterodímero de dos subunidades $(\alpha\beta)_2$, unidos entre sí por puentes disulfuros. La subunidad α (135 kDa) es extracelular y proporciona el sitio de unión a IGF-1, mientras que la subunidad β (95 kDa) posee una porción extracelular, una región transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa [30]. La semejanza estructural del receptor, le permite unir además IGF-II e insulina, pero la afinidad de estos péptidos por el receptor es cien veces menor que con IGF-1.

La unión del ligando al IGF-IR genera un cambio conformacional en este, que ocasiona la activación de su dominio tirosina kinasa y la autofosforilación de los residuos tirosina-serina. La activación del receptor genera la fosforilación de proteínas tales como el IRS-1 e IRS-2. Estas proteínas fosforiladas no tienen actividad kinasa intrínseca propia, sino que actúan como reclutadoras de otras proteínas para así llevar a cabo una cascada de activación de kinasas (PI3K/Akt, cascada Ras-Raf-MEK-ERK) que median las acciones de IGF-1 [31]. Una vez activado el receptor, este es regulado negativamente por internalización endocítica, por proteínas tirosina fosfatasas y fosforilación en residuos serina [32].

Tanto IGF-1 como su receptor están presentes en el miocardio, cumpliendo roles de regulación del crecimiento, remodelado e hipertrofia del corazón de manera paracrina y autocrina; y de citoprotección de cardiomiocitos y fibroblastos frente a diversos estímulos de estrés y muerte [33].

1.8.2. Vías de señalización activadas por IGF-1

Son muchas las vías de transducción activadas por IGF-1, siendo descritas como los principales responsables en los efectos citoprotectores otorgados por IGF-1. Estas serían las vías de transducción de señal fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K)-Akt y Ras-Raf-MEK-ERK [34]. Ambas vías de señalización están involucradas con la supervivencia y protección celular frente a procesos de estrés, daño y muerte celular [34]. La proteína PI3K está constituida por una subunidad regulatoria de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110). La activación de esta subunidad depende de la asociación de los dominios SH2 de la subunidad regulatoria a péptidos fosfotirosina de IRS-1. La activación de PI3K, da inicio a la formación del segundo mensajero lipídico fosfoinositido 3-fosfato (PIP3), a partir de fosfoinositido 2-fosfato (PIP2). Esta acción permite reclutar a proteínas con dominios pleckstrina (PH), como la kinasa 1 dependiente de PIP3 (PDK1) y la proteína serina/treonina kinasa Akt hacia la superficie interna de la membrana celular, favoreciendo su activación mediante la fosforilación de sus residuos aminoacídicos treonina 308 y serina 473 (por PDK1 y mTORC2, respectivamente) [35]. Una vez fosforilada y activa, Akt se transloca desde la membrana plasmática hacia otros compartimentos celulares para fosforilar proteínas de señalización, factores transcripcionales y otras proteínas kinasas con el fin de regular múltiples procesos celulares [36].

Otra cascada de transducción fundamental para explicar los efectos de IGF-1, es la cascada de señalización de la familia de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Esta cascada se inicia al interactuar los residuos fosfotirosina de la proteína IRS-1 con el dominio SH2 de la proteína de unión al receptor de factor de crecimiento (Grb2). Esta proteína forma un complejo mediante sus dominios SH3 con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (SOS), formando el complejo Grb2/SOS. La activación del complejo favorece su traslocación a la membrana plasmática donde estimula el intercambio de nucleótidos con Ras GDP (forma inactiva) en Ras GTP (forma activa). Esta activación generará la fosforilación secuencial de proteínas serina/treonina Raf-MEK-ERK [37] dicha señalización, permite activar otras vías de señalización citosólicas o nucleares para activar distintos factores de transcripción.

1.9 Efectos de IGF-1 sobre I/R

Existe mucha evidencia que avala los efectos protectores de IGF-1 frente a una gran variedad de estímulos de muerte en fibroblastos [38] [39]. De igual manera sus propiedades protectoras frente a eventos de hipoxia o I/R han sido descritas en distintos tipos de células tales como células renales [40], neuronas [41] y cardiomiocitos [42], pero no así en fibroblastos cardiacos.

Como ya se describió, la activación de las vías de señalización MEK-ERK y PI3K/Akt son responsables en parte de los efectos citoprotectores y antiapoptóticos de IGF-1, especialmente frente a procesos dañinos para el corazón como lo es I/R, con el fin de limitar el daño y disminuir el grado de muerte celular. La activación de Akt es capaz de activar factores anti-apoptóticos (proteínas de la familia Bcl-2 y factor de transcripción cAMP-CREB), e inhibir otros pro-apoptóticos (procaspasas, factor de transcripción NF- κ B) [43]. Asimismo la cascada de activación de MAPK ha demostrado ser particularmente importante en cardiomiocitos, por el papel que toman frente al crecimiento hipertrófico y apoptosis [44]. Sin embargo otros autores estiman esta vía como mediadora de efectos proliferativos pero no así cardioprotectores [45]. Existen numerosas investigaciones que describen la activación de ambas vías para proteger de los efectos deletéreos de I/R, tanto en ausencia de IGF-1 [46], como en presencia de este [24] y otros factores de crecimiento tales como Insulina, TGF- β 1, FGF y VEGF, entre otros [47]. Sin embargo poco se sabe acerca de cómo estas vías regulan la supervivencia de fibroblastos cardiacos al ser sometidos a I/R.

Pese a la extensa literatura, sobre los efectos de la I/R en corazón y específicamente en cardiomiocitos y cómo es que IGF-1 es capaz de prevenir esta pérdida de viabilidad, no existe mayor información acerca de estos efectos sobre fibroblastos cardiacos. Y es que entendiendo el papel fisiológico de los fibroblastos cardiacos, se hace necesario saber si es que frente a la ocurrencia de algún evento isquémico coronario, estas células sobrevivirán para poder cicatrizar la zona dañada y así restablecer la arquitectura normal del corazón para su correcto funcionamiento.

Basándose en el efecto sobre otra célula cardíaca como lo es el cardiomiocito, se podría inferir un efecto protector de IGF-1 sobre fibroblastos cardíacos sometidos a I/R. Sin embargo esto debe comprobarse ya que las diferencias morfológicas y funcionales entre fibroblastos y cardiomiocitos [48] determinan que no se comporten de igual forma frente a estímulos de muerte [49] como lo es la I/R, ni tampoco a factores cardioprotectores, como lo es IGF-1. De igual forma se hace imprescindible el determinar si el efecto de IGF-1 está mediado, en parte por la activación de las vías ERK/MAPK y PI3K/Akt. Por los antecedentes anteriormente expuestos, para el presente trabajo se propone la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

IGF-1 protege al fibroblasto cardíaco de rata neonata de la muerte provocada por isquemia/reperfusión simulada.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el FCN sometido a I/R simulada muere por apoptosis y que la preincubación con IGF-1 protege de este evento deletéreo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar que I/R simulada produce una pérdida significativa de la viabilidad de los FCN.
2. Demostrar que IGF-1 disminuye la pérdida de viabilidad de FCN sometido a I/R *in vitro*.
3. Determinar que IGF-1 protege a través de la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK 1/2.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): Tritón X-100, piruvato de sodio, azul de tripán y NADH. En Gibco BRL (Carlsbad, California, EEUU) se adquirieron tripsina-EDTA, estándares de masas moleculares de proteínas preteñidas, suero fetal de bovino (FBS). Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para Western blot (Western Lightning) se adquirió a PerkinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU). El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos se obtuvieron en Falcon. IGF-1 y Accutase fue adquirido en Chemicon. LY29042 se adquirió en Cayman Chemicals (Michigan, USA). Los anticuerpos secundarios anti-IgG ratón y anti-IgG conejo, conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU), al igual que el reactivo 2-deoxiglucosa. Se obtuvieron en Cell Signaling Technology (Boston, MA, EEUU), el reactivo PD98059 y los anticuerpos anti-Akt fosforilado, anti-Akt total, anti-p44/42 MAPK. El anticuerpo anti-ERK 1/2 fue obtenido en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU).

5.2. Animales

Ratas Sprague-Dawley neonatas (2 a 3 días de edad), se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, cumpliendo con todas las normas bioéticas referidas a la utilización de animales y de acuerdo al Comité de Ética de la Facultad.

5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de ratas neonatas

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols [50], el cual da cuenta de la posibilidad de separar cardiomiocitos de fibroblastos cardíacos por la diferente capacidad de adherencia a las placas de cultivo. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia. Se retiraron las aurículas y los ventrículos

se cortaron en pequeños pedazos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un preplaqueo por 2 h a 37°C en medio de cultivo conteniendo 5% FBS y 10% FCS en frascos para cultivo de plástico. Por adhesión diferencial al plástico se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Luego de las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10% FBS, los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo).

5.4 Protocolo de I/R simulada

Para simular el proceso de Isquemia *in vitro*, los FCN se incubaron en una cámara de hipoxia, con ambiente nitrogenado a 37 °C en 1 ml de buffer Krebs modificado (139 mM NaCl, 12 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂ y 5,0 mM HEPES) suplementado con 10 mM de 2-deoxiglucosa Y ácido láctico 20 mM a pH 6,2. Para la reperfusión, las células se incubaron en medio de cultivo DMEM F-12, en estufa a 37°C con 5% CO₂, a diferentes tiempos.

Los controles para cada condición se incubaron en normoxia en medio F-12 en ausencia de suero, por los mismos períodos de tiempo correspondientes a cada grupo experimental. En los controles y en los diferentes tiempos de I/R se evaluó la muerte celular, apoptosis y proteínas p-Erk, p-Akt inmediatamente después de la isquemia simulada o de I/R según los experimentos.

Para evaluar el efecto protector de IGF-1 sobre los fibroblastos cardiacos, se agregó a concentraciones de 1, 10 y 100 nM en tres instancias dependiendo del experimento a realizar: una hr previa a la isquemia, durante la isquemia, y/o en el medio de reperfusión. Para investigar los roles de p-Erk y p-Akt mediados por IGF-1 en el proceso simulado de I/R, se utilizaron inhibidores de estas proteínas PD98059 (10 µM) y LY 29042 (50 µM), respectivamente; los cuales se agregaron junto con IGF-1, según sea el caso.

5.5. Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar los niveles de las proteínas p-Erk, Erk total, p-Akt, Akt total por IWB. Las células se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 2×10^4 cel/cm². Una vez sometidas a los experimentos estimulados, las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío y luego se lisaron con 50 µL de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1% v/v; SDS 0,1% v/v; deoxicolato 1% v/v; leupeptina 2 µg/mL; aprotinina 10mM; PMSF 1 mM y Na₃VO₄ 100 µM). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Bio-Rad protein assay). Las proteínas se denaturaron en tampón SDS-PAGE 4X a 40 °C por 5 min (glicerol 20 mL, 2-mercaptoetanol 10 mL, SDS 5 g, Tris base 1,51 g, Azul de bromofenol 0,01 g, agua csp. 100 mL, a pH 6,8 con HCl), y se mantuvieron a -20°C, hasta su utilización.

5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Para la detección se cargaron 50 µg de extracto proteico. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 V en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1.000 mL para tampón de electroforesis 10X).

5.7. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) 350 mA durante 90 min en tampón de transferencia.

5.8. Western blot

Una vez transferidas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) durante 1 hr a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según

ensayo. Anti-Akt fosforilado, anti-Akt total, anti-p44/42 MAPK y anti-ERK en tampón de incubación (TBS 1X; Tween-20 0,1% en leche sin grasa 5% p/v) a una dilución 1:1000 toda la noche a 4°C con agitación suave. Para tubulina se usó una dilución 1:5000 toda la noche a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5.000 en tampón de incubación. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax o AGFA. Las películas se digitalizaron y las imágenes se cuantificaron por densitometría con ayuda del programa computacional Image J. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 45 min en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para nuevos ensayos de Western blot.

5.9. Viabilidad por conteo celular

Fibroblastos se sembraron en placas 60 mm a una razón de 2×10^4 cel/cm², cultivadas en medio DMEM-F12 + 10% de FBS por 24 hrs y que posteriormente fue reemplazado por DMEM-F12 libre de suero. Luego las células se soltaron de las placas utilizando Accutase y se añadió DMEF-12 10% suero, en proporción 2:1 con respecto a Accutase para aumentar el volumen de muestra. Posteriormente se tomó una alícuota de 20 µl de la suspensión de células y se le adicionaron 20 µL de solución de azul de tripan, se homogeneizó y de esta nueva suspensión se tomaron 20 µL para conteo celular en una cámara de Neubauer doble.

5.10. Cuantificación de la fragmentación y condensación del ADN mediante yoduro de propidio

Para cuantificar la apoptosis celular se utilizó la técnica de incorporación de PI. Fibroblastos se sembraron en placas 35 mm a una razón de 2×10^4 cel/cm², se cultivaron en medio DMEM-F12. Luego se lavaron tres veces con PBS 1X y se reemplazó por medio fresco DMEM-F12 (control) o DMEM-F12 con posterior estimulación de IGF-1, LY294002 o PD98059 a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Las células se desprendieron de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x. Por otro lado, el medio que contenía a las células se recolectó, centrifugó a 1.500 rpm por 5 min y la pella recuperada y adicionada a las células desprendidas inicialmente de las placas. El total de células obtenido se recolectó en metanol frío, almacenado a -20 °C toda la noche, sometido a una segunda centrifugación y la fracción no soluble obtenida se resuspendió en PBS frío conteniendo RNAsa por 2 h. Luego a las células en suspensión se les adicionó PI 20 µg/µL un min antes de la medición. Finalmente se determinó la apoptosis celular por citometría de flujo (FACS CANTO, Becton Dickinson).

5.11. Determinación de la actividad Lactato deshidrogenasa

Para determinar la muerte por necrosis se midió la actividad de LDH por espectrofotometría, a través de la cinética de transformación del NADH a NAD⁺, lo que se relacionó directamente con la cantidad de LDH liberado al medio y por ende al proceso necrótico. Se recolectó el medio de cultivo, posterior al estímulo de I/R, mientras que las células vivas fijadas en las placas se permeabilizaron con Tritón 0,01% por 10 min a 4°C. Se tomó una alícuota de 100 µL del medio de cultivo recolectado, se adicionó 850 µL de tampón Fosfato 0,1 M, pH 7,4 y se adicionó 33,3 µL de piruvato [2,5mg/mL] y el sustrato NADH (10 mg/mL). Esta mezcla se sometió a un análisis espectrofotométrico de decaimiento de absorbancia a 340 nm durante 3 min a 37°C en el equipo ATI Unicam UV/VIS Spectrometer. Posteriormente, se repitió el procedimiento de igual manera para la muestra de células permeabilizadas con Tritón 0,01%.

Se graficó la variación de la absorbancia con respecto al tiempo, lo cual entregó la pendiente de decaimiento de NADH, que es directamente proporcional a la actividad de la LDH. Es decir, a mayor pendiente, mayor es la actividad de la LDH y mayor fue el número de células en estado necrótico. Los datos se expresan en porcentaje de LDH liberado.

5.12. Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SEM de al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados, se consideró significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto en la sobrevida de FCN sometidos a I/R simulada

Para determinar cómo afecta el proceso de I/R sobre la viabilidad de FCN, estos se mantuvieron en medio DMEM-F12 con suero al 10% durante 24 hrs hasta confluencia. Luego fue sustituido por medio de mantención libre de suero durante otras 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo los FCN se sometieron al proceso de isquemia por 6, 8, 12, 24 hrs, tal como se indica en materiales y métodos. Posteriormente se determinó la muerte celular. Con el objetivo de poder medir los efectos producidos por la reperfusion sobre la viabilidad, se escogió aquel tiempo máximo de isquemia sin pérdida de la viabilidad celular y se realizaron las subsiguientes reperfusiones de 16, 24, y 48 hrs respectivamente.

6.1.1 Efecto de la isquemia sobre la viabilidad celular

La viabilidad de los FCN sometidos a isquemia simulada, se determinó por conteo celular mediante exclusión con azul de tripán. En la Fig. 1 se observa la cuantificación de este fenómeno presentándose una disminución significativa en el número de células viables a partir de las 12 hrs de isquemia (45% de sobrevida) y prácticamente la muerte total a las 24 hrs de Isquemia (9,5% de sobrevida), con respecto al control.

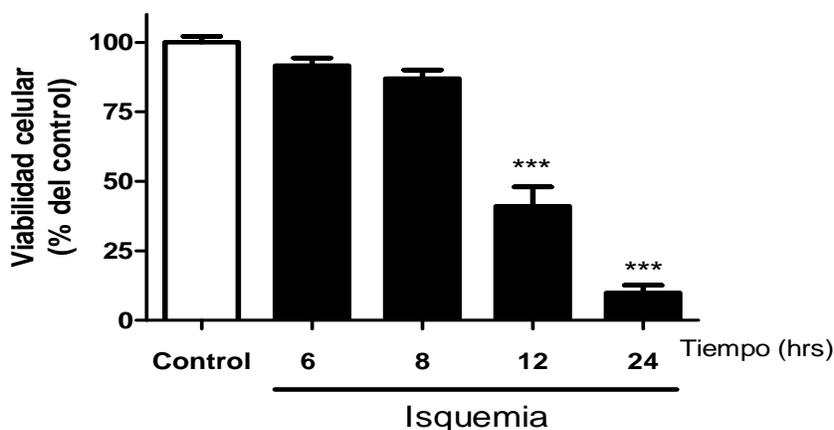


Figura 1. Muerte celular inducida por Isquemia: FCN se sometieron a isquemia simulada por los tiempos indicados y la viabilidad se determinó mediante exclusión por Azul de tripán. Los resultados muestran la media \pm SEM para tres experimentos independientes (***, $p < 0,001$ vs Control).

6.1.2 Efecto de I/R sobre la viabilidad

Los FCN se sometieron a isquemia por 8 hrs y posteriormente a reperfusiones de 16,24 y 48 hrs. La viabilidad de los FCN, se determinó por conteo celular mediante azul de tripán. En la Fig. 2 se observan los efectos de pérdida de viabilidad causados por la reperfusión de manera tiempo dependiente. Ya a las 16 hrs de reperfusión se aprecia una pérdida significativa de la viabilidad con respecto al control (63% de sobrevivida); pérdida que se intensifica de manera lenta pero progresiva, a medida que aumenta el tiempo de reperfusión a 24 y 48 hrs (55% y 50%, de sobrevivida respectivamente). Importante mencionar que esta pérdida de viabilidad ocasionada por la reperfusión es estadísticamente significativa con respecto a las 8 hrs de isquemia sin posterior reperfusión ($p < 0,001$ v/s isquemia 8 hrs).

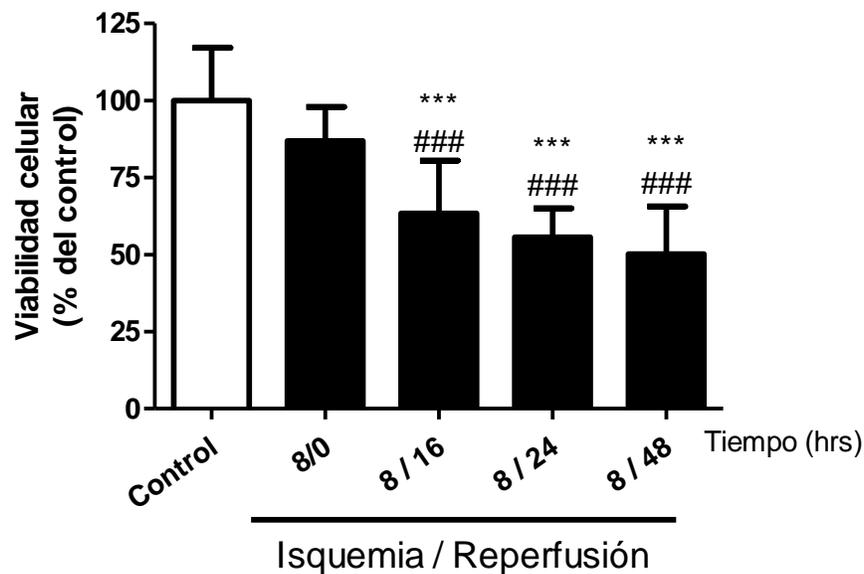


Figura 2. Muerte celular inducida por I/R: FCN se sometieron a I/R simulada por los tiempos indicados y la viabilidad se determinó mediante exclusión por Azul de tripán. Los resultados muestran la media \pm SEM para doce experimentos independientes. ***; $p < 0,001$ con respecto al control, ###; $p < 0,001$ con respecto a Isquemia 8 hrs.

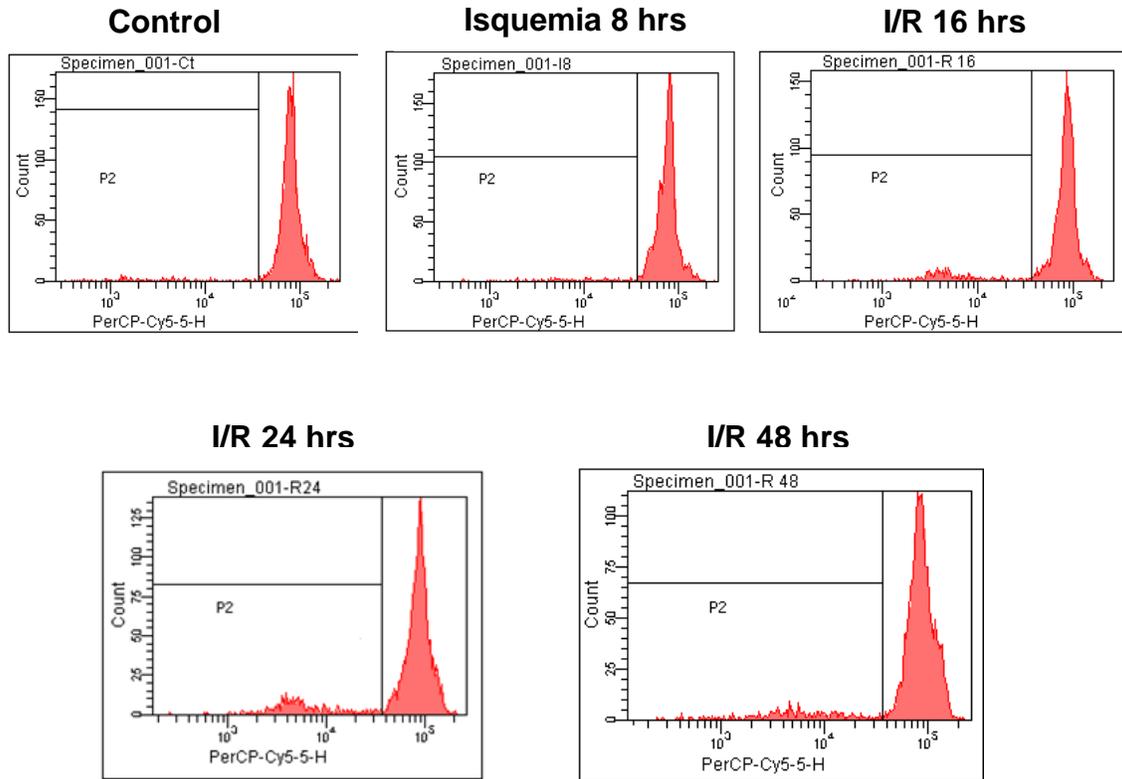
6.2 Evaluación del tipo de muerte ocasionado por I/R simulada

De manera de determinar a qué tipo de muerte celular corresponde esta pérdida de viabilidad inducida por I/R simulada, FCN sometidos a 8 hrs de isquemia y posteriores reperfusiones de 16, 24 y 48 hrs, fueron tratados para estudios de incorporación de PI (apoptosis) y determinación de la actividad enzimática de LDH (necrosis).

6.2.1 Determinación de la incorporación de PI en FCN sometidos a I/R simulada

En los histogramas de la Fig. 3A se observa que 8 hrs de isquemia no produjeron un aumento en el porcentaje de células apoptóticas con respecto al control. Sin embargo el posterior proceso de reperfusion de 16, 24 y 48 hrs ocasionó una significativa apoptosis, lo que se aprecia por la incorporación de PI en la subpoblación apoptótica G1. El análisis gráfico de estos eventos (Fig. 3B) muestra que la isquemia de 8 hrs no gatilla apoptosis significativa (6,36%) con respecto al control (3,56%). La I/R en cambio, produjo un aumento del porcentaje células apoptóticas estadísticamente significativo; tanto para las 16 hrs (16,27%), 24 hrs (23,61%) y 48 hrs (17,57%) de reperfusion; con respecto al control (7,62%).

A)



B)

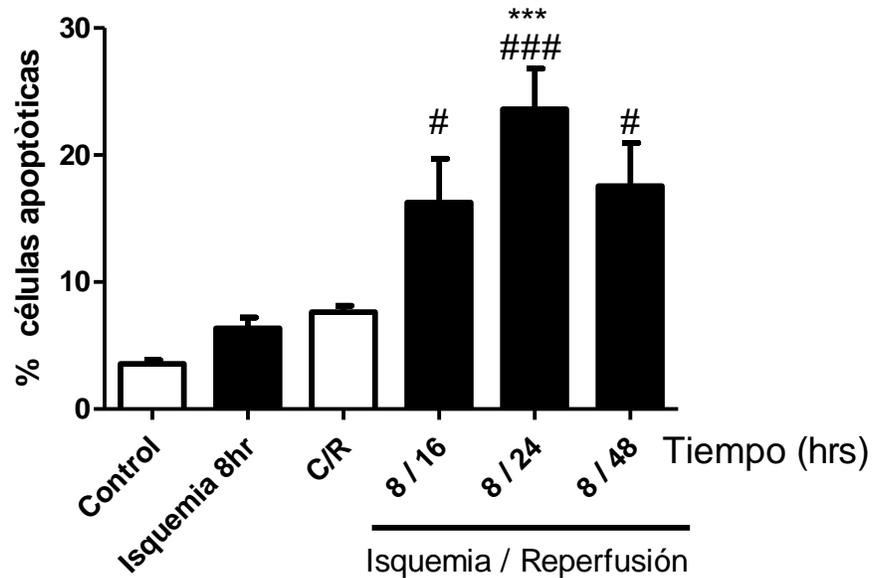


Figura 3. Fragmentación del ADN en FCN sometidos a I/R simulada: FCN se sometieron a I/R simulada por los tiempos indicados y se determino el porcentaje de células apoptóticas mediante FACS. En la figura 3A se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo. La cuantificación de dichos histogramas se muestran en el gráfico de la figura 3B. Los resultados muestran la media \pm SEM para cuatro experimentos independientes. En la figura 3B ###; $p < 0,001$, #; $p < 0,05$ con respecto al Control de Reperfusion (C/R), ***; $p < 0,001$ con respecto a isquemia 8 hrs.

6.2.2 Determinación de la actividad LDH liberada por FCN sometidos a I/R simulada

Para la cuantificación de muerte por necrosis los FCN fueron sometidos a isquemia de 8 hr y posteriores reperfusiones de 16, 24 y 48 hrs. Una vez transcurrido el tiempo se recolectaron las células y se midió la actividad de LDH de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se utilizaron FCN tratados por 4 hrs con H₂O₂ a 100 µM como control positivo de necrosis. Luego de evaluar la actividad de la LDH, se graficó la variación de la pendiente, como se observa en la Fig. 4, que es directamente proporcional a la necrosis en el cultivo.

El resultado indica que los FCN sometidos a 8 hrs de isquemia no muestran un aumento estadísticamente significativo de la actividad de LDH, con respecto a FCN en condición control. Sin embargo durante la reperfusión, se observa un importante aumento de la actividad de LDH, llegando incluso a igualar al grado de necrosis alcanzado por el control positivo (7 veces por sobre el control). El aumento de LDH liberado es estadísticamente significativo con respecto al control y a los FCN sometidos a 8 hrs de isquemia; la liberación de LDH se mantiene constante con el pasar de las hrs de reperfusión.

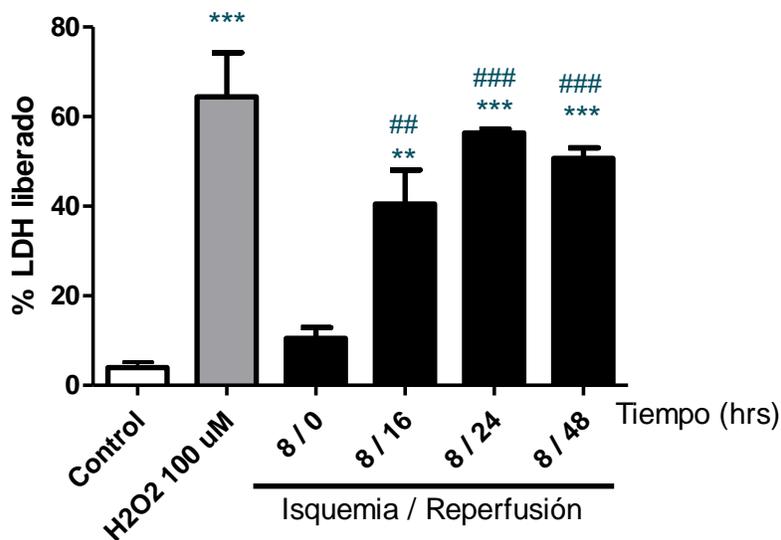


Figura 4. Actividad LDH de FCN sometidos a I/R Simulada: FCN fueron sometidos a I/R simulada por los tiempos indicados y se determinó el porcentaje de células necróticas mediante la cuantificación de la actividad enzimática de LDH. Los resultados muestran la media ± SEM para tres experimentos independientes (***; p<0,001, **; p<0,01 con respecto al Control, ###; p<0,001, ##; p<0,01 con respecto a Isquemia 8 hrs (8/0)).

6.3 Efecto de IGF-1 sobre la pérdida de viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada

Para determinar cuál es el efecto de IGF-1 sobre la pérdida de viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada, los FCN fueron sometidos al proceso de Isquemia por 8 hrs y subsiguientes reperfusiones de 24 y 48 hrs; en presencia y ausencia de IGF-1 10 nM. El tratamiento con IGF-1 10 nM se realiza en tres instancias: una hr antes de la isquemia y durante la I/R. La viabilidad se determinó mediante exclusión por azul de Tripan.

Los resultados indican que IGF-1 no previno la pérdida de viabilidad de FCN sometidos sólo a isquemia de 8 hrs (84,3 % con respecto a un 82,7 % de FCN no estimulados con IGF-1). Al incubar con IGF-1 durante I/R se observó un aumento en la viabilidad de los fibroblastos sometidos a I/R en los tiempos indicados. La diferencia observada fue estadísticamente significativa para las reperfusiones de 24 hrs (67,3 % v/s 55,7 %) y 48 hrs (68,8% frente a un 49,3%) indicando una protección parcial por IGF-1 (Fig. 5).

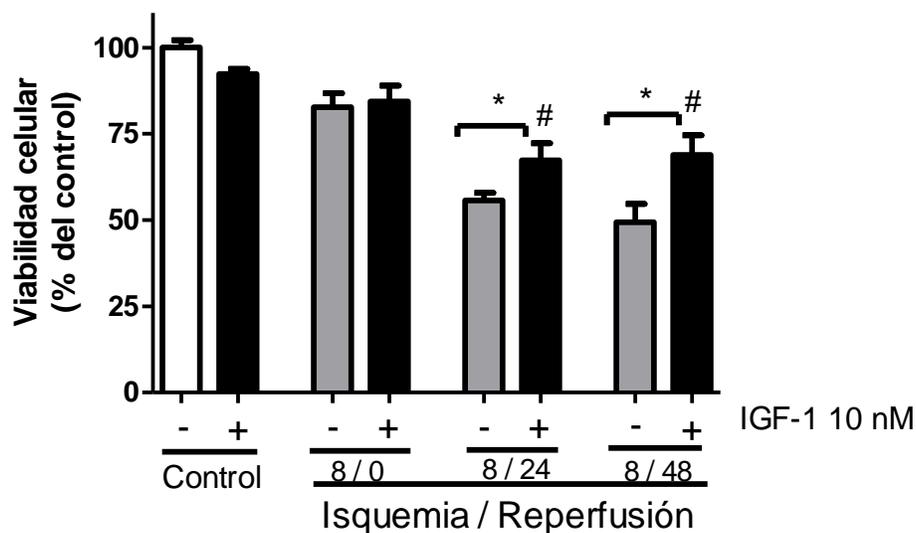


Figura 5. Efecto de IGF-1 sobre la pérdida de viabilidad inducida por I/R simulada: FCN sometidos a I/R simulada se trataron con IGF-1 10 nM, 1 hr previa a la isquemia y en el momento de la reperfusion. Se determinó la viabilidad mediante exclusión por Azul de tripan. Los resultados muestran la media \pm SEM para nueve experimentos independientes. (#; $p < 0,05$ con respecto a isquemia 8 hrs, *; $p < 0,05$ con respecto al mismo tiempo en ausencia de IGF-1).

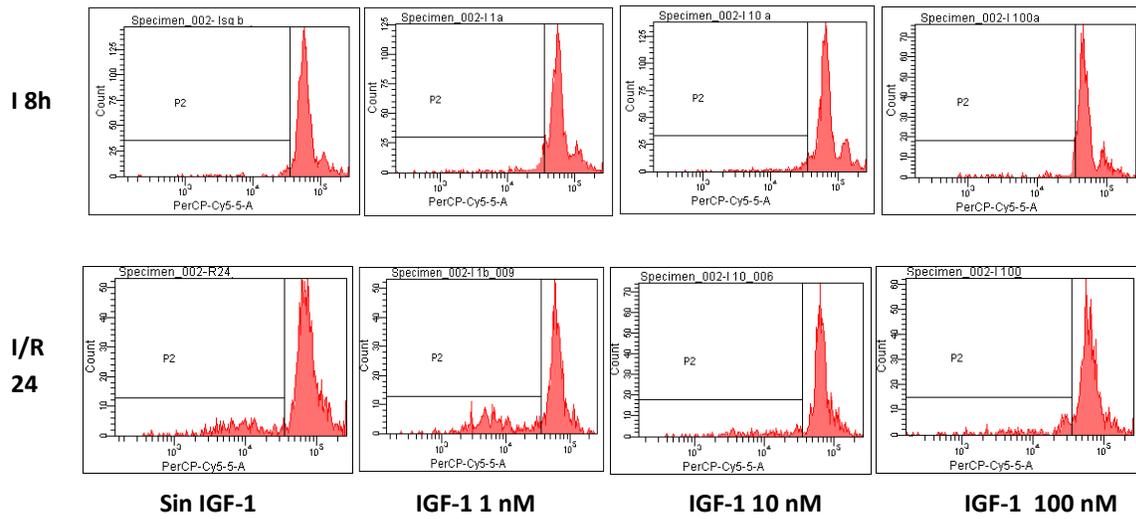
6.3.1 Efecto de la concentración de IGF-1 sobre la viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada

Para estudiar si el efecto es dependiente de la concentración de IGF-1, se utilizaron concentraciones de 100, 10 y 1 nM. Los FCN se trataron con IGF-1 por 1 hr antes de someterse a isquemia de 8 hrs. Para evaluar el efecto de la concentración de IGF-1 en la reperfusión, los FCN se incubaron con IGF-1, 1 hr antes y durante las 8 hrs de isquemia, y luego son expuestos a 24 hrs de reperfusión en presencia de IGF-1. Una vez terminado los tiempos de exposición los FCN se trataron para determinar la incorporación de PI.

Los histogramas de la Fig. 6A muestran que IGF-1 no disminuyó el porcentaje de células apoptóticas producto de la isquemia en ninguna de las tres concentraciones utilizadas. En contraste, IGF-1 fue capaz de disminuir de manera significativa el número de células apoptóticas a $14,7 \pm 7 \%$ (IGF-1 100 nM) y $15 \pm 3\%$ (IGF-1 10 nM) respecto de la condición de reperfusión en ausencia de IGF-1 (23,6%) (Fig. 6B). Es interesante notar, que tras la incubación de IGF-1 a concentración 1 nM tras 24 hrs de reperfusión; el porcentaje de células apoptóticas no disminuyó, lo que sugiere que esta concentración es insuficiente para ejercer los efectos anti-apoptóticos.

Los resultados acá expuestos permiten determinar que IGF-1 es capaz de disminuir la pérdida viabilidad celular inducida por I/R simulada desde una concentración de 10 nM, por lo que para los siguientes experimentos, se utilizará esta concentración.

A)



B)

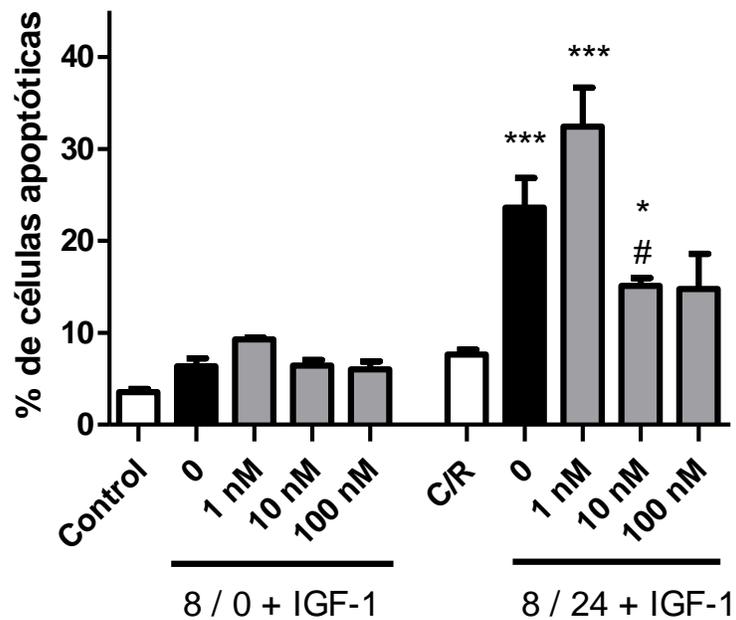


Figura 6. Efecto Dosis-respuesta de IGF-1: FCN sometidos a I/R simulada fueron tratados con IGF-1 en las concentraciones indicadas por toda la duración de la Isquemia o I/R. En la figura 6A se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo. La cuantificación de dichos histogramas es mostrada en el gráfico de la figura 6B. Los resultados muestran la media \pm SEM para tres experimentos independientes. En la figura 2B *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ con respecto al Control de Reperfusión (C/R), #, $p < 0,05$ con respecto a I8 / R24.

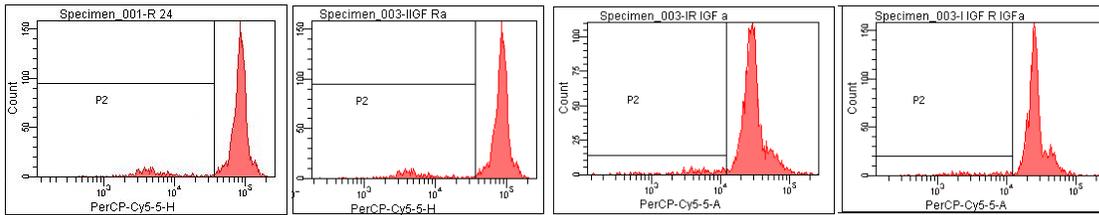
6.3.2 Efecto del momento de estimulación con IGF-1 sobre la viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada

Ya habiendo comprobado los efectos de IGF-1 10 nM sobre la viabilidad de FCN sometidos a I/R, se busca diferenciar si el efecto protector de IGF-1 es durante la isquemia o la Reperfusión. Indirectamente los resultados de este experimento también permitirá determinar si la pérdida de viabilidad observada en FCN sometidos a I/R simulada, es consecuencia de la reperfusión y no de la extensión del daño ocurrido durante la isquemia.

La Fig. 7A y 7B muestran los resultados de la incubación de IGF-1 en distintos momentos del evento de I/R simulada. En la Fig. 7A se observa que IGF-1 disminuyó la apoptosis, únicamente durante el proceso de reperfusión y no en el de Isquemia, reflejado como una reducción en la incorporación de PI en la población apoptótica sub G1.

La Fig. 7B representa el análisis gráfico de los eventos descritos. Se observó que al preincubar con IGF-1 a FCN sometidos a I/R solamente durante el periodo isquémico el efecto antiapoptótico es casi nulo ($22 \pm 5 \%$), siendo muy similar al porcentaje de células apoptóticas obtenido en aquellos fibroblastos sometidos a I/R en ausencia de IGF-1 ($23,6 \pm 6\%$). En cambio, el estímulo con IGF-1, sólo durante el período de reperfusión ocasionó una disminución del porcentaje de células apoptóticas ($17 \pm 4 \%$) que se asemeja en magnitud a la protección anti-apoptótica alcanzada al estimular con IGF-1 durante isquemia y reperfusión ($16,5 \pm 5 \%$). Si bien la diferencia obtenida al estimular con IGF-1 únicamente durante la reperfusión no fue estadísticamente significativa con respecto a FCN sometidos a I/R en ausencia de IGF-1, se puede observar una tendencia de disminución del porcentaje de células apoptóticas. Estos resultados sugieren que la protección sobre la viabilidad y apoptosis otorgada por IGF-1 sería producto de sus efectos predominantemente durante el período de reperfusión, por sobre el período Isquémico.

A)



IGF-1 en Isq	-	+	-	+
IGF-1 en Rep	-	-	+	+

B)

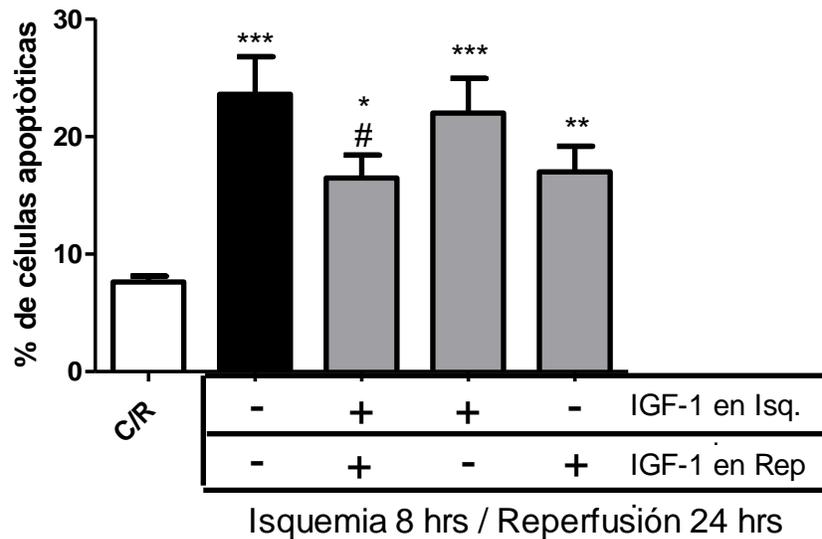


Figura 7. Efecto del momento de estimulación con IGF-1 sobre la viabilidad celular de FCN sometidos a I/R simulada: FCN sometidos a I/R simulada se trataron con IGF-1 10 nM durante isquemia y/o reperusión. En la figura 7A se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo. La cuantificación de dichos histogramas es mostrada en el gráfico de la figura 7B. Los resultados muestran la media \pm SEM para cuatro experimentos independientes. En la figura 7B *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ con respecto al Control de Reperusión (C/R); #, $p < 0,05$ con respecto a I8 /R24.

6.4 Participación de la vía PI3K/Akt y MAPK en los efectos inducidos por IGF-1 sobre la viabilidad de los FCN sometidos a I/R simulados y tratados con IGF-1

A fin de estudiar cual es la vía de señalización activada por IGF-1 en los cultivos primarios de FCN sometidos a I/R simulada, responsable del efecto antiapoptótico, se investigó si IGF-1 activa a dos de las proteínas kinasas involucradas en las vías transduccionales canónicas activadas por el receptor de IGF-1, Akt y ERK 1/2. Con este objetivo los fibroblastos se sometieron a periodos breves de I/R (10/10 min) y prolongados (8/24 hrs), tanto en presencia como ausencia de IGF-1 10 nM, para así poder determinar la temporalidad en la activación de estas vías, a corto plazo (10 min), y si se mantenía hasta los tiempos utilizados experimentalmente (8 hrs de isquemia y 24 hrs de reperfusión).

Una vez finalizado los tiempos de exposición se prepararon extractos proteicos totales y se determinaron las formas fosforiladas y totales de cada proteína mediante Western Blot. Paralelo a ello se verificará la participación de estas vías en la protección otorgada por IGF-1. Para este fin se utilizarán inhibidores químicos (LY294002 y PD98059) de las vías PI3K y ERK 1/2, respectivamente.

6.4.1 Activación de la vía PI3K/Akt en FCN sometidos a I/R y tratados con IGF-1

Los resultados indican que tras un proceso de 10 min de isquemia, la activación de Akt no presenta diferencias significativas con respecto los FCN control ($1,3 \pm 0,2$), mientras que la reperfusión de 10 min si es capaz inducir la fosforilación de Akt, lo que se ve representado por un aumento de $3,25 \pm 1,0$ veces sobre el control. Con respecto al efecto de IGF-1 sobre los FCN sometidos a I/R simulada de 10 min, se observa que IGF-1 10 nM es capaz de inducir la fosforilación de Akt tanto en la isquemia, donde el tratamiento con este estímulo produjo un aumento de la fosforilación de $3,45 \pm 0,3$ veces sobre aquellos FCN no tratados con IGF-1, así como también en la reperfusión, en la cual el aumento fue considerablemente mayor ($8,44 \pm 2,6$). Estos resultados sugieren que Akt no es activada durante la isquemia de 10 min, pero si durante la posterior reperfusión. IGF-1 en tanto, es

capaz de inducir una mayor activación de esta proteína tanto en isquemia, como en reperfusión. (Fig. 8A).

Por otro lado, frente a periodos prolongados isquemia (Fig. 8B), los resultados indican que al igual que en el experimento anterior la isquemia de 8 hrs, por si sola, no induce un aumento de la fosforilación de Akt con respecto al control ($1,4 \pm 0,15$), siendo la reperfusión de 24 hrs, la responsable del aumento de $3,45 \pm 0,5$ veces por sobre el control. Del mismo modo, el tratamiento con IGF-1 ocasionó un aumento en la fosforilación de la proteína durante I/R ($6,4 \pm 1,3$; $10,2 \pm 5$ respectivamente) (Fig 8B).

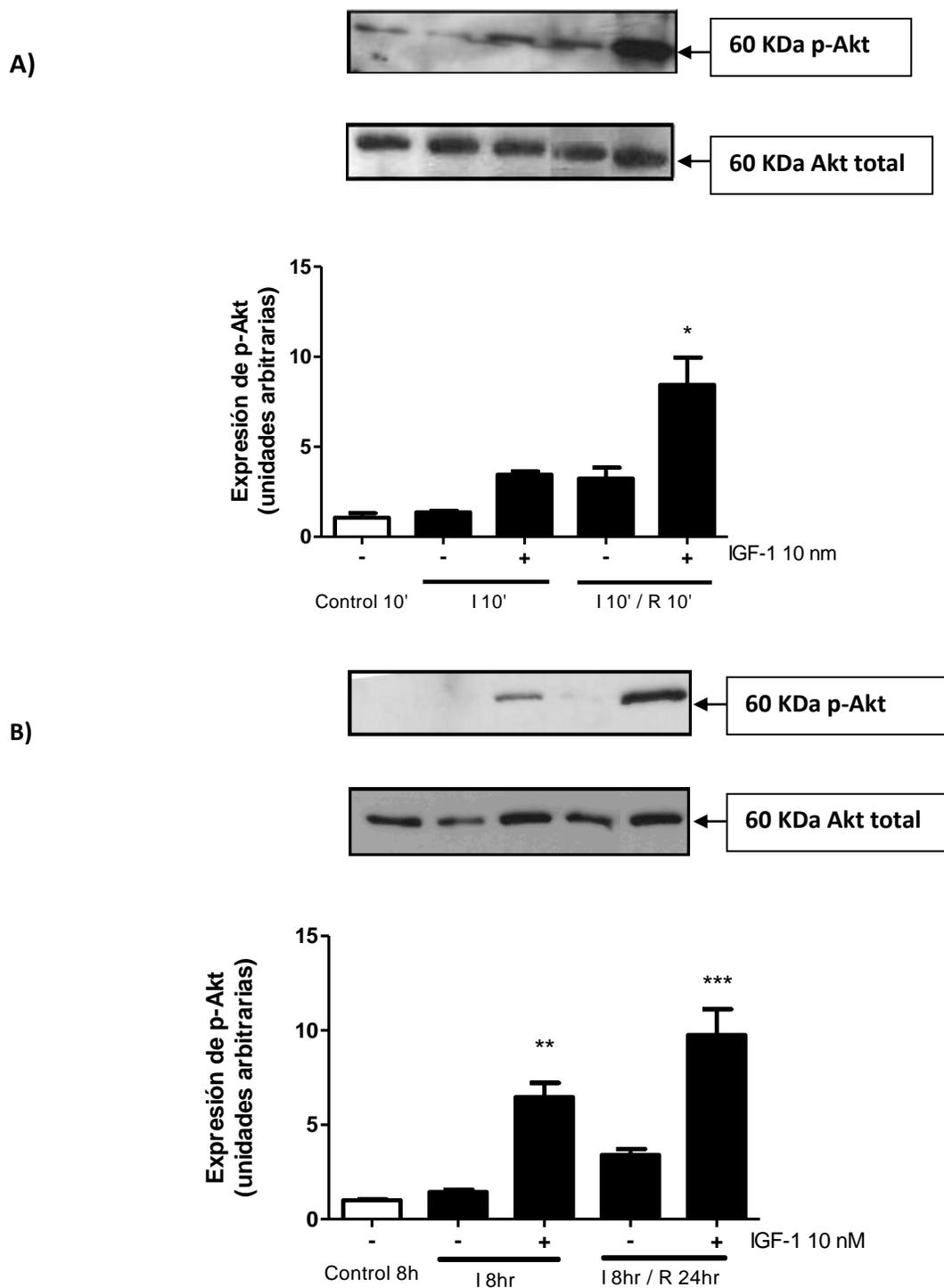


Fig. 8 Activación de p-Akt en FCN sometidos a I/R y estimulados con IGF-1. Determinación de la activación de p-Akt en FCN sometidos a I/R estimulados con IGF-1 10 nM. **8A)** Muestra la expresión de p-Akt en FCN sometidos a I/R por tiempos cortos de 10 min. **8B)** Muestra la expresión de p-Akt en FCN sometidos a I/R por tiempos largos de 18 hrs/R24 hrs. La parte superior corresponde al WB indicando la expresión de los niveles de p-Akt y Akt total (60 KDa) y en la parte inferior se presenta el gráfico que muestra la razón entre p-Akt/Akt total. Los resultados muestran la media \pm SEM para tres experimentos independientes. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$ con respecto al Control de 8 hrs.

6.4.2 Efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt

Los FCN fueron sometidos a isquemia por 8 hrs y posteriormente a reperfusiones de 24 y 48 hrs. Para verificar la participación de la vía PI3K/Akt en la protección otorgada por IGF-1; los FCN se co-estimularon con IGF-1 10 nM y con LY294002 a concentración 50 μ M.

Los resultados de la Fig. 9 muestran la neutralización del efecto protector de IGF-1 sobre la viabilidad por LY294002. Se observa que tras 8 hrs de isquemia y 24 hrs de reperfusión, la co-incubación del inhibidor junto a IGF-1 disminuye la viabilidad celular a porcentajes menores (54,2%) a la sola incubación con IGF-1 (67,3%) y similares a aquellos FCN no estimulados con IGF-1 (55,7%). Estas diferencias no son estadísticamente significativas, sin embargo tras 8 hrs de isquemia y 48 hrs de reperfusión; estas si lo son, notándose una importante disminución de la viabilidad (42,3%) con respecto a FCN sometidos a I/R y estimulados con IGF-1 (68,6%) y una semejanza frente a FCN sometidos a I/R sin tratamiento (49,3%). Es interesante notar que en ambos tiempos de I/R medidos, el tratar únicamente con LY294002 en ausencia de IGF-1 no produjo mayores pérdidas de viabilidad de los fibroblastos que los observados en fibroblastos sin tratamiento alguno, lo que demuestra que el inhibidor no está produciendo efectos tóxicos que pudiesen disminuir la sobrevivencia de las células.

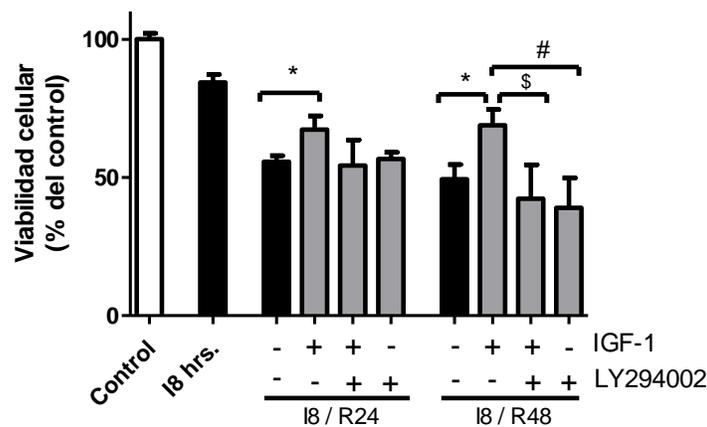


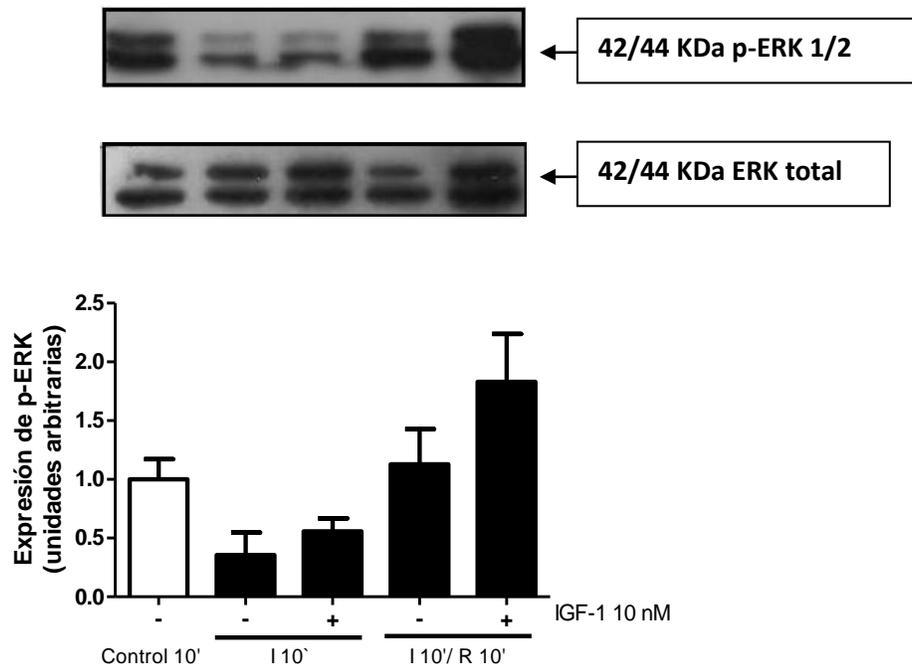
Fig. 9. Neutralización del efecto protector sobre la viabilidad por Ly 29042. FCN sometidos a I/R simulada se trataron con IGF-1 10 nM, 1 hr previa a la isquemia y en el momento de la reperfusión en presencia o ausencia de LY29042 50 μ M. Se determinó la viabilidad mediante exclusión por azul de tripán. Datos mostrados como promedio \pm SEM para tres experimentos independientes; *: $p < 0.05$, \$: $p < 0.05$, #: $p < 0.05$.

6.4.3 Participación de la vía MAPK en los efectos inducidos por IGF-I sobre la viabilidad de los FCN sometidos a I/R simulada

En el caso de la activación de las proteínas kinasas reguladas extracelularmente ERK 1/2, los resultados indican que tras 10 min de isquemia, los niveles de la fosforilación de la proteína disminuyeron con respecto al control ($0,35 \pm 0,12$). Estos niveles se restablecieron al iniciar la reperfusión. Sin embargo no fueron superiores a los observados en la condición control ($1,12 \pm 0,25$). Por otro lado, el estímulo con IGF-1 no fue capaz de inducir la activación de p-ERK 1/2 en isquemia ($0,56 \pm 0,11$ veces con respecto al control). Sin embargo, si lo hizo en la reperfusión, con un aumento de $1,8 \pm 0,4$ veces con respecto al control (Fig 10A).

La Fig. 10B. muestra la expresión de las proteínas p-ERK 1/2 frente a períodos prolongados de I/R. Nuevamente se observa que tras 8 hrs de isquemia tanto en ausencia como en presencia de IGF-1, la fosforilación de la proteína, disminuye fuertemente con respecto al control ($0,10 \pm 0,04$). Este dato reafirma nuestro anterior resultado acerca de la disminución de la activación de p-ERK ya sea al comienzo de la isquemia, como también después de transcurridas 8 hrs de este período. En el caso de la reperfusión los niveles de p-ERK 1/2 aumentan en gran medida con respecto a los de isquemia ($1,69 \pm 0,4$ veces con respecto al control), llegando a niveles de expresión de proteína similares a los observados en el control. Esto ocurre de manera similar al estimular con IGF-1 ($1,57 \pm 0,3$).

A)



B)

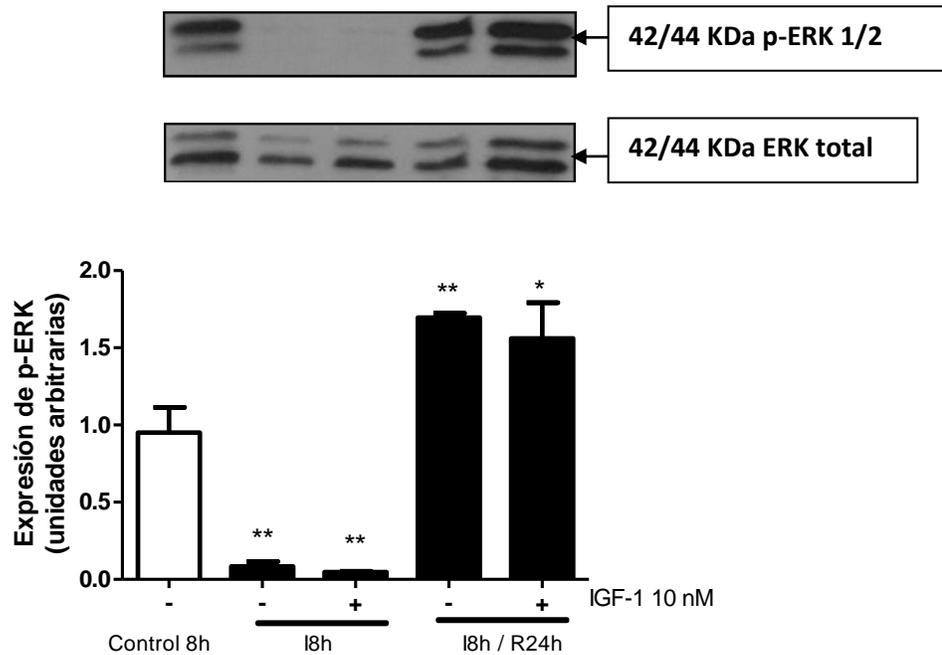


Fig. 10. Activación de p-ERK 1/2 en FCN sometidos a I/R y estimulados con IGF-1. Determinación de la activación de p-ERK en FCN sometidos a I/R estimulados con IGF-1 10 nM. **10A.** Muestra la expresión de p-ERK 1/2 en FCN sometidos a isquemia 8 hrs/reperfusión 24 hrs. La parte superior corresponde al WB indicando la expresión de los niveles de p-Erk 1/2 y Erk total (42/44 KDa) y en la parte inferior se presenta el gráfico que muestra la razón entre p-Erk/Erk total. Los resultados muestran la media \pm SEM para cuatro experimentos independientes. **, $p < 0,01$ *; $p < 0,05$ con respecto a Control 8 hrs (Ctrl 8h).

6.4.4 Participación de la vía ERK en FCN sometidos a I/R y tratados con IGF-1

Los FCN se sometieron a isquemia por 8 hrs y posteriormente a reperfusión por 24 y 48 hrs. Para verificar la participación de la vía MAPK/ERK en la protección otorgada por IGF-1, los FCN fueron estimulados con IGF-1 10 nM en presencia/ausencia del inhibidor de esta vía (PD98059 10 μ M).

Los resultados de la Fig. 11 muestran que PD98059 por si mismo reduce la viabilidad celular de FCN. La utilización de IGF-1 junto al inhibidor, generó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad (46%) con respecto a FCN estimulados solamente con IGF-1 (69%), en las 48 hrs de reperfusión, mientras que a las 24 hrs la diferencia no fue estadísticamente significativa (50% con respecto a un 67%). En ambos tiempos indicados de reperfusión esta disminución de la viabilidad no fue estadísticamente significativa con respecto a FCN sin tratamiento alguno ni tampoco con respecto a FCN tratados con el inhibidor pero en ausencia de IGF-1.

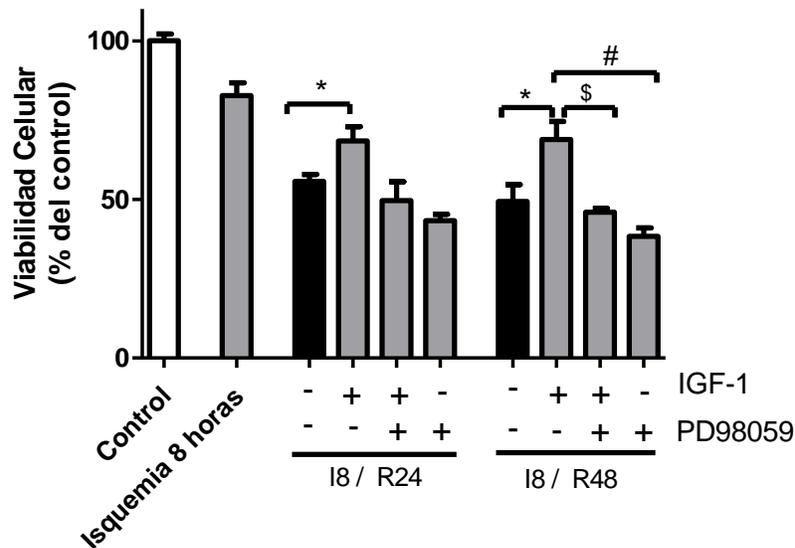
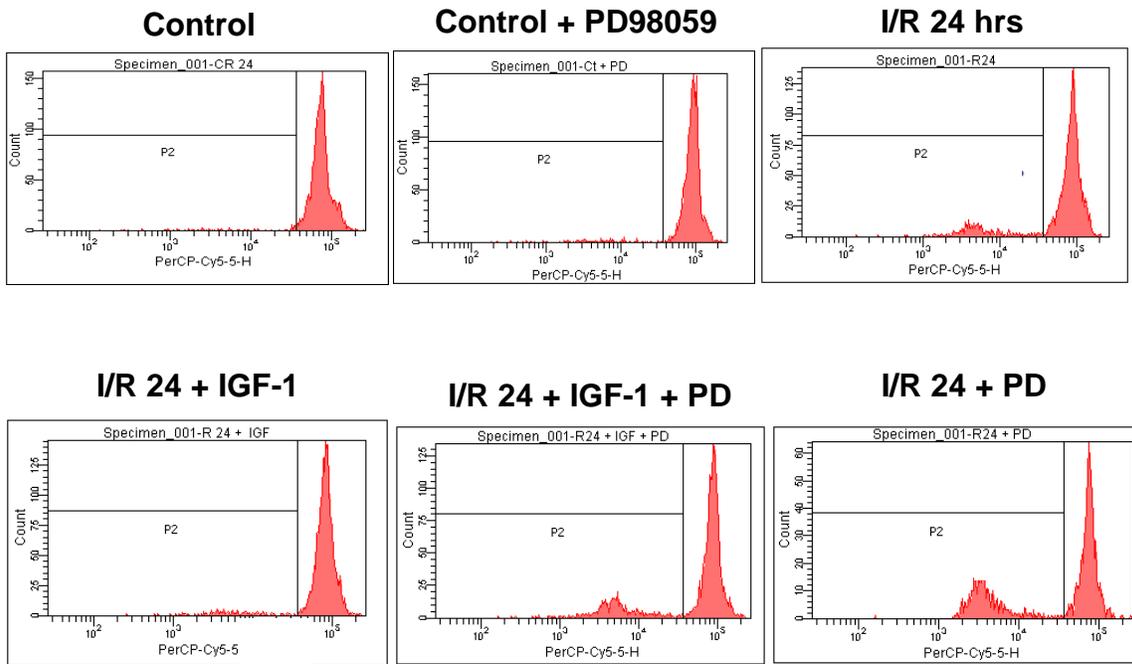


Fig. 11. Neutralización del efecto protector sobre la viabilidad por PD98059. FCN sometidos a I/R simulada por los tiempos indicados, se trataron con IGF-1 10 nM, 1 hr previa a la isquemia y en el momento de la reperfusión en presencia o ausencia de PD98059 10 μ M. Se determinó la viabilidad mediante exclusión por Azul de tripán. Datos mostrados como promedio \pm SEM para tres experimentos independientes; *, p<0,05, \$; p<0,05, #; p<0,05.

En la Fig. 12A. se muestran los histogramas de citometría de flujo. Se observa que los FCN estimulados con IGF-1 en presencia de PD98059, evidenciaron un aumento en la apoptosis, mayor incorporación de PI en la subpoblación apoptótica G1. El análisis gráfico (Fig. 12B) muestra que a las 24 hrs de reperusión con estímulo de IGF-1 y PD98059 existió un aumento del porcentaje de células apoptóticas ($24,9 \pm 2,5$) con respecto al porcentaje obtenido por el estímulo con IGF-1 ($15,2 \pm 0,5$). Este aumento en la apoptosis se asemeja en magnitud con el alcanzado por FCN en condiciones de I/R en ausencia de IGF-1 ($23,29 \pm 3\%$), lo que vuelve a confirmar la neutralización del efecto protector-antiapoptótico de IGF-1 por parte de PD98059. Es importante resaltar que tras 24 hrs de reperusión, el inhibir la vía ERK 1/2 incluso en ausencia de IGF-1 produjo un aumento considerable del porcentaje de células apoptóticas ($33,14 \pm 14\%$); lo que se correlacionó con el aumento en la pérdida de viabilidad celular bajo las mismas condiciones.

A)



B)

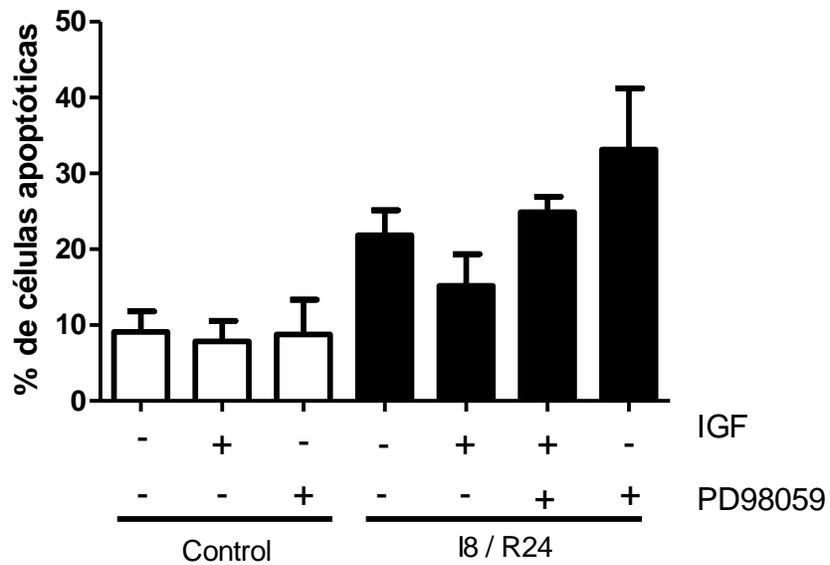


Figura 12. Neutralización del efecto antiapoptótico por PD98059: FCN sometidos a I/R simulada se trataron con IGF-1, 1 hr previa a la isquemia y en el momento de la reperfusión en presencia o ausencia de PD98059 10 μ M. En la figura 12A se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo. La cuantificación de dichos histogramas es mostrada en el gráfico de la figura 12B. Los resultados muestran la media \pm SEM para tres experimentos independientes

7. Discusión

En el presente trabajo se investigaron los efectos protectores de IGF-1 sobre la viabilidad de FCN *in vitro*, sometidos a I/R simulada. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos indican que a) a partir de las 12 hrs de isquemia simulada se generó pérdida progresiva de la viabilidad de FCN. b) 8 hrs o menos de isquemia simulada no generaron cambios significativos en la sobrevivencia de los FCN *in vitro*. Sin embargo, la posterior reperfusión ocasionó una pérdida progresiva en la viabilidad de estas células. c) dicha muerte celular correspondió al tipo apoptótico y necrótico. d) La disminución en la viabilidad celular y el aumento en la apoptosis se previnieron por la incubación con IGF-1 durante la reperfusión y durante la I/R, de manera concentración dependiente; e) el mecanismo de protección de IGF/1 fue a través de la activación de la vía PI3K/Akt y de la vía MEK-ERK.

7.1 Efecto de I/R sobre la viabilidad celular del FCN

Se han reportado diversos estudios que dejan en claro que tanto la oclusión de arterias por períodos prolongados, así como también el cultivo de cardiomiocitos *in vitro* en medios con ausencia de O₂, provoca alteraciones metabólicas y funcionales de los cardiomiocitos que culminan en su muerte [51]. En relación a ello se ha descrito la pérdida de viabilidad de las células cardíacas frente a la ocurrencia de un infarto cardíaco, siendo los cardiomiocitos los más estudiados [6]. Por otro lado, se ha descrito la participación activa de otras células no musculares, tales como fibroblastos cardíacos; en la regulación del daño que experimenta el miocardio frente a eventos de estrés mecánico y cambios en los niveles de oxígeno; como lo es I/R [52]. Estos antecedentes permiten dimensionar la importancia del rol que juegan los fibroblastos cardíacos en las respuestas adaptativas del miocardio frente a las condiciones isquémicas y al posterior daño por reperfusión.

Nuestro trabajo utilizó un modelo de I/R *in vitro*, cuyo uso ha sido documentado en otros estudios [53]. Si bien los modelos *in vivo* parecieran ser los más representativos y cercanos a lo que ocurre durante un infarto cardíaco, la gran complejidad de interacciones e interconexiones que se desencadenan entre las distintas células del corazón cuando es

sometido a un infarto, dificultan el estudio detallado de los eventos y mecanismos moleculares asociados a un tipo celular determinado, así como resulta complejo el atribuir los resultados observados a un solo factor determinante. Los modelos *in vitro* de I/R, presentan una importante ventaja en este aspecto, ya que permiten simular las condiciones de infarto en un ambiente controlado y limitado de otras variables, como por ejemplo la contribución de otras células presentes en la sangre y tejido cardíaco. Basado en esto nosotros elegimos realizar un modelo de I/R *in vitro* de manera de poder delimitar los efectos observados en FCN estimulados con IGF-1, al efecto *per se* de este factor de crecimiento. Sin embargo se debe tener en consideración que los modelos *in vitro* no reproducen por completo los eventos fisiopatológicos que ocurren en el corazón infartado, y que por ende los resultados obtenidos pueden diferir entre un modelo y otro.

Nuestros resultados indican que cultivos de FCN sometidos a isquemia simulada *in vitro* de 12 y 24 hrs experimentaron una pérdida importante en la sobrevivencia, llegando prácticamente a la muerte total tras 24 hrs. La información que existe acerca de la temporalidad de muerte de fibroblastos sometidos a isquemia simulada *in vitro* es escasa. Sin embargo es posible extrapolar nuestros resultados con aquellos obtenidos por Bhawanjit K. Brar, quien observó un 65% de muerte de cardiomiocitos expuestos a isquemia *in vitro* simulada por 6 hrs [26], porcentaje similar al obtenido en nuestro trabajo pero a las 12 hrs en la misma condición. Es interesante notar que los tiempos a los que se observaron pérdidas importantes en la viabilidad celular de fibroblastos (12-24 hrs), son mucho mayores que los observados en la literatura con respecto a cardiomiocitos sometidos a isquemia *in vivo* (40-60 min) [54] e *in vitro* (6 hrs). Esto puede correlacionarse con reportes que describen que frente a condiciones de hipoxia, los cardiomiocitos son extremadamente sensibles y que se gatillan mecanismos tempranos de muerte. En cambio los fibroblastos son capaces de adaptarse e incluso proliferar frente a estas situaciones adversas [55]. Independiente del tipo celular, es importante aclarar que los modelos *in vivo* de infarto cardíaco exhiben un comportamiento de muerte acelerado al compararse con modelos *in vitro* de I/R, ya que presentan una serie de elementos, tales como comunicaciones célula-célula, matriz extracelular-célula e infiltración de neutrofilos,

los que influyen indirectamente en el daño ocasionado por I/R. Además de lo ya mencionado, las diferencias observadas pueden deberse a otros factores, tales como las condiciones utilizadas para simular la I/R, la duración del proceso de I/R y los métodos utilizados para medir la viabilidad celular.

Existe controversia en la literatura acerca de cómo determinar y cuantificar el daño letal irreversible que experimentan las células exclusivamente por reperfusión, ya que no es posible desarrollar un modelo de reperfusión sin que lo preceda un periodo isquémico, el cual por si solo podría llegar a producir daños irreversibles a la célula. Para resolver este problema, hemos optado por someter a los FCN a tiempos de isquemia no letales, para posteriormente realizar reperfusiones y poder atribuir los efectos sobre la viabilidad observados al fenómeno de I/R, por sobre cada de uno de sus componentes individuales. En nuestro trabajo las hrs de Isquemia simulada no letales para fibroblastos correspondieron a 8 hrs o menos, en las cuales no se observo pérdida de viabilidad. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que la reperfusión simulada posterior a 8 hrs de isquemia, genera una pérdida progresiva de la viabilidad de FCN de manera tiempo dependiente, alcanzando un 50% de muerte tras 48 hrs de reperfusión; lo que confirma la existencia de un daño adicional por reperfusión en FCN. En concordancia con este hallazgo, se ha descrito que cardiomiocitos expuestos a 6 hrs de isquemia simulada, y luego a 24 hrs de reperfusión, sufren una mayor pérdida de viabilidad (82,8 % de muerte) con respecto a cardiomiocitos expuestos solo a 6 hrs de isquemia (55% de muerte) [56]. En relación a este hecho, se ha descrito en la literatura, que el daño inducido por reperfusión genera daños irreversibles adicionales a los producidos por la isquemia [57]. Esto ocurriría mediante la participación de radicales libres [58] y falla mitocondrial debido a la apertura del poro de transición mitocondrial [59]. No obstante lo anterior, otros estudios señalan que la muerte inducida por reperfusión es sólo el enmascaramiento de aquel daño irreversible producido durante el periodo isquémico [60]. Tomando en consideración esto último, no sería posible descartar la posibilidad de que la pérdida de viabilidad de FCN observada en la reperfusión sea producto de la continuación del daño que se generó en la isquemia. Sin embargo, nuestros resultados

nos permiten concluir que la reperfusión simulada es capaz de disminuir la pérdida de viabilidad de FCN, cuando estos son expuestos a tiempos largos de solo isquemia. Si bien nuestros resultados avalan la teoría del daño adicional inducido por reperfusión, también demuestran que la reperfusión, a pesar de los daños que pueda causar, es capaz de limitar y disminuir el grado de muerte provocado por la isquemia. Al comparar la pérdida de viabilidad de FCN que obtuvimos tras 24 hrs de isquemia (91,5 % de muerte) con su equivalente en hrs de I/R; correspondiente a 8 hrs de isquemia y 16 hrs de reperfusión (65 % de muerte), se puede concluir que si bien la reperfusión es capaz de inducir la pérdida de viabilidad de FCN, esta es absolutamente menor que si se hubiera mantenido la isquemia por períodos tan prolongados (24 hrs).

7.2 I/R gatilla apoptosis y necrosis en FCN

Está descrito en la literatura que luego de un proceso de I/R cardíaco gran parte de la pérdida de cardiomiocitos ocurre principalmente por necrosis [5] y apoptosis. Por otro lado, se ha demostrado que fibroblastos experimentan apoptosis y necrosis frente a eventos de I/R [61]. No obstante, se desconoce el mecanismo principal responsable de la pérdida de viabilidad inducida por I/R en estas células. Para determinar la muerte por apoptosis se midió la condensación y fragmentación de FCN sometidos a I/R. Si bien este método por sí solo no es capaz de aseverar por completo la ocurrencia de muerte apoptótica, estudios de nuestro laboratorio han determinado la activación de caspasas efectoras, como caspasa 3 y de factores pro-apoptóticos como Bax ante la ocurrencia de I/R.

En el trabajo realizado se observó que FCN sometidos a 8 hrs de isquemia simulada no experimentaron apoptosis, mientras que el posterior evento de reperfusión simulado generó un aumento de muerte por apoptosis de manera tiempo dependiente. Este resultado es coherente con el resultado anterior de aumento de pérdida de viabilidad celular inducido por I/R y de escasa muerte celular tras solo 8 hrs de isquemia. Este resultado se correlaciona con otros datos de la literatura obtenidos en cardiomiocitos [15], lo que sugiere que el daño inducido por reperfusión es capaz de gatillar la activación

de elementos pro-apoptóticos que finalmente llevan a la muerte del fibroblasto cardíaco por apoptosis. Con respecto a ello, en la literatura se ha descrito la aparición de distintos parámetros de apoptosis durante el daño miocárdico por I/R, tales como activación de caspasas, liberación de citocromo C y de Fas ligando, entre otros [62]. Es difícil precisar si el aumento de apoptosis observado tras I/R es consecuencia de los efectos ocurridos exclusivamente en isquemia o en reperfusión. Si bien este trabajo no indagó si períodos prolongados-letales de isquemia simulada inducen la muerte por apoptosis, se ha demostrado que episodios prolongados de isquemia en ausencia de reperfusión inducen la muerte apoptótica [63]. Otros autores sugieren que la reperfusión acelera el proceso de apoptosis iniciado en la isquemia [15], mientras que diversos estudios afirman lo contrario al proponer que la apoptosis se gatilla en la reperfusión y no se manifiesta durante el período isquémico [64]. El consenso general es que la apoptosis suele ser relacionada principalmente con la reperfusión debido a que es un proceso dependiente de ATP, molécula cuyos niveles son depletados en la isquemia y recuperados tras la reperfusión.

Es importante mencionar que si se comparan los resultados de viabilidad celular por conteo celular con los datos de apoptosis, los porcentajes de muerte no coinciden completamente (aunque la tendencia se mantiene) debido, probablemente, a que una vez que se forman los cuerpos apoptóticos, los fragmentos celulares son degradados en el medio de cultivo, lo que impide identificar al total de células apoptóticas por incorporación de PI.

Ya habiendo demostrado los efectos negativos de la I/R simulada sobre la viabilidad de FCN y el papel que juega la apoptosis en esta muerte celular, se quiso evaluar la participación de la vía necrótica en este fenómeno, para ello se utilizó la técnica de medición de LDH [65]. Nuestros resultados indican que tras 8 hrs de isquemia los FCN no experimentan muerte por necrosis, mientras que el daño por reperfusión induce un importante aumento de muerte por esta vía. Los resultados en la literatura acerca de este tipo de muerte en I/R son controversiales, ya que si bien algunos autores la denominan como el principal componente de muerte tras períodos isquémicos prolongados, dando énfasis en las disfunciones iónicas, falta de ATP, activación de proteasas e hinchamiento

celular que ocurren en esta fase [66]. Otros sugieren que el pH ácido, producto de la glicolisis anaerobia; protege de la muerte por necrosis [67]. Nuestros resultados estarían corroborando la existencia de una alta tasa de muerte por necrosis en momentos tardíos de la reperfusión, resultado similar a lo expuesto por Zhao *et al.* [68], pero opuesto a lo señalado por otros trabajos *in vivo*, donde no observaron diferencias en el tamaño de infarto de corazones reperfundidos y no-reperfundidos; lo que implicaría que la reperfusión no extiende ni induce la necrosis miocárdica [69]. Es posible explicar estas diferencias basándose en las limitaciones del modelo *in vitro* que utilizamos, así como también en la relación existente entre apoptosis y necrosis. Como se mencionó anteriormente, al no existir células fagocíticas tales como macrófagos en nuestro modelo *in vitro*, los cuerpos apoptóticos, formados tras I/R son finalmente degradados en el medio de cultivo, liberando su contenido intracelular y activando mecanismos de muerte tipo necrótica [70]. Considerando esta información, junto con nuestros anteriores datos, podemos concluir que los FCN sometidos solo a 8 hrs de isquemia no experimentan muerte celular por necrosis ni apoptosis, mientras que la posterior reperfusión de 24 y 48 hrs es capaz de generar la pérdida de viabilidad de FCN, por ambos tipos de muerte celular. Este resultado es consistente con el estudio de Zhao *et al.* [68] donde mediante un modelo canino sometido a I/R demostraron que cardiomiocitos experimentan ambos tipos de muerte de manera simultánea durante la reperfusión, observándose un máximo de necrosis tras 24 hrs de reperfusión y de apoptosis tras 72 hrs de reperfusión.

Un aspecto no resuelto de este trabajo, es la contribución relativa de apoptosis y necrosis a la pérdida de viabilidad total observada en nuestro modelo de I/R. Una serie de estudios ha sugerido que la proporción relativa de células necróticas y apoptóticas de cualquier tejido es dependiente del tipo de insulto así como de la duración e intensidad del mismo [71]. Dado que se han observado tanto células necróticas como apoptóticas en el miocardio isquémico humano [72], lo más probable es que la mayor presencia de uno u otro tipo de muerte en fibroblastos cardíacos, sea relativo a la severidad y duración del periodo isquémico. Sin embargo, la distinción entre ambos tipos de muerte puede que no sea tan importante, ya que se ha demostrado que necrosis y apoptosis están

interrelacionados y ambos pueden ser regulados [73]. Por lo mismo, pareciera ser más importante determinar los mecanismos de muerte y como modularlos con elementos protectores como por ejemplo IGF-1; lo que explica la importancia de nuestros resultados, en vez de definir el modo en que mueren las células.

7.3 Efecto de IGF-1 sobre la pérdida de viabilidad celular y apoptosis inducido por I/R.

El uso de factores de crecimiento como elementos cardioprotectores ha permanecido como una de las estrategias claves a futuro para proteger al corazón frente al daño ocasionado por I/R [47]. Estos factores cardioprotectores promueven la sobrevida celular al activar proteínas kinasas como PI3K/Akt y MEK1/2-ERK 1/2. Estas “kinasas de salvataje frente al daño por reperfusión” (conocidas como RISK) activan señales de sobrevida que permiten reclutar elementar citoprotectores, evitando así la muerte celular [74]. IGF-1 es uno de estos factores de crecimiento el cual se ha caracterizado para una variedad de tipos celulares y se ha descrito el importante papel que juega en la regulación de la estructura y función del miocardio. Existe amplia evidencia acerca de los efectos protectores brindados por IGF-1, y en relación a nuestro tema, se ha descrito su capacidad de mejorar el rendimiento cardíaco y la sobrevida del corazón sometido a I/R [74]. En cardiomiocitos se han demostrado sus efectos antiapoptóticos [75] frente a este evento, sin embargo se desconoce cómo es que modula la respuesta de fibroblastos cardiacos sometidos a I/R. De acuerdo a nuestros resultados, IGF-1 es capaz de proteger; previniendo la pérdida de viabilidad y ejerciendo efectos anti-apoptoticos sobre los FCN sometidos a I/R simulada. Es importante mencionar que para descartar que este efecto protector no sea producto de las propiedades mitogénicas de IGF-1, se utilizaron distintos controles de proliferación junto con IGF-1 en nuestros fibroblastos, los cuales indicaron que IGF-1 no aumentó la proliferación celular de los FCN (resultados no mostrados). Es posible que esto se deba a la ausencia de suero en el medio de cultivo en el cual se encuentran los FCN antes de ser sometidos a I/R, así como también a pequeñas diferencias en la activación de las vías mitogénicas y antiapoptóticas de IGF-1 frente a diversos estímulos [76].

Nuestros resultados muestran claramente la habilidad de IGF-1 a concentraciones de 100 y 10 nM para proteger a FCN de la pérdida de viabilidad y aumento de apoptosis inducida por I/R simulada. Si bien no existen trabajos similares en la literatura donde se indague si IGF-1 es capaz de proteger a fibroblastos cardiacos frente al daño por I/R, nuestro trabajo es consistente con otros estudios donde demuestran que el tratamiento con IGF-1 a concentraciones similares a las utilizadas; protege a cardiomiocitos *in vitro* de la apoptosis inducida por hipoxia e I/R [77]. Yamamura *et al.* relacionaron esta protección con la capacidad de IGF-1 de modular el balance de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas como Bcl2 y Bax, así como también con la protección mitocondrial al prevenir de la abertura del mPTP y la liberación de citocromo C [75], mientras que el trabajo de Pi *et al.* confirmó esta teoría al sostener que los efectos beneficiosos que tendría IGF-1 sobre la función mitocondrial, serían la mantención del potencial de membrana mitocondrial y la disminución de la producción de radicales libres [78]. Estas características no fueron medidas en nuestro trabajo, sin embargo, es posible sugerir que la protección y efecto anti-apoptótico observado sea consecuencia de los mecanismos mencionados.

Un resultado interesante que presenta este trabajo, es el hecho de que IGF-1 disminuyó el porcentaje de células apoptóticas, al ser incubado durante el proceso completo de I/R, como también al hacerlo exclusivamente en la reperfusión. Sin embargo, al ser incubado sólo en la isquemia, no se observó un efecto anti-apoptótico importante. Esta información nos permite descartar que la pérdida de viabilidad y apoptosis observada en FCN sometidos a nuestro modelo de I/R simulada, sea consecuencia exclusiva del daño ocurrido en isquemia (gatillándose como muerte celular en la reperfusión), sino que más bien sería producto directo del daño inducido por reperfusión, y que por lo tanto, es neutralizado por IGF-1 al ser incubado exclusivamente en este período. Este hallazgo no se ha reportado en la literatura, pero es posible que esta protección diferencial se deba a que en la isquemia hay un menor grado de muerte por apoptosis que en la reperfusión [79], y que por lo tanto, es en este último período donde deben enfocarse las acciones anti-apoptóticas. Además, se debe tener en cuenta que esta situación pudiese ser distinta al producirse isquemias de tiempos mayores a los utilizados por nosotros, en donde si

ocurra muerte de FCN. A pesar de que no se evaluó los efectos protectores de IGF-1 sobre la muerte de tipo necrótica en la reperfusión, otros estudios han demostrado que la inhibición de la cascada de señalización apoptótica durante la etapa de reperfusión es capaz de atenuar también la muerte por necrosis [80]; lo que permite hipotetizar acerca de las capacidades protectoras de IGF-1 sobre este componente de muerte celular.

El hecho de que IGF-1 sea capaz de ejercer sus propiedades anti-apoptóticas al ser incubado en la reperfusión es muy importante por las implicancias que esto conlleva terapéuticamente. Existe una gran cantidad de estudios que indican que la introducción de sustancias cardioprotectores en el momento de inicio de la reperfusión puede reducir el tamaño del infarto [81]. Incluso en la clínica se ha determinado la necesidad imperativa de realizar intervenciones en los primeros min de la reperfusión sanguínea, ya que es impráctico y poco probable hacerlo durante el periodo isquémico. Colectivamente estos datos sugieren que los eventos que ocurren al inicio de la reperfusión son críticos para la célula y que por lo mismo, las intervenciones como por ejemplo el tratamiento con IGF-1 en este momento particular serían cruciales para la disminuir el daño ocasionado por I/R.

7.4 Participación de la vía PI3K/Akt en la citoprotección otorgada por IGF-1 en FCN sometidos a I/R.

Existen antecedentes que describen como el proceso de I/R activa cascadas de señalización implicadas en la sobrevida celular mediante el reclutamiento de factores anti-apoptóticos y la inhibición de otros pro-apoptóticos [82]. La proteína PI3K ha demostrado conferir protección frente a I/R, a través de la activación de la proteína Akt [77]. Sumado a esto, se ha demostrado, en distintos modelos de isquemia, que la protección de cardiomiocitos otorgada por IGF-1 se correlaciona con la activación de Akt y que la inhibición de esta vía neutraliza los efectos anti-apoptóticos alcanzados por IGF-1 [27]. Sin embargo, en otros tipos celulares la activación de Akt o la inhibición de PI3K no tiene efectos en la sobrevida de estas células [45], mientras que el estudio sobre otras células cardíacas como FCN se desconoce; por lo que en este trabajo se investigó el papel de PI3K en la citoprotección mediada por IGF-1 de FCN tras eventos de I/R *in vitro*.

Se debe mencionar que con fines de determinar la participación de esta vía en los efectos otorgados por IGF-1 sobre la viabilidad celular de FCN, se utilizó LY294002, un inhibidor sintético de PI3K. Este inhibidor se une irreversiblemente a la subunidad catalítica (p110) de PI3K, lo que trae consigo la inhibición de la señalización río abajo, como por ejemplo Akt. A pesar de que no se realizó el control respectivo para comprobar que LY294002 inhibía efectivamente a la proteína PI3K, su eficacia ha sido comprobada en diversos estudios relacionados con el tema [83]. De los resultados obtenidos tras evaluar la activación de p-Akt en periodos cortos y largos de I/R, se determinó que esta vía es activada por el proceso de reperfusión y que IGF-1 es capaz de inducir una mayor activación tanto en isquemia, como en reperfusión. Si bien esto deja claro que IGF-1 potencia la activación de la vía PI3K/Akt durante la reperfusión, la finalidad de una mayor activación de Akt en la isquemia no fue estudiada con mayor detalle. No obstante, se podría especular acerca de posibles efectos protectores que se ejecutan únicamente durante el periodo isquémico y no en el de reperfusión; y que por ende nuestro modelo no es capaz de medir, por lo que para determinar aquello habría que aumentar el tiempo de exposición de isquemia. Adicionalmente, se demostró mediante el uso de Ly294002 que la inhibición de PI3K-Akt bajo condiciones normales no aumentó la muerte celular de FCN, lo que sugiere que los niveles basales de esta vía no estarían involucrados en la sobrevida de FCN. Sin embargo cuando los FCN fueros sometidos a 48 hrs de I/R in vitro el inhibir la vía PI3K-Akt mediante el uso de Ly294002, neutralizó totalmente la protección otorgada por IGF-1, lo que determina que este efecto de protección sea PI3K dependiente. La pérdida de viabilidad aparentemente mayor, observada al tratar los FCN con el inhibidor de PI3K en ausencia de IGF-1 no fue estadísticamente significativa, por otro lado, si así lo fuese, estaría explicando una inhibición de la actividad basal de p-Akt durante la reperfusión. Este resultado sería consecuente con el aumento en la fosforilación de Akt observada durante la reperfusión sin estímulo de IGF-1. Considerando todo lo anterior podemos llegar a la conclusión que la vía PI3K-Akt es activada por el proceso de reperfusión y que por lo tanto, IGF-1 es capaz de prevenir la pérdida de viabilidad por reperfusión al aumentar la activación de estas proteínas.

Existen estudios que comparten este resultado como por ejemplo en corazones transgénicos, que sobreexpresan el gen de IGF-1 y sometidos a I/R ex vivo [84]. En ese trabajo se demuestra que corazones wild-type sometidos a I/R activan la vía PI3K-Akt durante la reperfusión y no en la isquemia, mientras que aquellos corazones que sobreexpresan IGF-1 tienen un nivel basal de p-Akt 6 veces mayor a los wild-type, tanto en el proceso de isquemia, como en reperfusión. Producto de ello, son resistentes a apoptosis y necrosis. Además, se demuestra que el inhibir la activación de la vía PI3K-Akt mediante el uso de Wortmanina (análogo funcional de LY294002), ya sea causa de la reperfusión o de IGF-1; ocasiona un aumento en los niveles de apoptosis observados producto del daño ocasionado por I/R. El trabajo de Fujio *et al.* [27] también vincula la protección de IGF-1 en I/R con la activación de la vía PI3K, al demostrar en corazones sometidos a I/R in vivo, que la transfección con adenovirus que expresan Akt de manera constitutiva, promueven un aumento en la supervivencia y disminución en la apoptosis de los cardiomiocitos frente al evento oclusivo coronario.

Un elemento clave reportado en nuestro trabajo y mencionado en los anteriores estudios, es la activación basal de Akt en reperfusión por sobre el periodo isquémico. De acuerdo a nuestro resultado p-Akt es activado tras 10 min de reperfusión y a las 24 hrs de ocurrido este proceso, aún se observa un discreto aumento. Punn *et al.* describieron un resultado similar [85] en cardiomiocitos sometidos a I/R simulada *in vitro*, donde analizaron la expresión en el tiempo de diversas proteínas de señalización involucradas con I/R. De acuerdo a sus resultados p-Akt no fue activado por isquemia, pero la reperfusión fue capaz de hacerlo desde los 10 min en adelante, mostrando una mayor fosforilación a los 40-60 min. Estas observaciones difieren un poco con lo expuesto por Engelbrecht *et al.* [86], quienes observaron una leve activación en los primeros 5 min de isquemia simulada, para luego de 15 min volver a los niveles basales y posteriormente alcanzar una mayor fosforilación al inicio de la reperfusión, la que tras 20-30 min nuevamente regresa a los valores normales. Dado que en este trabajo el tiempo mínimo de isquemia medido fue de 10 min, es posible que ocurra una activación de PI3K/Akt en los primeros 5 min de

transcurrido la isquemia. Sin embargo se tendría que investigar la finalidad que tendría esta activación tan temprana.

Los resultados obtenidos en este aspecto, sumados a los antecedentes ya existentes permiten hipotetizar acerca de la importancia de la activación de la vía PI3K-Akt durante la reperfusión y cómo es que IGF-1 es capaz de promover un aumento en la sobrevida en este período al inducir una mayor activación de esta vía. Sin embargo, no está claro cuál es el estímulo clave que gatilla la activación durante la reperfusión y no en la isquemia. Es posible que el estímulo este acompañado directamente de los cambios redox que acompañan al proceso de I/R, como ocurre con la activación de otras proteínas durante la reperfusión y no en la isquemia, como JNK y ERK [87]. En relación a esto hay poca información, pero existe un estudio que ha reportado la prevención de la activación de Akt en I/R al utilizar N-acetilcisteína (precursor de glutatión, un atrapador de radicales libres), lo que confirma el papel que tendrían los radicales libres en la mayor activación de esta vía durante la reperfusión, por sobre el período isquémico.

7.5 Participación de la vía MEK-ERK en la citoprotección otorgada por IGF-1 en FCN sometidos a I/R.

La cascada de señalización ERK 1/2 es parte de la familia de kinasas serina treonina activadas por mitógenos (MAPKs), involucradas con la regulación, proliferación, diferenciación y sobrevida celular. Se ha descrito la activación de esta vía durante hipoxia-reoxigenación y frente a eventos de I/R [88], así como también se ha demostrado que esta vía es responsable en parte de los efectos protectores y anti-apoptóticos de IGF-1 [34]. Sin embargo, no existen estudios que relacionen directamente la protección de IGF-1 en la ocurrencia de I/R con una mayor activación de la cascada de transducción de la familia de MAPK; ni menos aún acerca de cuál es la contribución en la sobrevida de fibroblastos cardiacos.

Para determinar el papel de la proteína ERK en la muerte inducida por I/R, se utilizó PD98059 un inhibidor de la vía ERK, cuya especificidad por MEK1/MEK2 (el activador río arriba de ERK1/ERK2) ha sido demostrado en estudios celulares *in vitro e in vivo* [89]. De

acuerdo a nuestros resultados, la proteína p-ERK 1/2 sigue un patrón de activación similar al observado por p-Akt, pero con algunas diferencias entre ambos. Las proteínas p42 y p44 se encuentran ya fosforiladas y activas desde antes de comenzar la isquemia. Luego disminuye fuertemente sus niveles de activación durante la isquemia. En los primeros minutos y después de haber transcurrido 24 horas de reperfusión se retoman los valores de activación observados en el control. El estímulo con IGF-1 no fue capaz de revertir la disminución observada de p-ERK 1/2 en la isquemia, pero sí logró inducir un aumento en la activación de la proteína al inicio de la reperfusión. Esta activación se mantuvo alta tras 24 hrs. Los resultados obtenidos con el inhibidor de esta vía confirman lo anteriormente expuesto, al indicar que la protección de la viabilidad y el efecto anti-apoptótico otorgado por IGF-1 son totalmente neutralizados por PD98059. Estos resultados sugieren que la activación de ERK juega un papel esencial en la protección otorgada por IGF-1. A pesar de que no existen estudios en la literatura que observen los efectos de IGF-1 en la activación de p-ERK tras I/R, se han descrito resultados similares en relación a la inactivación de la vía durante isquemia y reactivación en reperfusión. En el trabajo de Engelbrecht *et al.* sobre I/R simulada sobre cardiomiocitos [86] nuevamente se observó un pequeño aumento de la fosforilación de ERK a los 5 min de Isquemia simulada, disminuyendo luego sus niveles con respecto al control utilizado. Ambas isoformas de ERK fueron fosforiladas en la reperfusión, mostrando un máximo a los 5 min de este evento; y manteniéndose fosforiladas hasta los 30 min. Este dato sugiere que la reperfusión es capaz de inducir un fuerte aumento en la fosforilación de ERK 1/2. Sin embargo, nuestro resultado indica que la reperfusión aumenta los niveles pero sólo hasta niveles cercanos a los observados en el control. Esta aparente discrepancia podría ser producto de diferencias en los niveles de expresión en distintos tipos de células, e incluso entre las distintas isoformas de ERK. En modelos *in vivo* sometidos a ligación de la arteria coronaria seguida de reperfusión [90], se observó que los niveles fosforilados de ERK 1/2 no cambiaron después de 30, 60 o 120 min de isquemia. Sin embargo p44ERK fue fosforilado de manera significativa a los 30 min de reperfusión, mientras que a ese mismo tiempo p42ERK recuperó los niveles de fosforilación observados en el control a tiempo 0, dato que se asemeja a nuestro

resultado. Además se debe tomar en cuenta la fuerte activación de ERK 1/2 en la condición control de nuestro trabajo, que podría explicar las diferencias observadas. Se ha descrito la activación de esta vía como un mecanismo de protección frente a condiciones de estrés mecánico y privación de suero [91], ante las cuales otras proteínas como p-Akt serían menos sensibles y por ende no mostrarían un aumento en su fosforilación. Aplicando esta información a nuestro trabajo, es posible que el largo tiempo (24 hrs) que permanecen los fibroblastos en medio de cultivo en ausencia de suero, así como el estrés mecánico que sufren producto de el cambio constante de medio y el contacto con material de plástico generen la activación previa de estas señales, para poder mantener la viabilidad de las células.

En contraste con nuestros resultados, Bogoyevitch *et al.* [92] reportaron que en un modelo *in vivo* de corazones de ratas que ni la isquemia ni la reperfusión activan ERK 1/2, mientras que el estudio de Punn *et al.* [85] confirma la activación de p44/42 a 10 y 20 min de isquemia simulada y en la posterior reperfusión. Una posible explicación a estas diferencias se debe a las diferencias entre modelos *in vivo/ in vitro*, e incluso entre la manera en que se simuló la isquemia en condiciones *in vitro*. Punn *et al.* utilizaron ditionito de sodio para depletar el oxígeno de la solución y simular las condiciones hipóxicas de la isquemia no letal. Sin embargo, resultados previos de nuestro laboratorio usando este compuesto demostraron efectos negativos para la supervivencia de fibroblastos cardiacos (datos no mostrados), por lo que se optó por utilizar nitrógeno para “desplazar” al oxígeno y así simular la hipoxia isquémica. Además, se debe mencionar que las condiciones en las que los fibroblastos estuvieron expuestos durante el periodo isquémico no fueron de completa falta de oxígeno o anoxia, lo que sugiere otra posible diferencia con los modelos *in vivo* como el realizado por Bogoyevitch *et al.*

Esta controversia acerca de los niveles de activación de ERK 1/2 en isquemia y en reperfusión, es difícil de resolver, ya que son muchos los cambios que ocurren en ambos procesos (variación en los niveles de O₂, metabolismo, niveles de ATP, gradientes de pH, y de radicales libres) y que podrían determinar la menor o mayor activación de estas proteínas en una u otra fase. De estos eventos, la producción de radicales libres ha sido

uno de los más estudiados, donde se ha demostrado que ERK es activado por el estrés oxidativo [93] lo que lleva a sugerir que la producción de ROS en la reperfusión podría estar explicando la mayor activación de ERK durante la reperfusión [94]. Otro elemento que también pudiese explicar este patrón de activación son los niveles de ATP, indicativos del metabolismo celular. En un estudio de I/R simulada *in vitro* sobre células derivadas de cardiomiocitos, se observó que la activación de ERK durante la reperfusión no ocurría si es que las mitocondrias eran inhibidas antes y durante la reperfusión [95]. Lo que estaría señalando que estas kinasas no podrían activarse en isquemia debido a la carencia en los niveles de ATP y también que la reintroducción de oxígeno por sí sola no sería suficiente para gatillar la fosforilación de ERK. Estos datos en conjunto, invitan a reflexionar acerca de cómo es que en ciertos casos, la reperfusión sanguínea podría no ser capaz de activar las vías de supervivencia como ERK para proteger a las células cardíacas, si es que estas tienen su condición metabólica debilitada (y son incapaces de producir ATP) producto de un periodo prolongado de isquemia.

Tomando en cuenta nuestros resultados acerca de la neutralización de los efectos otorgados por IGF-1 por el uso de inhibidores de Akt y ERK, se podría concluir que ambas vías son importantes para mediar los efectos brindados por IGF-1 y que por ende, el inhibir una de ellas, se obtendría un efecto parcial de protección. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que los efectos de IGF-1 sobre la viabilidad fueron neutralizados por completo al inhibir una sola de estas vías, ya sea ERK o Akt, lo que estaría sugiriendo una comunicación cruzada entre ambas vías. Existe información controversial acerca de si es que la activación de PI3K puede llevar a la activación de Ras y MAPK. Se ha observado que las vías de PI3K y MAPK convergen en algún punto antes de la activación de MEK [96]. Ciertos estudios han mostrado que después de determinado estímulo, MEK podría ser activada por medio de la vía PI3K [97]. De manera de poder comprobar si es que en nuestro trabajo existiese tal interrelación entre estas vías de supervivencia, se podría observar la fosforilación y activación de las proteínas ERK y Akt al utilizar los inhibidores cruzados, es decir observar si el inhibidor de ERK (PD98059) inhibe la activación de Akt al estimular con IGF-1.

En este trabajo se evaluó la activación de las vías de ERK y Akt, debido a que son reconocidas como las clásicas vías de supervivencia activadas por IGF-1, y en particular en procesos de I/R. Sin embargo, no podemos descartar los efectos de IGF-1 sobre otras proteínas como JNK y p38 MAPK de las cuales se ha demostrado su participación en la muerte de cardiomiocitos por apoptosis causada por I/R [86], así como se ha descrito que IGF-1 es capaz de inhibir la activación de ambas proteínas kinasas [84]. Conociendo esto sería interesante en un trabajo a futuro investigar cómo se involucran estas proteínas en la muerte de fibroblastos cardíacos sometidos a nuestro modelo de I/R simulada y poder determinar la modulación de sus actividades por IGF-1.

Finalmente, los antecedentes descritos, nos llevan a asegurar que IGF-1, tiene un efecto citoprotector en los FCN frente a I/R, mediado por la activación de las vías de transducción PI3K/Akt y MEK/ERK, confirmando nuestra hipótesis. Junto con ello es necesario dilucidar que otras proteínas participan en la protección otorgada por IGF-1 para poder modular su actividad. Si bien son conocidos los efectos cardioprotectores de IGF-1 frente a I/R, esta relación solo había sido estudiada en cardiomiocitos. Nuestros resultados confirman que esta protección también se presenta en fibroblastos cardíacos, apoyando otro elemento beneficioso de este factor de crecimiento sobre el corazón infartado. Tomando ambos datos en consideración, es posible entender que si se logra disminuir la pérdida de viabilidad de tanto cardiomiocitos como fibroblastos cardíacos tras el daño ocasionado por isquemia y particularmente por el período de reperfusión, el corazón mantendrá una mejor capacidad funcional y a la vez realizará una mejor cicatrización del tejido cardíaco dañado, disminuyendo la posibilidad de formación de tejido fibrótico post infarto.

Las limitaciones que afectaron a este trabajo fueron:

- No haber determinado los niveles de ATP y sus variaciones en nuestro modelo de I/R.
- La carencia de medición de otros parámetros indicativos del proceso apoptótico tales como caspasas efectoras y elementos pro-apoptóticos como Bad y Bax.
- Falta de medición de la actividad de LDH liberada como marcador de necrosis al incubar con IGF-1, para poder determinar el grado de protección de este factor de crecimiento frente a este tipo de muerte.
- Faltó por determinar mediante IWB, la inhibición de las proteínas p-Akt y p-ERK 1/2 al utilizar los inhibidores LY294002 y PD98050, respectivamente.
- No haber utilizado los inhibidores antes mencionados de manera conjunta para observar si es que la inhibición de ambas vías de sobrevida activadas por IGF-1 genera una mayor o igual pérdida de la sobrevida de FCN.
- Por último, también faltó realizar por IWB la inhibición cruzada de las vías estudiadas, es decir, si LY294002 inhibe en cierta medida la activación de p-ERK y PD98050 con la activación de p-Akt.

8. CONCLUSIONES

- Los FCN sometidos a 8 hrs de isquemia simulada *in vitro* no sufren pérdida significativa de la viabilidad, sin embargo 12 hrs o más de este evento generan una pérdida progresiva en la sobrevivencia celular.
- La reperfusión simulada *in vitro* realizada tras 8 hrs de isquemia es capaz de generar una importante pérdida de la viabilidad de los fibroblastos, de manera tiempo dependiente.
- La muerte producida en FCN por I/R corresponde a apoptosis y necrosis.
- IGF-1 es capaz de prevenir la pérdida de viabilidad y disminuir el porcentaje de apoptosis de FCN sometidos a I/R simulada *in vitro*, al ser incubado durante la reperfusión e I/R.
- Los efectos protectores de la viabilidad de IGF-1 son mediados por la activación de las vías de sobrevivencia MEK-ERK y PI3K.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud, 55ª Asamblea Mundial de la Salud, A55/16, punto 13.11, 27 de Marzo de 2002.
2. Weber, K.T., *Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts*. Journal of Hypertension, 2004. 22(1): p. 47-50.
3. Silzle, T., et al., *The fibroblast: Sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue*. International Journal of Cancer, 2004. 108(2): p. 173-180.
4. Gabbiani, G., *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. The Journal of Pathology, 2003. 200: p. 500-503.
5. Buja, L.M., *Myocardial ischemia and reperfusion injury*. Cardiovascular Pathology, 2005. 14(4): p. 170-175.
6. Maxwell, S.R.J. and G.Y.H. Lip, *Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options*. International Journal of Cardiology, 1997. 58(2): p. 95-117.
7. Buja, L.M., H.K. Hagler, and J.T. Willerson, *Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury*. Cell Calcium, 1988. 9(5-6): p. 205-217.
8. Bratton, S.B. and G.M. Cohen, *Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego?* Trends in Pharmacological Sciences, 2001. 22(6): p. 306-315.
9. Assunção Guimarães, C. and R. Linden, *Programmed cell deaths*. European Journal of Biochemistry, 2004. 271(9): p. 1638-1650.
10. Mayorga, M., et al., *Bcl-2 Is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(33): p. 34882-34889.
11. Evan, G.I., et al., *Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein*. Cell, 1992. 69(1): p. 119-128.
12. Fiers, W., et al., *More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage*. Oncogene, 1999. 18(54): p. 7719-7730.

13. Vetterlein, F., et al., *Extent of damage in ischemic, nonreperfused, and reperfused myocardium of anesthetized rats*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2003. 285(2): p. H755-H765.
14. Freude, B., et al., *Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2000. 32(2): p. 197-208.
15. Gottlieb, R.A., et al., *Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes*. Journal of Clinical Investigation, 1994. 94(4): p. 1621-1628.
16. Hamacher-Brady, A., N. Brady, and R. Gottlieb, *The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2006. 20(6): p. 445-462.
17. Ganote, C.E., *Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1983. 15(2): p. 67-73.
18. Jennings, R.B., K.A. Reimer, and C. Steenbergen, *Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1986. 18(8): p. 769-780.
19. Takemura, G., et al., *Role of Apoptosis in the disappearance of Infiltrated and proliferated Interstitial cells after myocardial Infarction*. Circulation Research, 1998. 82(11): p. 1130-1138.
20. Buja, L.M. and M.L. Entman, *Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease*. Circulation, 1998. 98(14): p. 1355-1357.
21. Buja and M. L, *Modulation of the myocardial response to ischemia*. Laboratory Investigation, 1998. 78(11): p. 1345-73.
22. Zhu, Y., et al., *Transforming growth factor-beta Increases bad phosphorylation and protects neurons against damage*. The Journal of Neuroscience, 2002. 22(10): p. 3898-3909.
23. Froesch, E.R., et al., *Actions of insulin-like growth factors*. Annual Review of Physiology, 1985. 47(1): p. 443-467.

24. Buerke, M., et al., *Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. 92(17): p. 8031-8035.
25. Webster, et al., *Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH Shift and is independent of p53*. Journal of Clinical Investigation, 1999. 104(3): p. 239-252.
26. Brar, B.K., et al., *Urocortin Protects against Ischemic and Reperfusion Injury via a MAPK-dependent Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(12): p. 8508-8514.
27. Fujio, Y., et al., *Akt Promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against Ischemia-reperfusion injury in mouse heart*. Circulation, 2000. 101(6): p. 660-667.
28. Ullrich, A., et al., *Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity*. EMBO Journal, 1986. 5(10): p. 2503-2512.
29. Suleiman, M.S., R.J.R. Singh, and C.E.H. Stewart, *Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I*. Pharmacology & Therapeutics, 2007. 114(3): p. 278-294.
30. Adams, T., et al., *Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor*. Cell Molecular Life, 2000. 57(7): p. 1050-93.
31. De Meyts, P., et al., *The insulin-like growth factor-I receptor*. Hormone Research in Pediatrics, 1994. 42(4-5): p. 152-169.
32. Ullrich, et al., *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. 61(2): p. 203-12.
33. Conti, E., et al., *Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor*. Circulation, 2004. 110(15): p. 2260-2265.
34. Parrizas, M., A.R. Saltiel, and D. LeRoith, *Insulin-like growth factor inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(1): p. 154-161.

35. J M Backer, et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation*. EMBO Journal, 1992. 11(9): p. 3469-3479.
36. Ding, Z., et al., *Physical Association of PDK1 with AKT1 Is sufficient for pathway activation independent of membrane localization and phosphatidylinositol 3 kinase*. PLoS ONE, 2010. 5(3): p. e9910.
37. Avruch, J., et al., *Ras activation of the raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade*. Recent Progress in Hormone Research, 2001. 56(1): p. 127-156.
38. Harrington, E.A., et al., *c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines*. EMBO, 1994. 13(14): p. 3286-3295.
39. Kulik, G., A. Klippel, and M.J. Weber, *Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt*. Molecular Cellular Biology, 1997. 17(3): p. 1595-1606.
40. Noguchi, S., et al., *Insulin-like growth factor-I ameliorates transient ischemia-induced acute renal failure in rats*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1993. 267(2): p. 919-926.
41. Gluckman, P., et al., *A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. 182(2): p. 593-599.
42. Q Li, et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy*. Journal of Clinical Investigation, 1997. 100(8): p. 1991-1999.
43. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Acts*. Genes & Development, 1999. 13(22): p. 2905-2927.
44. Bueno, O.F., et al., *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice*. EMBO Journal, 2000. 19(23): p. 6341-6350.
45. Scheid, M.P. and V. Duronio, *Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: Involvement of MEK upstream of Bad*

- phosphorylation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. 95(13): p. 7439-7444.
46. Armstrong, S.C., *Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury*. Cardiovascular Research, 2004. 61(3): p. 427-436.
 47. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovascular Research, 2004. 61(3): p. 448-460.
 48. Zhang, X., et al., *Differential vulnerability to oxidative stress in rat cardiac myocytes versus fibroblasts*. Journal of the American College of Cardiology, 2001. 38(7): p. 2055-2062.
 49. Chen, S.J., M.E. Bradley, and T.C. Lee, *Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: Modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1998. 178(1): p. 141-149.
 50. Foncea., et al., *Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(31): p. 19115-19124.
 51. Reimer, K.A., R.B. Jennings, and M.L. Hill, *Total ischemia in dog hearts, in vitro 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity*. Circulation Research, 1981. 49(4): p. 901-911.
 52. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling*. Pharmacology & Therapeutics, 2009. 123(2): p. 255-278.
 53. Esumi, K., et al., *NADH measurements in adult rat myocytes during simulated ischemia*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 1991. 260(6): p. H1743-H1752.
 54. Jennings, R.B., et al., *Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo*. Circulation Research, 1981. 49(4): p. 892-900.

55. Li, P., et al., *Atrial natriuretic peptide Inhibits transforming growth factor {beta}-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts*. *Circulation Research*, 2008. 102(2): p. 185-192.
56. Brar, B.K., et al., *Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation*. *Cardiovascular Research*, 2001. 51(2): p. 265-274.
57. Vanden Hoek, T.L., et al., *Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 1996. 270(4): p. H1334-H1341.
58. Jolly, S.R., et al., *Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase*. *Circ Res*, 1984. 54(3): p. 277-285.
59. Halestrap and P. A, *Calcium, mitochondria and reperfusion injury : a pore way to die*. *Biochemical Soc Trans* 2006. 34(2): p. 232-237.
60. Kloner, E.B.a.R.A., *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* *Journal of Clinical Investigation*, 1985. 76(5): p. 1713-1719.
61. Hayakawa, K., et al., *Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage*. *Circulation*, 2003. 108(1): p. 104-109.
62. Lundberg, K.C. and L.I. Szweda, *Initiation of mitochondrial-mediated apoptosis during cardiac reperfusion*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004. 432(1): p. 50-57.
63. Fliss, H. and D. Gatteringer, *Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium*. *Circulation Research*, 1996. 79(5): p. 949-956.
64. Zhao, Z.-Q., et al., *Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death*. *Cardiovascular Research*, 2000. 45(3): p. 651-660.
65. Kubasiak, L.A., et al., *Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. 99(20): p. 12825-12830.

66. A Stephanou, et al., *Distinct initiator caspases are required for the induction of apoptosis in cardiac myocytes during ischaemia versus reperfusion injury*. *Cell Death and Differentiation*, 2001. 8(4): p. 434-435.
67. Gores, G.J., et al., *Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death*. *The Journal of Clinical investigation*, 1989. 83(2): p. 386-96.
68. Zhao, Z.-Q., et al., *Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion*. *Apoptosis*, 2001. 6(4): p. 279-290.
69. Ganz, W., et al., *Does reperfusion extend necrosis? A study in a single territory of myocardial ischemia--half reperfused and half not reperfused*. *Circulation*, 1990. 82(3): p. 1020-1033.
70. Trump, B.E., et al., *The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis*. *Toxicologic Pathology*, 1997. 25(1): p. 82-88.
71. Bonfoco, E., et al., *Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. 92(16): p. 7162-7166.
72. Itoh, et al., *DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis*. Vol. 146. 1995, Bethesda, MD, ETATS-UNIS: American Society for Investigative Pathology.
73. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007. 32(1): p. 37-43.
74. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Cardioprotective growth factors*. *Cardiovascular Research*, 2009. 83(2): p. 179-194.
75. Yamamura, T., et al., *IGF-I differentially regulates Bcl-xL and Bax and confers myocardial protection in the rat heart*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2001. 280(3): p. H1191-H1200.

76. Valentinis, B., et al., *Growth and differentiation signals by the Insulin-like growth factor 1 receptor in hemopoietic cells are mediated through different pathways.* Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(18): p. 12423-12430.
77. Matsui, T., et al., *Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes In vitro.* Circulation, 1999. 100(23): p. 2373-2379.
78. Pi, Y., M. Goldenthal, and J. Marín-García, *Mitochondrial involvement in IGF-1 induced protection of cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury.* Molecular and Cellular Biochemistry, 2007. 301(1): p. 181-189.
79. Eefting, F., et al., *Role of apoptosis in reperfusion injury.* Cardiovascular Research, 2004. 61(3): p. 414-426.
80. Yaoita, H., et al., *Attenuation of ischemia/reperfusion Injury in rats by a caspase inhibitor.* Circulation, 1998. 97(3): p. 276-281.
81. Hanlon, P.R., et al., *Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling.* The FASEB Journal, 2005. 19(10): p. 1323-1325.
82. Cross, T.G., et al., *Serine/threonine protein kinases and apoptosis.* Experimental Cell Research, 2000. 256(1): p. 34-41.
83. Mocanu, M.M., R.M. Bell, and D.M. Yellon, *PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2002. 34(6): p. 661-668.
84. Yamashita, K., et al., *Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1.* Circ Res, 2001. 88(6): p. 609-614.
85. Punn, A., et al., *Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes.* Biochemical 2000. 15(350): p. 891-899.

86. Engelbrecht, A.M., et al., *p38 and JNK have distinct regulatory functions on the development of apoptosis during simulated ischaemia and reperfusion in neonatal cardiomyocytes*. Basic Research in Cardiology, 2004. 99(5): p. 338-350.
87. Laderoute, K.R. and K.A. Webster, *Hypoxia/reoxygenation stimulates Jun kinase activity through redox signaling in cardiac myocytes*. Circulation Research, 1997. 80(3): p. 336-344.
88. Yue, T.-L., et al., *Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-Induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion Injury in isolated perfused heart*. Circ Res, 2000. 86(6): p. 692-699.
89. Dudley, D.T., et al., *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. 92(17): p. 7686-7689.
90. Omura, T., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases in in vivo ischemia/reperfused myocardium in rats*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1999. 31(6): p. 1269-1279.
91. Cowan, et al., *Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress*. Vol. 206. 2003, Cambridge, ROYAUME-UNI: Company of Biologists. 9.
92. Bogoyevitch, M.A., et al., *Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart: p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion*. Circulation Research, 1996. 79(2): p. 162-173.
93. Guyton, K.Z., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(8): p. 4138-4142.
94. Zweier, J.L., et al., *Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart*. Journal of Biological Chemistry, 1989. 264(32): p. 18890-18895.

95. Abas, L., M.A. Bogoyevitch, and M. Guppy, *Mitochondrial ATP production is necessary for activation of the extracellular-signal-regulated kinases during ischaemia/reperfusion in rat myocyte-derived H9c2 cells*. *Biochemical Journal*, 2000. 349(1): p. 119-126.
96. Cross, et al., *The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin : evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf*. Vol. 303. 1994, Colchester, ROYAUME-UNI: Portland Press.
97. Karnitz, L.M., et al., *Interleukin-2 triggers a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent MEK activation pathway*. *Molecular Cellular Biology*., 1995. 15(6): p. 3049-3057.