



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

**LPS PREVIENE LA PÉRDIDA DE VIABILIDAD DE FIBROBLASTOS
CARDIACOS INDUCIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN SIMULADA:
ROL PROTECTOR DEL RECEPTOR DE TIPO TOLL 4.**

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

CRISTIAN QUEIROLO FUENTES

Directores : Dr. Guillermo Díaz Araya
Dr. Pedro Segundo Ayala Jeria

Patrocinante : Dr. Guillermo Díaz Araya

Santiago, Chile 2014

... A mis padres, hermanos y mi amor,
sin ellos esto hubiera sido imposible...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi familia, en especial a mis padres y hermanos. Su apoyo fue fundamental para poder cursar exitosamente todos los objetivos que me planteé en estos arduos años de carrera. Gracias por ayudarme y levantarme en los momentos más difíciles, gracias por aguantarme, por entenderme y por contar siempre con su apoyo. Ustedes fueron el foco que iluminó mi camino durante todo este tiempo, espero poder ser capaz de retribuirles todo lo que me entregaron.

Agradezco al Dr. Guillermo Díaz por abrirme las puertas de su laboratorio, por guiarme durante más de un año en este trabajo, y por enseñarme el mundo de las ciencias desde el ámbito profesional. Estaré siempre agradecido de usted por todo lo que me entregó como su estudiante.

A mis compañeros del laboratorio: Raúl, Pedro, Diego, Rodo, Clodito, Roxi, Ricardo, Samir y Pía, a todos ustedes les agradezco por permitirme formar parte de este gran grupo. Gracias por hacer que todas esas largas horas de trabajo en el laboratorio fueran tan agradables.

Quisiera agradecer también enormemente a Raúl y Pedro, quienes me ayudaron en innumerables ocasiones con este trabajo. Gracias por estar ahí cada vez que los necesité, por cada consejo que me dieron, y por su entrega de conocimientos durante el periodo que trabajé con ustedes.

Agradezco a mis amigos y compañeros de universidad, en especial a Memo, Chamilo, Pablo, Sano, Ale y Marce por su amistad durante el periodo universitario y que ha perdurado hasta hoy, por todos los buenos momentos que pasamos y por los que vendrán.

Finalmente quisiera agradecer a Romina, mi amor, quien fue mi gran apoyo durante todo estos años de vida universitaria. Gracias por creer en mí, por ser mi cable a tierra, por estar siempre junto a mí en los momentos más difíciles y por ser capaz de alegrar mi vida día a día. Sin ti nada de esto hubiera sido posible.

A todos ustedes, muchas gracias.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, con el financiamiento del proyecto Fondecyt 1130300.

CONGRESOS:

1. Queirolo C., Ayala P., Vivar R., García L., Díaz-Araya G. "LPS PREVIENE LA MUERTE DE FIBROBLASTOS CARDIACOS INDUCIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN SIMULADA". XXXV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Valdivia, Chile, 27-30 de Noviembre de 2013.

2. Queirolo C., Ayala P., García L., Díaz-Araya G. "LPS PREVIENE LA PERDIDA DE VIABILIDAD DE FIBROBLASTOS CARDIACOS INDUCIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN SIMULADA: ROL PROTECTOR DEL RECEPTOR DE TIPO TOLL 4". XXXVI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Chillan, Chile, 5-7 de Noviembre de 2014.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	10
SUMMARY.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Generalidades.....	12
1.2. Corazón.....	12
1.3. Fibroblastos cardiacos.....	13
1.4. Infarto cardiaco.....	14
1.5. Modelos de isquemia/reperfusión.....	15
1.6. Daño provocado por isquemia/reperfusión.....	15
1.7. Muerte celular.....	17
1.7.1. Tipos de muerte celular.....	17
1.7.1.1. Apoptosis.....	17
1.7.1.2. Necrosis.....	18
1.7.2. Muerte celular durante la isquemia.....	19
1.7.3. Muerte celular durante la reperfusión.....	19
1.7.4. Muerte de fibroblastos cardiacos durante la isquemia/reperfusión.....	19
1.8. Toll-like receptors (TLRs).....	20
1.8.1. Generalidades.....	20
1.8.2. Clasificación de los receptores de tipo toll.....	21
1.8.3. TLR4.....	22
1.8.3.1. Vía dependiente de MyD88.....	22

1.8.3.2. Vía independiente de MyD88.....	23
1.8.4. Receptores de tipo toll en patologías cardiovasculares.....	23
1.9. Efecto de LPS sobre los fibroblastos cardiacos.....	24
2. HIPÓTESIS.....	25
3. OBJETIVO GENERAL.....	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Reactivos.....	26
5.2. Modelo animal.....	26
5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos de ratas neonatas.....	26
5.4. Protocolo de ischemia/reperfusión simulada.....	27
5.5. Determinación de viabilidad celular.....	28
5.5.1. Conteo celular.....	28
5.5.2. MTT.....	28
5.6. Western blot.....	29
5.6.1. Preparación de extractos de proteínas totales.....	29
5.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	30
5.6.3. Electrotransferencia de proteínas.....	30
5.6.4. Reconocimiento por anticuerpos.....	30
5.7. Análisis estadístico.....	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Evaluación del efecto del pre-condicionamiento con LPS (24 y 16 horas) sobre la muerte de FC inducido por I/Rs (8/16 horas).....	32

6.2. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la isquemia o reperfusión en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	33
6.2.1. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la isquemia en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	33
6.2.2. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la reperfusión en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	34
6.3. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la isquemia y reperfusión en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	35
6.4. Participación del receptor de tipo toll 4 en la protección de FC inducida por LPS.....	36
6.5. Participación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en la protección de FC ejercida por LPS.....	38
6.5.1. Efecto de la inhibición de PI3K/Akt sobre la capacidad cito-protectora ejercida por LPS en FC sujetos a I/Rs.....	38
6.5.2. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre la capacidad cito-protectora ejercida por LPS en FC sujetos a I/Rs.....	39
6.6. Evaluación de la apoptosis en FC sujetos a I/Rs.....	40
6.6.1. Participación de la caspasa 8 en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	40
6.6.1.1. Efecto del tratamiento con LPS sobre el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 en FC sujetos a I/Rs.....	40
6.6.1.2. Participación del TLR4 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 inducido por I/Rs.....	41
6.6.1.3. Participación de la vía de señalización PI3K/Akt en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 inducido por I/Rs.....	43
6.6.1.4. Participación de la vía de señalización ERK1/2 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 inducido por I/Rs.....	44
6.6.2. Participación de la caspasa 3 en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	45
6.6.2.1. Efecto del tratamiento con LPS sobre el procesamiento proteolítico de la procaspasa 3 en FC sujetos a I/Rs.....	45

6.6.2.2. Participación del TLR4 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 3 inducido por I/Rs.....	46
6.6.2.3. Participación de la vía de señalización PI3K/Akt en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 3 inducido por I/Rs.....	47
6.6.2.4. Participación de la vía de señalización ERK1/2 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 3 inducido por I/Rs.....	48
7. DISCUSIÓN.....	49
7.1. Muerte de FC inducida por I/Rs.....	49
7.2. Efecto de LPS sobre la pérdida de viabilidad de FC sujetos a I/Rs.....	52
7.3. Participación del TLR4 en el efecto cito-protector mediado por LPS en FC sujetos a I/Rs.....	54
7.4. Participación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en el efecto cito-protector mediado por LPS en FC sometidos a I/Rs.....	56
7.5. Evaluación del efecto antiapoptótico mediado por LPS en FC sujetos a I/Rs.....	60
8. CONCLUSIONES.....	66
9. REFERENCIAS.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del pre-condicionamiento con LPS (24 y 16h) sobre FC sometidos a I/Rs.....	33
Figura 2. Efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la isquemia en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	34
Figura 3. Efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la reperfusión en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	35
Figura 4. Efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la isquemia y reperfusión en la muerte de FC inducida por I/Rs.....	36
Figura 5. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de TAK-242 durante la isquemia y reperfusión, sobre la muerte de FC inducida por I/Rs.....	37
Figura 6. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de Ly294002 durante la isquemia y reperfusión, sobre la muerte de FC inducida por I/Rs.....	39
Figura 7. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de PD98959 durante la isquemia y reperfusión, sobre la muerte de FC inducida por I/Rs.....	40
Figura 8. Efecto del LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8 en FC sujetos a I/Rs...	41
Figura 9. Participación del TLR4 en el efecto ejercido por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8 en FC sujetos a I/Rs.....	42
Figura 10. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de Ly294002 sobre el procesamiento de la procaspasa 8.....	43
Figura 11. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de PD98959 sobre el procesamiento de la procaspasa 8.....	44
Figura 12. Efecto del LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3 en FC sujetos a I/Rs..	45
Figura 13. Participación del TLR4 en el efecto ejercido por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3 en FC sujetos a I/Rs.....	46
Figura 14. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de Ly294002 sobre el procesamiento de la procaspasa 3.....	47
Figura 15. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de PD98959 sobre el procesamiento de la procaspasa 3.....	48

ABREVIATURAS

ADN	: Acido desoxirribonucleico
APS	: Persulfato de amonio
ATP	: Adenosina trifosfato
Bcl-2	: Proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2
Ca ²⁺	: Calcio
CA	: Cardiomiocitos
Cit. C	: Citocromo C
cm	: Centímetro
Csp	: Cantidad suficiente para
DAMPS	: Patrones moleculares asociados a daño
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DMEM	: Medio de mantención modificado Dulbecco
ERK	: Proteína kinasa regulada extracelularmente
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	: Ensayo inmuno enzimático
FBS	: Suero fetal de bovino
FCN	: Fibroblastos cardiacos neonatos
Fig.	: Figura
GAPDH	: Gliceraldehido 3-fostato deshidrogenasa
g	: Gramos
h	: Horas
HSP	: Proteínas de estrés térmico
HEPES	: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
I/R	: Isquemia/Reperusión
IGF-1	: Factor de crecimiento análogo a insulina tipo I
IκB	: Inhibidor de NF-κB
IL	: Interleuquina
iNOS	: Óxido nítrico sintasa inducible
IRF	: Factor regulatorio de interferón
IRAK	: Quinasa activada por el receptor de interleuquina
kDa	: kilo Dalton
LPS	: Lipopolisacárido
LRR	: Repeticiones ricas en leucina
mA	: Miliamper
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógenos
MEC	: Matriz extracelular
mg	: Milígramo
min	: Minuto
mL	: Mililitro
mm	: Milímetro
mM	: Milimolar

MMP	: Metaloproteinasa
MyD88	: Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
mV	: Milivolt
NaCl	: Cloruro de sodio
NaOH	: Hidróxido de sodio
NF-κB	: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	: Nanógramo
nm	: Nanómetro
nM	: Nanomolar
nmoles	: Nanomoles
PAMPS	: Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	: Amortiguador fosfato salino
p-ERK	: Proteína kinasa activada extracelularmente fosforilada
PI	: Ioduro de propidio
PI3-K	: Fosfatidilinositol-3-kinasa
PIP2	: Fosfatidil inositol-bifosfato
PKB	: Proteína kinasa B o Akt
rpm	: Revoluciones por minuto
s	: Segundo
SD	: Desviación estándar
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturante
SEM	: Error estándar de la media
TAK	: Quinasa activada por TGF-β
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Acido tricloroacético
TGF- β	: Factor de crecimiento transformante beta
TIR	: Dominio común del receptor de interleucina y receptor de tipo toll
TLR	: Receptor de tipo toll
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
μg	: Microgramo
μL	: Microlitro
μM	: Micromolar
μm	: Micrómetro
vs	: Versus
WB	: Western blot

RESUMEN

El daño ocasionado por la ocurrencia de un infarto cardiaco es complejo, generando la pérdida de viabilidad de las células cardiacas entre otros efectos deletéreos ocurridos tanto en el periodo isquémico de falta de oxígeno y nutrientes, así como también en la posterior reperfusión sanguínea. Frente a esta condición patológica los fibroblastos cardiacos (FC) son capaces de reaccionar, secretando y renovando la matriz extracelular; lo que los convierte en elementos celulares claves en la cicatrización y remodelamiento del tejido cardiaco dañado post-infarto al miocardio. Esto hace necesario el intentar regular la viabilidad de estas células para una correcta cicatrización y mantención de la función cardiaca. En relación a esto se ha reportado el efecto cardioprotector ejercido por el empleo de LPS en condiciones de daño celular causado por isquemia/reperfusión (I/R). Sin embargo, dicho efecto ha sido descrito principalmente en cardiomiocitos, por lo que su efecto en FC es aún desconocido.

Nuestro trabajo estudió la capacidad cito-protectora ejercida por LPS sobre FC de ratas neonatas sometidos a un modelo de I/R *in vitro* e indagó las vías transduccionales implicadas en este efecto. El tratamiento de los FC con LPS (1 µg/mL) durante la isquemia y reperfusión previno la pérdida de viabilidad inducida por I/R. Sin embargo, en el precondicionamiento con LPS durante 24 o 16 h, y en el tratamiento con LPS durante la isquemia o reperfusión, no se observó el efecto cito-protector. En esta misma línea, demostramos que el efecto cito-protector ejercido por LPS es mediado a través del receptor TLR4 vía PI3K/Akt y ERK1/2, ya que el empleo de TAK-242, Ly29002 y PD98059, inhibidores del receptor y de las vías transduccionales respectivamente, bloquearon completamente el efecto cito-protector. La activación de TLR4 por LPS previno, además, el procesamiento de la procaspasa 8 y 3 inducido por I/R. Conjuntamente, demostramos que las vías PI3K/Akt y ERK1/2 participaban en la prevención del procesamiento de la procaspasa 8 ejercido por LPS, pero no tuvieron efecto en la activación de la caspasa 3. Nuestros resultados dan cuenta del efecto cito-protector y antiapoptótico ejercido por LPS a través de TLR4 vía PI3K/Akt y ERK1/2 frente a la muerte de FC inducida por I/R.

SUMMARY

LPS prevents cardiac fibroblasts loss induced by simulated ischemia/reperfusion: Protective role of Toll like receptor-4

The damage caused by a myocardial infarct is complex, causing cardiac cell viability loss, among other deleterious effects that occur during the ischemia period, such as lack of oxygen and nutrients; as well as the posterior reperfusion with blood. In this situation, cardiac fibroblasts react by secreting proteins and renewing the extracellular matrix. These properties make them a key element in the scar and remodeling process of the injured cardiac tissue. Thus, the viability of these cells are required to preserve the correct functioning of the heart. In this regard, the use of LPS as a cytoprotector agent in cardiac Ischemia/reperfusion (I/R) has been reported. However such effect has been described mostly in cardiomyocytes cells, whereas its role in cardiac fibroblasts remains unknown.

Our work studied the LPS cytoprotector effect in neonate cardiac fibroblast exposed to an *in vitro* model of I/R, and transductional pathways involved in this process were explored. Incubation with LPS (1µg/mL) during both ischemia and reperfusion periods prevented the I/R-induced cell loss. However, LPS used only during preconditioning, ischemia or reperfusion did not induced cytoprotection. Furthermore we demonstrated that the LPS-dependent protective effects were completely abolished when TLR4 receptor (TAK-242), and PI3K/Akt and ERK1/2 (Ly29002 and PD98059, respectively) inhibitors were used. These data suggest that LPS-dependent cytoprotector effects are mediated through TLR4 receptor activation and PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways. Additionally the activation of TLR4 by LPS prevented the cleave of procaspases 3 and 8 induced by I/R. Both PI3K/Akt and ERK1/2 were necessary for the prevention of the caspase 8 activation, but not of caspase 3. Our results conclude that LPS protects cardiac fibroblasts from I/R apoptosis by the activation of TLR4 and both PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

En la actualidad las enfermedades cardiovasculares (insuficiencia cardiaca, accidentes cerebro vasculares, enfermedades coronarias, etc.) representan el 27% de la mortalidad en los países desarrollados, siendo en estos casos el principal órgano afectado el corazón. Se espera que para el año 2020 estas enfermedades sean causantes del 73% de las defunciones y el 60% de la morbilidad, superando incluso a las del cáncer e infecciones ¹. Debido a estas preocupantes cifras, y a la relación que existe entre las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico, considerado una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la actualidad, resulta fundamental conocer las bases fisiopatológicas de los trastornos cardiovasculares, tanto a nivel celular y molecular.

1.2. Corazón

El corazón es un órgano que funciona a modo de bomba, el cual está encargado de la distribución de oxígeno y nutrientes por medio de la sangre a todo el resto del organismo. Está conformado principalmente por 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 cardiacos (FC) se caracterizan por ser las células más abundantes presentes en el corazón, esto debido a que representan 2/3 de la población celular de este órgano. Tanto cardiomiocitos y FC corresponden a los tipos celulares esenciales a nivel cardiaco, encargados de mantener la homogeneidad estructural y funcional del corazón. Esto ocurre a través de la mediación de señales estimuladoras e inhibitorias encargadas de regular procesos de crecimiento, proliferación, muerte así como también, el recambio de proteínas de la matriz extracelular ². Los cardiomiocitos dan cuenta del 30% de las células totales del corazón y ocupan el 70% de la masa tisular. Los FC, por otro lado, representan aproximadamente el 70% de las células totales restantes, pero solo aportan el 30% de la masa tisular ². Es importante recalcar que la proporción de cada tipo celular en el corazón

varía en función de la especie, pero en general los cardiomiocitos representan menos de la mitad de la población celular total del corazón ³.

1.3. Fibroblastos Cardiacos

Los fibroblastos se encuentran presentes en varios tejidos del cuerpo, presentando diversas formas y distribución. En un corazón normal, están dispuestos en forma de hojas y hebras, con una estructura aplanada y alargada, distribuyéndose a lo largo de los cardiomiocitos dentro de la red de colágeno que rodea a estas células ³. En lugar de la forma normal de “estrella aplanada”, que se observa en diversos tejidos, este se caracteriza morfológicamente por ser una célula alargada con un retículo endoplásmico altamente elaborado indicativo de su alta actividad celular ⁴. Además de mantener la integridad del tejido, el FC juega un papel activo en la producción y la mantención de la matriz extracelular, en la señalización hacia los cardiomiocitos a través del estrés mecánico, y proporcionar elementos de respuesta para el sistema inmune que son activados durante el daño miocárdico. A diferencia de los cardiomiocitos, cuyo número de células se ha establecido y se estabiliza varias semanas después del nacimiento, el número de FC continúa expandiéndose y las propias células crecen y se diferencian con el aumento del tamaño cardíaco ⁵.

Los FC cumplen diversas funciones, contribuyendo en las propiedades estructurales y bioquímicas del tejido cardíaco. Se caracterizan por mantener la estructura del corazón, regulando la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) y produciendo factores involucrados en la mantención del balance entre síntesis y degradación de los componentes del tejido conectivo: citoquinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas (MMP) ^{6,7}. De esta forma, cumplen un rol central al cooperar con la estructura y función de este tejido, regulando su arquitectura, propiedades mecánicas y eléctricas ^{8,9}. Estos se caracterizan, además, por su capacidad de migrar, proliferar y diferenciarse a un fenotipo más activo, denominado miofibroblasto cardíaco, características que le permiten ser eficientes al momento de la reparación tisular post-infarto cardíaco ¹⁰.

1.4. Infarto Cardíaco

El infarto cardíaco es una de las principales causas de muerte a nivel mundial ¹. Normalmente se divide en dos partes, el evento isquémico propiamente tal y la posterior restitución del flujo sanguíneo conocida como reperfusión. El daño inicial producido por la isquemia cardíaca se debe a la interrupción del flujo sanguíneo adecuado al tejido cardíaco. Al mantenerse deficiente el suministro de oxígeno y nutrientes, en el tejido isquémico se produce una perpetuación del daño, lo cual puede conducir finalmente a la muerte de las células presentes en el corazón. Durante la ocurrencia de un infarto al miocardio, el corazón recibe un flujo sanguíneo insuficiente, con daño tisular concomitante, debido a la obstrucción en una de las arterias coronarias ^{4,11,12}. El infarto cardíaco corresponde a un proceso dinámico que comienza con la transición desde un daño isquémico reversible a uno irreversible y culmina en el remplazo del miocardio por una cicatriz fibrosa ¹³. Hasta la fecha los modelos experimentales de infarto no explican o es muy difícil explicar lo que le ocurre a un determinado tipo celular debido a la complejidad de la estructura tisular. En este contexto, se han venido utilizando modelos experimentales de isquemia/reperfusión (I/R) simuladas.

1.5. Modelos de isquemia/reperfusión

Para poder estudiar los efectos provocados por el evento de I/R sobre las células cardíacas, se han desarrollado diversos modelos experimentales los cuales buscan recrear las condiciones a las que se ven sometidas las células presentes en el corazón frente a la ocurrencia de un infarto cardíaco. Para llevar a cabo tal fin, se han desarrollado modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

En el modelo *in vivo*, se han simulado eventos de I/R utilizando la ligación de la arteria coronaria izquierda, lo que permite bloquear el paso de sangre al corazón simulando de esta manera el evento isquémico. Una vez soltado el nudo utilizado para la ligación de la arteria, ocurre la restauración del flujo sanguíneo, simulando con esto la reperfusión ¹⁴. Otro modelo de I/R *in vivo* consiste en la utilización de fármacos como isoprotenerol, el cual a dosis repetidas, produce pequeñas lesiones tipo micro-infartos en animales de

experimentación¹⁵.

Los modelos de I/R *ex vivo* utilizan el método de Langendorff para simular la oclusión y posterior perfusión cardíaca. Para su realización, en primer lugar es necesario anestesiarse al animal para luego extraer el corazón y fijarlo en el dispositivo de Langendorff. A continuación el corazón es perfundido con buffer Krebs-Henseleit a una presión constante. Luego de la perfusión basal, el órgano es sometido al evento de I/R mediante el cese del flujo de la solución de perfusión¹⁶.

Los modelos *in vitro* utilizan cultivos celulares aislados. Para la realización de la isquemia *in vitro* (simulada), el medio de cultivo empleado en las células es reemplazado por un medio isquémico, el que cumple diversas condiciones para así simular de la forma más exacta posible el contexto generado en un infarto cardíaco. El medio isquémico empleado se mantiene a 37°C y pH 6,2, su composición en sales se asemeja a las concentraciones fisiológicas de estas durante la ocurrencia del infarto cardíaco, mientras que el pH ácido y la adición de ácido láctico permiten asemejar la acidosis intracelular que se genera producto de la glicólisis anaeróbica llevada a cabo por las células sometidas a condiciones isquémicas. Para simular la condición de hipoxia, se utilizan elementos que bloquean la fosforilación oxidativa como KCN, elementos encargados de remover el oxígeno presente como ditionito de sodio o la utilización de cámaras hipóxicas/isquémicas aisladas en las cuales el oxígeno dentro de estas es removido, siendo reemplazado por N₂, mediante la inyección de este durante un tiempo y presión determinada. La falta de nutrientes y ATP a la que se ven expuestas las células durante el evento isquémico es simulado mediante la utilización de 2-deoxi-D-glucosa, la cual es capaz de bloquear la realización de la glicólisis celular. Una vez terminada la isquemia simulada, el medio isquémico es removido y las células son reperfundidas con medio de mantenimiento, etapa correspondiente a la perfusión y en la que ocurre la restauración del oxígeno y nutrientes a las células^{17, 18}.

1.6. Daño provocado por isquemia/reperfusión

Con la pérdida de oxígeno debido al evento isquémico, rápidamente se detiene la fosforilación oxidativa mitocondrial, resultando en la pérdida de la principal fuente de ATP. Un incremento compensatorio en la glicólisis anaeróbica para la producción de ATP

conduce a la acumulación de H^+ y lactato, resultando en una acidosis intracelular e inhibición de la glicólisis, así como un metabolismo energético residual y generación de ácidos grasos mitocondriales. Inicialmente, existe un incremento en el flujo de K^+ relacionado a un aumento de la carga osmótica debido a la acumulación de metabolitos y fosfatos inorgánicos. Con un descenso substancial en el ATP, la bomba Na^+, K^+ - ATPasa es inhibida, resultando en una mayor disminución del K^+ y un incremento de Na^+ . El influjo de Na^+ , Cl^- y agua conduce al hinchamiento celular. También ocurre un incremento temprano en el Ca^{2+} debido a los cambios multifactoriales en el sarcolema y en el retículo sarcoplásmico. La activación de las proteasas inducida por Ca^{2+} causa la alteración en las proteínas contráctiles, disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} , y un daño sustancial de la contractibilidad. Todos estos desajustes producidos a nivel celular llevan a un hinchamiento de la mitocondria, retículo sarcoplásmico y citoplasma; y la marginación y aglutinación de la cromatina ⁴. Posteriormente se inician los efectos a nivel del metabolismo mitocondrial, y a la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS). Estos cambios conducen a un incremento progresivo en la permeabilidad de la membrana, cambios deletéreos en los electrolitos intracelulares y gasto de ATP ^{4, 19}.

Durante la reperfusión ocurre la activación de la cascada inflamatoria, que se manifiesta como daño funcional y progresión acelerada de la muerte celular. Los principales mediadores del daño por reperfusión corresponden nuevamente a radicales libres, y a la sobrecarga de Ca^{2+} . Las especies radicalarias aumentan el daño en la membrana, lo cual conduce a una mayor sobrecarga de Ca^{2+} , perpetuando de esta forma el daño a nivel celular ⁴.

Si bien los eventos descritos anteriormente en cuanto al daño provocado por I/R han sido identificados y estudiados profundamente en cardiomiocitos, debido a su importancia en la mantención de la función contráctil del corazón. Sin embargo, se desconoce que ocurre con las otras células cardiacas involucradas en el proceso y encargadas de mantener la estructura y función del corazón, como lo son los fibroblastos cardiacos.

1.7. Muerte Celular

1.7.1. Tipos de Muerte Celular

En la actualidad se sabe que existen dos patrones básicos de daño que conllevan a la muerte celular: daño celular por hinchamiento, conocido como oncosis; y daño celular que implica mecanismos de contracción, conocido como apoptosis, la cual corresponde a un tipo de muerte celular programada. Seguido a un daño letal, es posible distinguir 3 fases que permiten comprender los mecanismos que llevan a la muerte celular: (1) cambios que se denominan “pre-letales”, que son frecuentemente reversibles; (2) los “puntos de no retorno” o muerte celular; y (3) cambios autolíticos y degradativos “post-muerte”. Las alteraciones celulares “post-muerte” son denominadas como necrosis, la cual describe los cambios que las células sufren seguido a su muerte. En este punto, los cambios rápidamente convergen con una pérdida de volumen en el caso de la apoptosis y continúan con un hinchamiento en el caso de la oncosis. En la apoptosis, las etapas finales usualmente ocurren dentro de los sistemas fagolisosomales de células adjuntas que han fagocitado las células apoptóticas y fragmentos, siendo de esta manera fagocitados antes de su muerte ²⁰. Debido a esto último es que en la actualidad se considera que la muerte celular ocurre ya sea por un mecanismo apoptótico o necrótico, ya que la oncosis culmina fundamentalmente en necrosis, mientras que las células apoptóticas son principalmente fagocitadas antes de su muerte.

Con las salvedades mencionadas anteriormente, la muerte de las células cardíacas que se produce durante un episodio de I/R puede ser de dos tipos, necrosis o apoptosis ⁴.

1.7.1.1. Apoptosis

La apoptosis consiste en un tipo de muerte celular que cumple la función de remover las células dañadas, siendo esto necesario para el desarrollo normal de todo el organismo. Sin embargo, tanto su exceso (insuficiencia cardíaca), como su ausencia (cáncer), repercuten negativamente en el desarrollo normal del ser humano ¹⁹. El proceso apoptótico puede ser distinguido en células individuales usualmente rodeadas por células de aspecto normal, a diferencia de lo que ocurre en la necrosis. Se caracteriza por la contracción del volumen

celular, formación de ampollas en la membrana plasmática, mantención de la integridad de los organelos, y condensación y fraccionamiento del material genético, seguido por la eliminación a través de fagocitosis ²¹.

La muerte celular por apoptosis puede ser gatillada por varios estímulos, incluyendo estrés intracelular (vía intrínseca) y señalización mediada por receptores transmembrana (vía extrínseca). Estos mecanismos que han sido relacionados principalmente con la actividad de la familia de las caspasas. Las caspasas iniciadoras (caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 y 14) son activadas vía auto-procesamiento inducido por oligomerización, mientras que las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) son activadas por otras proteasas. La ruptura proteolítica de los substratos celulares gatillado por las caspasas efectoras determina en gran medida las características de la muerte celular apoptótica ²¹. Se han identificado tres vías principales de acuerdo a la caspasa iniciadora encargada de la activación de estas: (1) vía del receptor de muerte, la que involucra la caspasa 8; (2) vía gatillada por estrés del retículo endoplásmico, la cual se asocia a la activación de la caspasa 12; y (3) vía mitocondrial, en la que varias señales pueden gatillar la liberación de proteínas de daño desde la mitocondria hacia el citoplasma, conduciendo a la activación de la caspasa 9 ^{22, 23, 24}.

1.7.1.2. Necrosis

La necrosis corresponde a un tipo de muerte celular producto de una alteración severa de la homeostasis celular. En este tipo de muerte ocurre una violenta y rápida forma de daño que afecta amplias poblaciones celulares, caracterizada por una ruptura de la membrana plasmática y de los organelos intracelulares, además del fenómeno de hinchamiento celular. Al ocurrir la ruptura de la célula, se libera el contenido celular al intersticio, lo cual ayuda a desencadenar una respuesta inflamatoria ²⁴.

La muerte celular producto de la necrosis es un proceso que se desarrolla en estados patológicos gatillados por estímulos externos a la célula. En cambio la apoptosis, se caracteriza por ser producido por situaciones fisiológicas o patológicas en respuesta a estímulos endógenos o exógenos a la célula.

1.7.2. Muerte celular durante la isquemia

Periodos prolongados de isquemia provocan la muerte inevitable de cardiomiocitos por necrosis. Sin embargo, esta necrosis es un evento tardío dentro de la cronología de eventos isquémicos e inclusive ocurre mucho más tarde que el momento en el que la reperfusión ha comenzado a ejercer sus efectos, por lo que la necrosis miocárdica solo ocurriría en aquellas oclusiones sostenidas del flujo sanguíneo^{25, 26, 27}. Por otro lado, el papel que juega la apoptosis en la isquemia es controvertido. Algunos autores han demostrado que en este periodo existen potentes estímulos capaces de iniciar este mecanismo de muerte^{27, 28}. Otros dudan de su participación en la isquemia²⁵, debido a la lenta ejecución de la apoptosis¹²; y a que ésta es un proceso dependiente de ATP, molécula que es deficiente en la etapa de isquemia, pero que recupera sus niveles durante la reperfusión.

1.7.3. Muerte celular durante la reperfusión

La manera más efectiva para limitar la necrosis de las células cardiacas producida durante la isquemia es a través de la reperfusión¹⁹. Sin embargo, la reperfusión por sí misma podría resultar en un daño sobre las células, perpetuando la muerte celular por necrosis. Existe múltiple evidencia que permite afirmar que posterior al evento de I/R las células cardiacas mueren principalmente a través de apoptosis, sin descartar la contribución efectuada por la vía necrótica. Durante la reperfusión se ha observado: (1) fragmentación del material genético, (2) condensación nuclear de la cromatina, (3) restauración de los niveles de ATP, (4) mantención de la membrana plasmática, (5) participación de células inflamatorias, (6) generación de radicales libres, y (7) activación de caspasas. Todos estos factores son característicos de la muerte celular apoptótica^{4, 25, 27-29}.

1.7.4. Muerte de fibroblastos cardiacos durante I/R

La muerte celular producida por isquemia tiene características necróticas más preponderantes que la apoptosis³⁰. Sin embargo, resultados obtenidos en el laboratorio demuestran que los FC sujetos a 8 h de isquemia no experimentan una muerte celular

significativa, lo que genera que no se produzca ni necrosis ni apoptosis. La muerte significativa, observándose necrosis y apoptosis, ocurre a tiempos mayores a 12 h de isquemia^{31,32}. A pesar de esto, es posible observar en FC sujetos a tiempos de isquemia no letales la activación de las caspasas 3 y 9³¹. Esto se podría explicar debido a los diferentes estados energéticos que experimentan las células durante el periodo isquémico. Con el transcurso de la isquemia se observa una disminución en el nivel de ATP, lo que permitiría activar la vía intrínseca de la apoptosis (fragmentación y activación de las caspasas 3 y 9), pero estas proteínas no podrían translocar al núcleo donde ejercen sus efectos deletéreos³³.

Cuando los FC sometidos a una isquemia no letal son sujetos a reperfusión, estos muestran características apoptóticas, siendo capaces de activar la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis³¹. Se ha descrito en la literatura que la muerte celular por reperfusión es atribuida en mayor medida a la apoptosis más que a la necrosis. Sin embargo, antecedentes del laboratorio demuestran que en FC se genera una participación equitativa tanto de la apoptosis como de la necrosis en los efectos deletéreos gatillados por I/R³².

1.8. Toll-like receptors (TLRs)

1.8.1. Generalidades

Los “receptores de tipo toll” (TLRs), corresponden a una familia de receptores humanos estructuralmente relacionados al receptor toll presente en *Drosophila*³⁴⁻³⁷. Estos receptores reconocen patrones específicos de los componentes microbiológicos que son conservados entre los patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que no se encuentran presentes en los mamíferos. Además, tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Las DAMPs son moléculas generadas durante la ocurrencia de un daño a nivel celular y que son liberadas al intersticio y reconocidas por TLRs. En la vía de señalización de los TLRs, un adaptador común, MyD88, fue el primero en ser caracterizado como un componente esencial para la activación de la inmunidad innata por todos los TLRs. Sin embargo, diversos trabajos

indican que los TLRs individuales exhiben respuestas específicas. Más aun, ellos poseen sus propias moléculas de señalización, lo cual ratifica las respuestas específicas vinculadas con cada tipo de TLRs ³⁸. Estos datos sugieren la existencia de diversos subtipos de receptores de tipo toll, los cuales serán detallados a continuación.

1.8.2. Clasificación de los Receptores de tipo toll

Actualmente se conocen diez miembros de la familia de TLRs (TLR1-TLR10), los cuáles son capaces, como se mencionó anteriormente, de reconocer PAMPs. Dentro de estos ligandos es importante destacar que TLR1-TLR7 y TLR9 reconocen componentes microbianos. TLR2 es esencial para el reconocimiento de lipopéptidos microbianos. TLR1 y TLR6 se asocian con TLR2, y discriminan entre triacil y diacil lipopéptidos, respectivamente. TLR4 reconoce lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas. TLR9 es el receptor de DNA CpG, mientras que TLR3 está implicado en el reconocimiento de RNA de doble hebra (dsRNA). TLR5 es un receptor para flagelina. De esta forma los TLRs son capaces de discriminar entre patrones específicos de componentes microbianos ³⁸⁻⁴⁰. Basados en su localización subcelular, son divididos en TLRs de superficie celular e intracelular. Los TLRs de superficie celular incluyen TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, y TLR6. Los intracelulares corresponden a TLR3, TLR7, TLR8, y TLR9 ³⁹.

Los TLRs se encuentran dentro de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Dentro de las funciones en común que caracterizan a todos los subtipos de TLRs, encontramos: discriminar entre moléculas endógenas y exógenas, e inicialmente activar la respuesta inmune innata e inflamatoria gatillada por las moléculas externas; regular la respuesta inmune adaptativa; sensor moléculas endógenas o señales de daño que son liberadas desde tejidos dañados; y mantener la homeostasis de los tejidos regulando su reparación y regeneración ³⁹⁻⁴³.

1.8.3. TLR4

Corresponde a una glicoproteína integral de membrana. Dentro de las moléculas capaces de ejercer un efecto agonista sobre el TLR4 encontramos a PAMPs y DAMPs. Dentro de las pertenecientes al primer grupo podemos señalar a lipolisacárido (LPS), proteínas de fusión del virus respiratorio sincicial y la proteína de envoltura del virus del tumor mamario de ratón. Por otro lado, las pertenecientes al segundo grupo corresponden a moléculas endógenas tales como proteínas de shock térmico, ácido hialurónico y b-defensina II ⁴⁴, etc. La estimulación con LPS ocurre a través de una serie de interacciones con varias proteínas, dentro de las que se encuentran la proteína que une LPS (LBP), CD14, MD-2 y TLR4 ^{45, 46}.

El efecto agonista sobre TLR4 hace que este receptor sufra una oligomerización y reclute sus proteínas adaptadoras río abajo a través de las interacciones con los dominios TIR. Los dominios TIR cuentan con tres regiones altamente conservadas, que median la interacción proteína-proteína entre los TLRs y las proteínas adaptadoras encargadas de la transducción de la señal. Existen 5 proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR: MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM y SARM ⁴⁴.

La señalización mediada a través de LPS/TLR4 puede ocurrir vía dependiente e independiente de MyD88.

1.8.3.1. Vía Dependiente de MyD88

Además del dominio TIR, MyD88 también contiene un dominio de muerte (DD), que le permite reclutar otras moléculas que contengan DD. MyD88 recluta y activa una quinasa que contiene un DD, IRAK-4, la que además posee un dominio quinasa. La evidencia sugiere que IRAK-4 es responsable del reclutamiento, activación y degradación de IRAK-1. IRAK-1 activa río abajo a TRAF6, lo cual permite que TRAF6 forme un complejo con UBC13 y UEV1A, y active TAK1. Luego TAK1 activa río abajo a IKK y MAPK. IKK α , IKK β y IKK γ forman un complejo y fosforilan a la proteína inhibidora I κ B. Esta fosforilación conduce a la degradación de I κ B y la subsecuente translocación del factor de transcripción NF- κ B, que controla la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. La activación río abajo de la vía

de MAPK conduce a la inducción del factor de transcripción AP-1, que participa también en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Existen trabajos que postulan que tanto NF-κB y MAPK pueden también ser activados a través de una vía independiente de MyD88⁴⁴.

1.8.3.2. Vía Independiente de MyD88

TRIF es una importante proteína adaptadora que cuenta con dominio TIR y que media la señalización independiente de MyD88. La evidencia sugiere que TRIF juega un rol clave en la activación del factor transcripcional IRF3, y en la activación tardía de NF-κB y MAPK. TRIF, luego de unirse a TRAM y ser activado, interactúa con RIP1, que posee actividad serina/treonina quinasa y la cual participa en la translocación del factor de transcripción NF-κB y AP-1. Por otro lado, en esta vía también participa TRAF3, que es reclutada por medio de TRIF, y la cual se encarga de la activación de IRF3. TRAF3 se puede asociar con TANK, TBK1 y IKKi para así mediar la señalización río abajo que conduce a la activación de IRF3, la que junto a NF-κB, activan la transcripción de genes, como por ejemplo interferón Tipo I⁴⁴.

1.8.4. Receptores de tipo toll en patologías cardiovasculares

Existe gran cantidad de evidencia que señala que los TLRs son altamente expresados en células vasculares y del tejido cardíaco. Esto sugiere que estos receptores participan en el sistema cardiovascular, y probablemente están involucrados en el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares^{47, 48}.

Los TLRs participan en la mediación de la respuesta inmune innata frente a diversos estímulos, a nivel del sistema cardíaco. Estos receptores gatillan procesos inflamatorios ocurridos bajo la exposición a daño tisular, remodelamiento, estrés y ciertos factores externos. La activación de los TLRs presentes en las células cardíacas e inmunes conlleva consigo la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Estas citoquinas junto con componentes del complemento activado y el sistema de coagulación, podrían promover el desarrollo de una disfunción cardíaca⁴⁰. Diversa evidencia señala que la inflamación crónica, gatillada por una activación sostenida de los TLRs presentes en las células

cardiacas, se encuentra implicada en el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares. Sin embargo, una expresión disminuida y auto-limitada de citoquinas pro-inflamatorias permite que el tejido cardíaco pueda desarrollar una respuesta adaptativa al daño, actuando de esta forma como un sistema de alerta temprana ⁴⁰.

Dentro de las patologías cardiovasculares que se pueden desarrollar debido al funcionamiento defectuoso de los TLRs o de sus vías de señalización, encontramos por ejemplo: aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, infarto al miocardio, ataque isquémico, complicaciones cardiovasculares de la diabetes e hiperlipidemia, insuficiencia cardíaca, remodelamiento ventricular, miocarditis autoinmune, miocarditis viral, cardiomiopatía y disfunción cardíaca asociada con sepsis ^{40, 47}. En cuanto a las patologías mencionadas anteriormente, la que suscita mayor interés, debido a los objetivos del presente trabajo, corresponde al rol que cumplen los TLRs, fundamentalmente el TLR4, durante el desarrollo del infarto cardíaco y del ataque isquémico. La evidencia con respecto a la participación del TLR4 en el evento de I/R resulta muy controversial. Existen estudios que señalan que la activación de este receptor durante la ocurrencia del evento isquémico generaría efectos deletéreos ^{49, 50}. Por otro lado, diversos estudios indican que la activación del TLR4 en el evento de I/R contribuye a preservar la función cardíaca e impedir la muerte de cardiomiocitos ocurrida posterior a la reperfusión cardíaca ⁵¹⁻⁵³. A pesar de lo mencionado anteriormente, no existe evidencia del rol que cumple el TLR4 presente en los FC frente a la ocurrencia de un evento de I/R.

1.9 Efecto de LPS sobre los Fibroblastos cardiacos

En nuestro laboratorio se ha demostrado que los FC poseen el receptor TLR4, y que este es capaz de responder de manera temprana a la estimulación con LPS, conduciendo al aumento en la secreción de IL-1 β y TNF- α . También hemos demostrado que LPS a través de este receptor activa vías de supervivencia celular tales como PI3K/Akt y ERK1/2. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si el LPS a través de TLR4 es capaz de ejercer un efecto protector frente a mecanismos de muerte celular como la I/R. Responder esta interrogante es la parte central de esta memoria de título.

2. HIPÓTESIS

El lipopolisacárido (LPS), a través de la activación del receptor de tipo toll 4 (TLR4), previene la muerte de fibroblastos cardiacos sometidos a isquemia/reperfusión simulada (I/Rs).

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que LPS previene la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/R simulada, mediante la activación de TLR4.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que LPS protege de la muerte inducida por I/Rs por medio de un mecanismo de pre-condicionamiento (24 y 16 h).
2. Demostrar que LPS protege de la muerte inducida por I/Rs mediante su aplicación ya sea durante la isquemia o reperfusión, o en la isquemia y reperfusión simultáneamente.
3. Demostrar que la protección inducida por LPS es mediada a través del receptor de tipo toll 4.
4. Determinar la participación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en la protección ejercida por LPS a través de TLR4.
5. Demostrar que LPS es capaz de prevenir el procesamiento de las procaspasas 3 y 8 inducido por I/Rs.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU): triton X-100, piruvato de sodio, azul de tripan, anti-GAPDH Y PD98059. En Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU) se adquirió tripsina-EDTA, estándares de masas moleculares de proteínas pre-teñidas y suero fetal bovino (FBS). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se obtuvieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente utilizado para Western blot (Western Lightning) se adquirió en PerkinElmer Life Sciences, Inc (Boston, MA, EEUU). El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de FC se obtuvo en Falcon. Los anticuerpos para procaspasa/caspasa 8, procaspasa/caspasa 9 y procaspasa/caspasa 3 y NF- κ B se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Ly 294002 se adquirió de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). LPS-EB, LPS-EB Ultrapuro y TAK-242 se obtuvieron de Invivogen. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y ratón conjugados con peroxidasa de rábano se adquirieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). El anticuerpo contra β -tubulina se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

5.2. Modelo animal

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley neonatas de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales, contando además con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos de ratas neonatas

Se utilizó el procedimiento descrito por Vivar et al. (2012)⁵⁴, el cual describe la obtención de FC de ratas neonatas por medio de la separación de estas células de los cardiomiocitos mediante la adhesión diferencial de estos últimos en las placas de cultivo. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia. Luego se retiraron las aurículas, y los ventrículos se cortaron en pequeños fragmentos

para aumentar la superficie de contacto con la solución de digestión, formada en base a pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un pre-plaqueo de 2 h a 37° C en medio de cultivo conteniendo 5 % (v/v) FBS y 10 % (v/v) FCS en placas para cultivo de plástico. Por adhesión diferencial a la placa de cultivo se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Transcurridas las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10 % (v/v) FBS, y los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia. Las placas de cultivo con los fibroblastos se dejaron durante 3 días. Luego se removían las impurezas, restos celulares y células no cardíacas mediante la utilización de Buffer Fosfato Salino (PBS), para luego agregar un nuevo medio DMEM-F12 + 10% (v/v) FBS. Una vez conseguida la confluencia deseada, se realizó el pasaje 1 mediante tripsinización y los fibroblastos se sembraron nuevamente en DMEM-F12 + 10 % (v/v) FBS, lo que permitía la purificación de estos, respecto de otros tipos celulares. Finalmente los fibroblastos se privaron durante 16 h con medio de mantención DMEM-F12 para luego realizar los tratamientos correspondientes a cada experimento en particular, detallados en la sección Resultados.

5.4. Protocolo de I/R simulada

Para simular el proceso de isquemia, los FC se lavaron con PBS con el fin de retirar los nutrientes remanentes del DEMEM-F12. Luego se incubaron en el medio isquémico, el que estaba formado por amortiguador Krebs modificado (139 mM NaCl, 12 mM KCl, 0,5 mM, 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. Posteriormente, se dejaron en una cámara de hipoxia, la cual era alimentada con nitrógeno a una presión y flujo constante durante 15 min, generando de esta manera un ambiente nitrogenado carente de oxígeno (N₂ al 100%). La cámara de hipoxia era puesta en un incubador a 37°C durante 8 h, tiempo durante el cual se simulaba el proceso de oclusión del flujo sanguíneo coronario. Para la realización de la reperusión *in vitro*, las células se incubaron en medio de cultivo DMEM F-12, y se colocaron en un incubador a 37°C con 5% CO₂ durante 16 h⁵⁵. Los controles de isquemia se incubaron en DMEM F-12, en un incubador a 37°C con 5% CO₂ durante el tiempo correspondiente a la isquemia. El control de reperusión se realizó mediante el recambio del medio de mantención durante el tiempo correspondiente a la reperusión.

Los FC se estimularon 24 h y 16 h antes del evento de I/Rs con 1 µg/mL de LPS, para evaluar el efecto protector provocado por un mecanismo de pre-condicionamiento. Con el fin de determinar el efecto protector ejercido durante la I/Rs, los FC se estimularon con 1 µg/mL de LPS durante la isquemia o reperfusión, o tanto en la isquemia y reperfusión de manera simultánea. Para evaluar la participación de TLR4, PI3K/Akt y Erk1/2, se utilizaron inhibidores del receptor y de ambas vías, TAK-242 (1µM), LY294002 (10 µM) y PD98059 (25 µM), respectivamente. Estos se agregaron en presencia de LPS según cada grupo experimental.

Los tiempos escogidos para la duración de la I/Rs, como se mencionó anteriormente, correspondieron a 8 y 16 h respectivamente. Una vez transcurridas las 24 h totales del evento de I/Rs, se realizaron los experimentos correspondientes para determinar la viabilidad celular y el procesamiento de las procaspasas.

5.5. Determinación de viabilidad celular

5.5.1. Conteo Celular

Los fibroblastos se sembraron en placas de 35 mm a una razón de $1,5 \times 10^5$ células/placa, cultivadas en medio DMEM-F12 + 10% (v/v) de FBS, que posteriormente fue reemplazado por DMEM-F12. Luego de los tratamientos respectivos para cada grupo experimental, las células se lavaron con PBS y se removieron de las placas utilizando tripsina-EDTA 1X la cual se inhibió mediante el empleo de FBS, en proporción 1:5. A continuación, se tomó una alícuota de 20 µL de la suspensión de células y se le adicionó 20 µL de solución de azul de tripán. La mezcla se homogeneizó con ayuda de la pipeta y de esta nueva suspensión se tomó 8 µL los que eran puestos en una cámara de Neubauer doble, contando no menos de 100 células vivas y en duplicado.

5.5.2. MTT

Los fibroblastos se sembraron en placas de 35 mm a una razón de $1,5 \times 10^5$ células/placa, cultivadas en medio DMEM-F12 + 10% (v/v) de FBS, que posteriormente fue reemplazado por DMEM-F12. Se preparó una solución stock de MTT 5 mg/mL, la cual fue filtrada a

través de un filtro de 0,2 μm para asegurar su esterilidad. La solución stock de MTT previamente preparada se agregó a cada placa de cultivo en una proporción 1:10 con respecto al volumen del medio DMEM-F12 y se incubó durante 2.5 h a 37°C y 5% CO_2 . Terminado el periodo de incubación, se removió el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS con el fin de remover completamente los restos de medio que pudieran interferir con la lectura de la absorbancia. Posteriormente se agregó a cada placa 100 μL de isopropanol que permitía solubilizar los cristales formados por la conversión mitocondrial del MTT. Los extractos con los cristales solubilizados se pusieron en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia de estos a una longitud de onda de 570 nm. Para el cálculo del número de células se realizó una curva de calibración con la solución stock de MTT 5 mg/mL. Para esto se sembraron FC en placas de 35 mm utilizando las siguientes concentraciones: 2×10^5 , $1,5 \times 10^5$, $1,2 \times 10^5$, 1×10^5 , 5×10^4 , 3×10^4 y 1×10^4 células/placa. Una vez medida la absorbancia para cada una de las placas, se creó una curva de calibración, la cual relacionaba la absorbancia con respecto al número de células vivas. De esta forma mediante el empleo de la curva de calibración fue posible obtener el número de células vivas en función de la absorbancia obtenida.

5.6. Western Blot

5.6.1 Preparación de extracto de proteínas totales.

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar los niveles de caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, β -tubulina y GAPDH en respuesta a la I/Rs. Los FC se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/placa. Una vez transcurridos los experimentos, las células se lavaron con PBS 1X frío y luego se lisaron con amortiguador 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% (p/v); deoxicolato 1%; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na_3VO_4 1mM). El homogeneizado obtenido se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante generado luego de la centrifugación se recuperó en un tubo Eppendorf y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Para ello se agregó 5 μL del extracto de proteínas en 200 μL de Bradford, leyendo a

continuación la absorbancia a 595 nm. Una vez cuantificadas, las proteínas obtenidas se denaturaron utilizando un amortiguador de carga 4X (glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 20% (v/v), SDS 5% (p/v), 125 mM Tris y 0,01% azul de bromofenol y pH 6,8) y calentando a 40° C durante 7 min. Finalmente el extracto se almacenó a -20° C hasta su utilización.

5.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados al 15% (p/v). Los geles se cargaron con 25 μ g de extracto proteico. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 90 V en amortiguador de electroforesis 1X (amortiguador de electroforesis 10X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g y agua csp 1000 mL), durante aproximadamente 90 min o hasta que se observó la correcta separación de las proteínas de interés.

5.6.3. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ M de poro durante 90 min a una corriente constante de 0,40 A en amortiguador de transferencia.

5.6.4 Reconocimiento por anticuerpos

Una vez transferidas las proteínas a las membranas de nitrocelulosa, estas últimas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% (p/v). Posteriormente se lavaron con TBS 1X/Tween-20 al 0,1% tres veces durante 5 min para luego ser incubadas con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y agitación suave. Los anticuerpos contra procaspasa/caspasa-3, procaspasa/caspasa-8 y procaspasa/caspasa-9 se prepararon en una dilución 1:1000 en TBS 1X/Tween-20 al 0,1% (v/v). Los anticuerpos contra β -tubulina y GAPDH se prepararon en una dilución 1:5000 en TBS 1X/Tween-20 al 0,1% (v/v). Una vez finalizado el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron con TBS 1X/Tween-20 al 0,1% (v/v) tres veces durante 5 min para luego ser incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el

anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa, en TBS 1X/Tween-20 al 0,1% (v/v).

Con el fin de detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL (enhanced chemiluminescence) y se expusieron a la película fotográfica Kodak-Biomax o AGFA. Para la cuantificación de las proteínas, las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con ayuda del software Image-J.

5.7. Análisis estadístico

Los resultados se obtuvieron mediante el promedio \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron por análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey, se consideró $p < 0,05$ como significativo.

6. Resultados

6.1. Evaluación del efecto del pre-condicionamiento con LPS (24 y 16 h) sobre la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs (8/16 h).

Para determinar el efecto ejercido por el pre-condicionamiento con LPS durante 24 y 16 h, se evaluó la sobrevivencia de FC posterior al evento de I/Rs por conteo celular y por el método del MTT. Los FC se mantuvieron 16 h en medio DMEM-F12 libre de suero, luego las células se estimularon con/sin 1 µg/mL de LPS 24 y 16 h antes de la realización de la I/Rs.

Los resultados de la Fig 1A-B muestran que la I/Rs produce una disminución significativa del número de células viables (53,7% y 52,5% para conteo celular y MTT respectivamente), con respecto al control (**p<0,001 vs control). El pre-condicionamiento con LPS por 16 o 24 h antes de la I/Rs no previno la pérdida de viabilidad inducida por I/Rs, alcanzando un valor del 62,5% y 60% en el pre-condicionamiento de 16 h, para conteo celular y MTT respectivamente; y 54,8% y 58,8% en el pre-condicionamiento de 24 h, para conteo celular y MTT respectivamente. A pesar de que en presencia de LPS se observó un aumento de alrededor de un 10% en el número de células viables con respecto a la I/Rs (62% aproximadamente para ambos ensayos), esta diferencia no resultó ser significativa para corroborar un eventual efecto cito-protector.

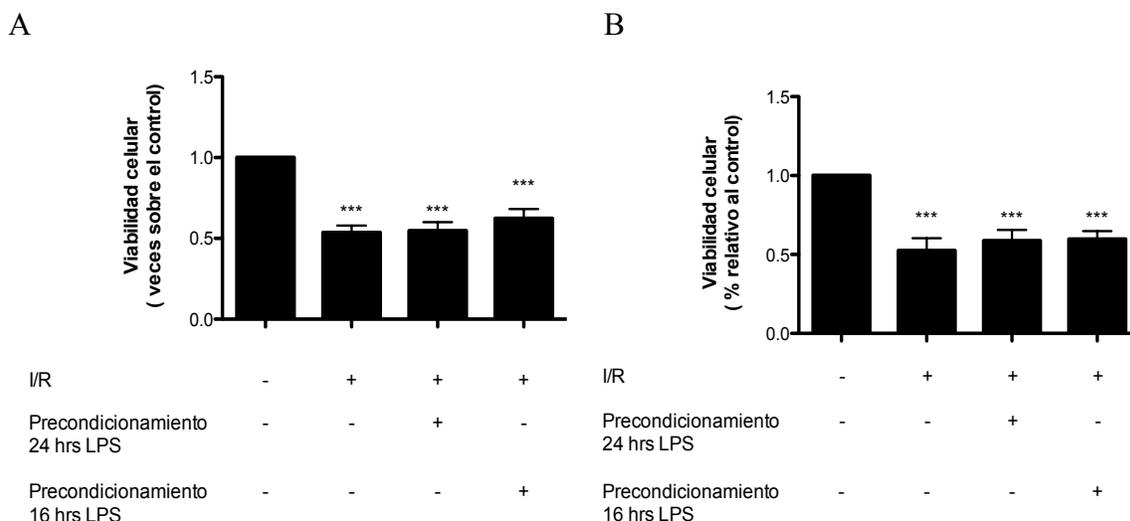


Figura 1. Efecto del pre-condicionamiento con LPS (24 y 16 h) sobre fibroblastos cardiacos sometidos a I/Rs. Los fibroblastos cardiacos se pre-trataron con 1 µg/mL de LPS durante 24 y 16 h antes de realizar la I/Rs. Luego de 8 h de ischemia y 16 h de reperfusion la viabilidad celular se determinó por conteo celular por exclusión de azul de tripán (A) n=12 o por MTT (B) n=8. Los resultados se expresan como promedio ± SD, ***p<0,001 vs control.

6.2. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la ischemia o reperfusion en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs

6.2.1. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la ischemia en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs

En las figuras 2A-B se observa las mediciones de viabilidad celular de FC sometidos a I/Rs en presencia/ausencia de LPS, realizadas por conteo celular (Fig 2A) y por el método del MTT (Fig 2B). Los resultados muestran que la I/Rs redujo el número de células viables a un 47% y un 56% para conteo celular (Fig 2A) y MTT (Fig 2B) respectivamente, respecto al control (***p<0,001 vs control). En las células tratadas con LPS solamente durante la ischemia la viabilidad celular fue de un 50% y un 65% para conteo celular (Fig 2A) y MTT (Fig 2B) respectivamente, respecto al control. Se descartó un eventual efecto citoprotector mediado por LPS en estas condiciones experimentales.

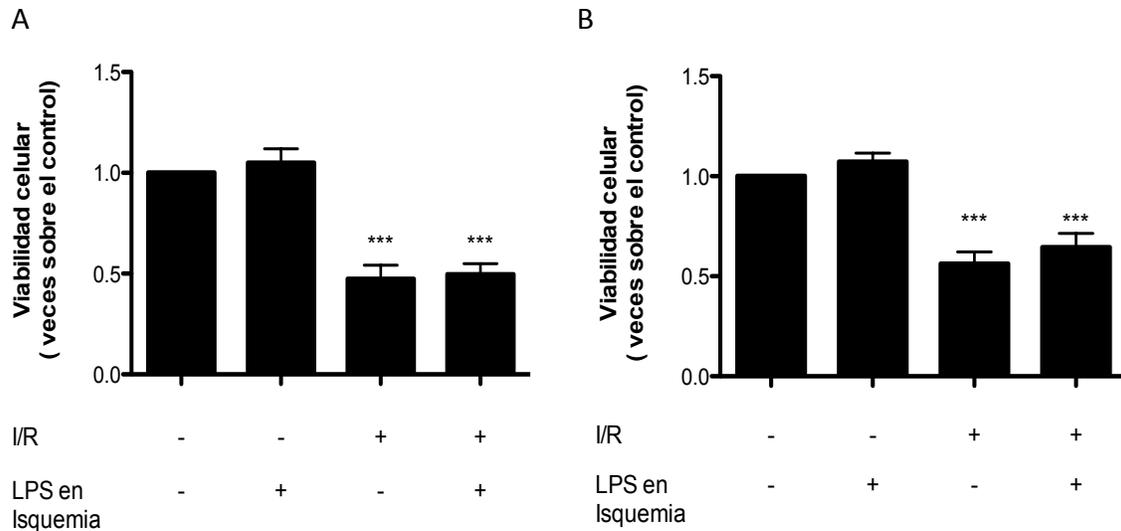


Figura 2. Efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la isquemia en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs. Los fibroblastos cardiacos se trataron con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS durante las 8 h de isquemia. Luego de 8 h de isquemia y 16 h de reperfusión la viabilidad celular se determinó por conteo celular por exclusión de azul de tripán (A) $n=7$; o por MTT (B) $n=9$. Los resultados se expresan como promedio \pm SD, *** $p<0,001$ vs control.

6.2.2. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la reperfusión en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs

Como se observa en la figura 3, la I/Rs produjo una disminución significativa del número de células viables, la que alcanzó un valor del 47% y un 52% respecto al control para conteo celular (Fig 3A) y MTT (Fig 3B) (** $p<0,001$ vs control) respectivamente. En las células tratadas con LPS solamente durante la reperfusión, la viabilidad celular alcanzó un valor del 50% y 61% para conteo celular (Fig 3A) y MTT (Fig 3B) respectivamente, respecto al control (** $p<0,001$ vs control). Se descartó un eventual efecto cito-protector mediado por el tratamiento de FC con LPS durante la reperfusión.

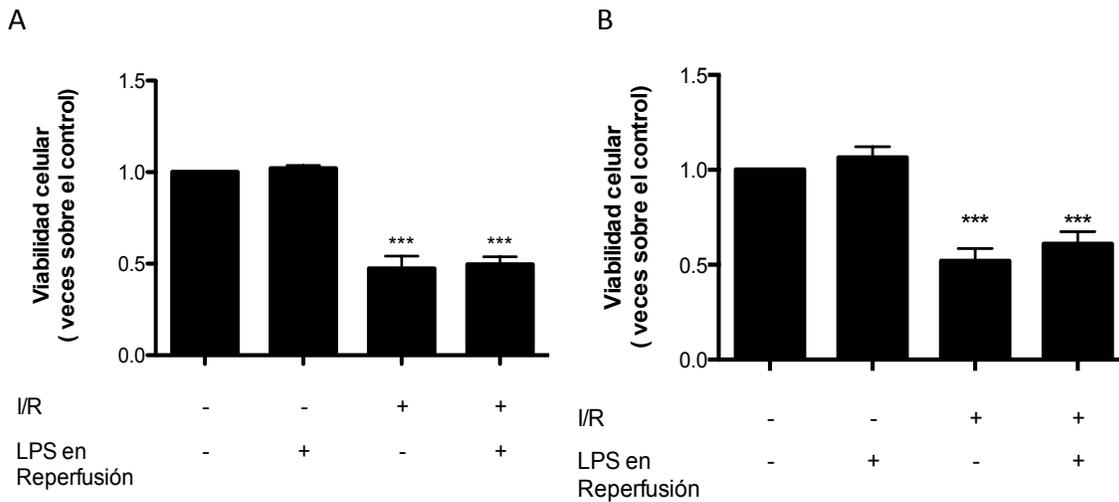


Figura 3. Efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la reperusión en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs. Los fibroblastos cardiacos se trataron con 1 µg/mL de LPS durante las 16 h de reperusión. Luego de 8 h de ischemia y 16 h de reperusión la viabilidad celular se determinó por conteo celular por exclusión de azul de tripán (A) n=6; y por MTT (B) n=7. Los resultados se expresan como promedio ± SD, ***p<0,001 vs control.

6.3. Evaluación del efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la ischemia y reperusión en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs

Como se observa en la figura 4, en FC sometidos a I/Rs, la viabilidad celular analizada por conteo celular fue cercana al 48% frente al control (Fig 4A), mientras que por el método de MTT (Fig 4B), esta fue de un 53% respecto del control. En ambos casos se mantuvo una disminución estadísticamente significativa en el número de células (***p<0,001 vs control). Sin embargo, en las células tratadas con LPS durante la ischemia y reperusión, el número de células viables aumentó hasta un 63% respecto al control por conteo celular (Fig 4A), mientras que por MTT esta fue de un 71% respecto del control. Al comparar ambos valores de viabilidad celular respecto a la I/R, se observó que el tratamiento con LPS de manera simultánea durante todo el evento de I/Rs generó un aumento estadísticamente significativo en el número de células viables, (#p<0,05 vs I/R) en la medición por conteo celular (Fig 4A) y (###p<0,001 vs I/R) en MTT (Fig 4B). Estos

resultados dan cuenta del efecto cito-protector ejercido por el tratamiento con LPS durante la I/Rs sobre la muerte de FC inducida por el evento de I/Rs.

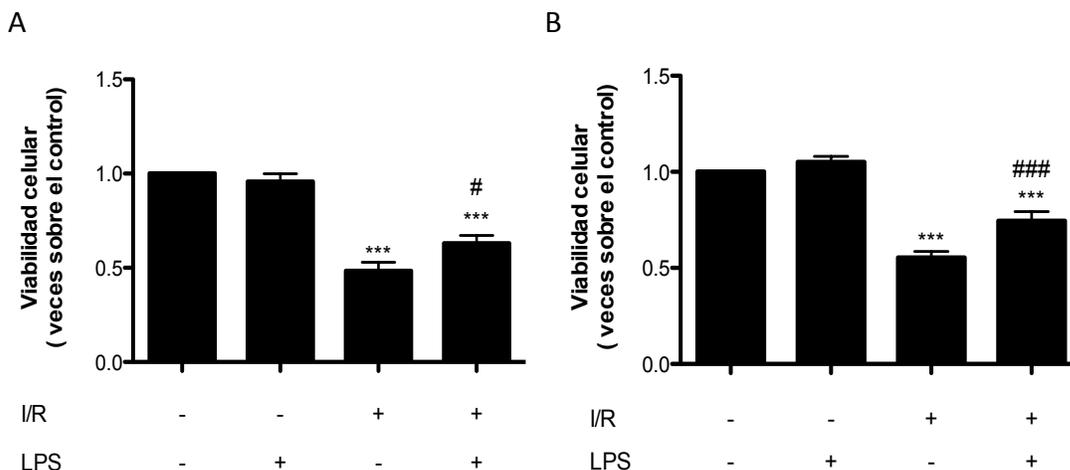


Figura 4. Efecto ejercido por el tratamiento con LPS durante la isquemia y reperusión en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs. Los fibroblastos cardiacos se trataron con 1 µg/mL de LPS durante las 8 h de isquemia y las 16 h de reperusión. Luego de 8 h de isquemia y 16 h de reperusión la viabilidad celular se determinó por conteo celular por exclusión de azul de tripan (A) n=12; y por MTT (B) n=14. Los resultados se expresan como promedio ± SD, ***p<0,001 vs control; #p<0,05 versus I/R; ###p<0,001 vs I/R.

6.4. Participación del receptor de tipo toll 4 en la protección de fibroblastos cardiacos inducida por LPS

Como pudimos observar en la figura 4A-B el tratamiento con LPS fue capaz de prevenir la pérdida de viabilidad gatillada por la I/Rs. Sin embargo, se desconoce si este efecto protector es mediado por el receptor TLR4. Con este fin se utilizó TAK-242, un inhibidor intracelular de este receptor.

Como se observa en la figura 5, los FC sometidos a I/Rs presentaron un 53% de viabilidad respecto al control, mientras que en presencia de TAK-242 el valor obtenido fue de un 51% respecto al control. Ambos resultados obtenidos resultaron ser estadísticamente significativos (**p<0,001 vs control). El tratamiento con LPS durante la I/Rs disminuyó significativamente la pérdida de viabilidad provocada por la I/Rs (#p<0,05 vs I/R), alcanzando un valor del 69% frente al control. Sin embargo, al tratar los FC con LPS en presencia de TAK-242, el efecto protector inducido por LPS se inhibió. Se produjo de esta

forma un número de células viables similar al obtenido en la I/R (50% vs 53%, respectivamente), obteniéndose una diferencia significativa respecto a los FC tratados solamente con LPS ($\$p < 0,05$ vs I/R LPS y TAK-242). Estos resultados sugieren que la protección inducida por LPS es mediada a través del TLR4.

El tratamiento de FC sometidos a I/Rs en presencia de TAK-242, no generó una disminución en el número de células viables con respecto a las células sujetas a I/Rs (51% vs 53% de células viables, respectivamente). Además, es importante destacar que TAK-242 no ejerció un efecto tóxico sobre los FC, manteniéndose prácticamente sin variaciones en el número de células control expuestas a TAK-242. Este resultado descarta que la disminución de la viabilidad celular obtenida en los FC tratados con LPS en presencia de TAK-242 o en la I/Rs con TAK-242 se pueda deber a un efecto tóxico generado por el inhibidor.

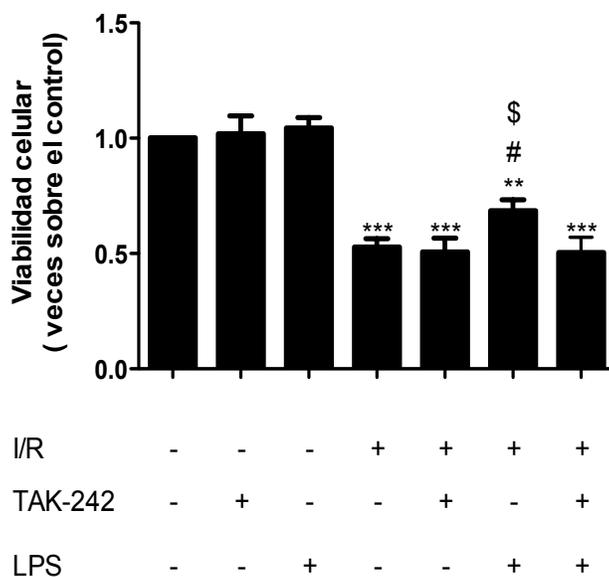


Figura 5. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de TAK-242 durante la isquemia y reperfusión, sobre la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs. Fibroblastos cardiacos se trataron con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS y 4 μM de TAK-242 durante las 8 h de isquemia y las 16 h de reperfusión. Luego de transcurridos los tiempos experimentales, la viabilidad celular se determinó por MTT. Los resultados se expresan como promedio \pm SD, *** $p < 0,001$ vs control; # $p < 0,05$ vs I/R; \$ $p < 0,05$ vs I/R en presencia de LPS y TAK-242. n=12.

6.5. Participación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en la protección de fibroblastos cardiacos ejercida por LPS

A continuación, se evaluaron las posibles vías de señalización implicadas en el efecto cito-protector mediado por LPS. Para evaluar el rol que cumple la vía de PI3K/Akt se utilizó un inhibidor químico de PI3K, LY294002. Con el fin de evaluar el rol que cumple la vía de ERK1/2 (p44/p42 MAPK) se empleó un inhibidor químico de MEK1/2, PD98059.

Los FC se cultivaron por 16 h en medio DMEM-F12 libre de suero, y posteriormente se estimularon con 1 µg/mL de LPS durante la isquemia y reperfusión en presencia/ausencia de LY294002 (10 µM) o PD98059 (25 µM).

6.5.1 Efecto de la inhibición de PI3K/Akt sobre la capacidad cito-protectora ejercida por LPS en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs

Como se observa en la figura 6, la viabilidad celular fue de un 52% para las células sometidas a I/Rs (**p<0,001 vs control) versus un 67% en las células tratadas con LPS (**p<0,01 vs control), alcanzándose una diferencia significativa entre ambos grupos experimentales (##p<0,01 vs I/R). La aplicación de LY294002 en presencia de LPS fue capaz de revertir completamente el efecto cito-protector otorgado por LPS, obteniéndose un número de células viables de un 47%, similar al obtenido en la I/Rs, alcanzándose una diferencia estadísticamente significativa entre estos valores (\$p<0,05 vs I/R con LPS y LY294002). Este resultado sugiere la participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la protección de los FC ejercida por LPS a través de TLR4.

El tratamiento de FC sometidos a I/Rs en presencia de LY294002, no generó una disminución en el número de células viables con respecto a las células sujetas a I/Rs (51% vs 52% de células viables, respectivamente). Además, no se observaron variaciones en el número de células presente en los controles con LY294002 o LPS al compararse con el control sin tratamiento. Este resultado permite descartar que la disminución en el número de células observada en el grupo experimental de I/Rs tratado con LPS en presencia de LY294002 o en la I/Rs con LY294002, se pueda deber a un efecto cito-tóxico generado por el uso de este inhibidor.

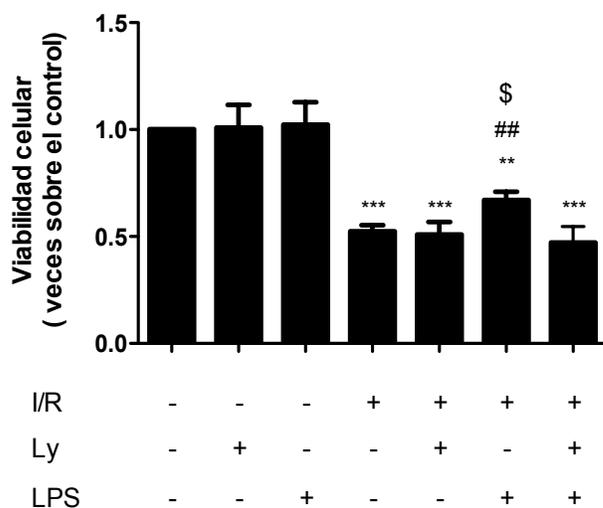


Figura 6. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de LY294002 durante la isquemia y reperfusión, sobre la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs. Fibroblastos cardiacos se trataron con 1 µg/mL de LPS y 10 µM de LY294002 durante las 8 h de isquemia y las 16 h de reperfusión. Luego de transcurridos los tiempos experimentales, la viabilidad celular se determinó por MTT. Los resultados se expresan como promedio ± SD, n=10, ***p<0,001 vs control; **p<0,01 vs control; ##p<0,01 vs I/R; \$p<0,05 vs I/R en presencia de LPS y LY294002.

6.5.2. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre la capacidad cito-protectora ejercida por LPS en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs

Como se observa en la figura 7, los FC sujetos a I/Rs en presencia de LPS alcanzaron un valor de viabilidad celular del 66% (**p<0,01 vs control), mientras que en ausencia de LPS este valor disminuyó al 48% (***p<0,001 vs control), ambos respecto del control. La diferencia obtenida al comparar estos valores resultó ser estadísticamente significativa (#p<0,05 vs control). La estimulación de FC sujetos a I/Rs con LPS y PD98059, trajo como consecuencia la pérdida del efecto cito-protector producido por LPS, obteniéndose un número de células viables similar al obtenido en la I/Rs (49%, respectivamente respecto del control), alcanzándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos experimentales (\$p<0,05 vs I/R con LPS y PD98059). Este resultado sugiere la participación de Akt en el efecto cito-protector mediado por LPS a través de TLR4.

No se observaron variaciones en el número de células presente en los controles con PD98059 o LPS al compararse con el control sin tratamiento. Este resultado permite descartar que la disminución en el número de células observada en el grupo experimental de I/Rs con LPS en presencia de PD98059, se pueda deber a un efecto cito-tóxico generado por el uso de este inhibidor.

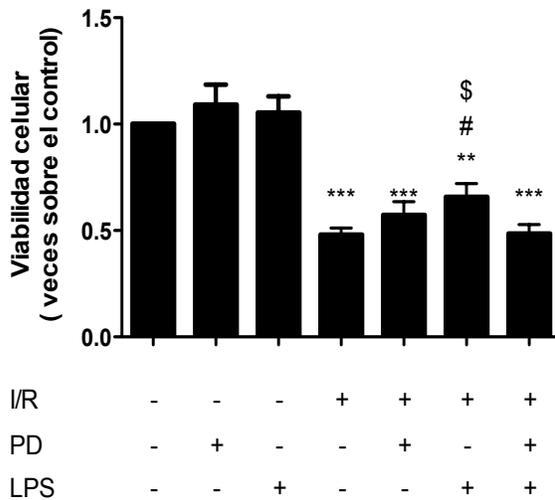


Figura 7. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de PD98059 durante la isquemia y reperfusion, sobre la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs. Fibroblastos cardiacos se trataron con 1 µg/mL de LPS y 25 µM de PD98059 durante las 8 h de isquemia y las 16 h de reperfusion. Luego de transcurridos los tiempos experimentales, la viabilidad celular se determinó por MTT. Los resultados se expresan como promedio ± SD, n=5, ***p<0,001 vs control; **p<0,01 vs control; #p<0,05 vs I/R; \$p<0,05 vs I/R en presencia de LPS y PD98059.

6.6. Evaluación de la apoptosis en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs

Como se determinó previamente, el tratamiento con LPS durante la isquemia y reperfusion, a través de TLR4, previene la muerte de fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs. Sin embargo, se desconoce el rol de este receptor en cuanto a la participación en la muerte de los FC por apoptosis. Para estudiar este objetivo, se determinó la fragmentación de las procaspasas 8 y 3 por medio de Western blot.

6.6.1. Participación de la caspasa 8 en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs

6.6.1.1. Efecto del tratamiento con LPS sobre el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs

En la figura 8 se observa que la I/Rs provocó la fragmentación de la procaspasa 8, disminuyendo sus niveles proteicos al 44% respecto del control. La disminución obtenida en los niveles de esta proteína resultó ser estadísticamente significativa (***p<0,001 vs control), lo que indica que la I/Rs, por si sola, es capaz de generar la activación de la caspasa 8. El tratamiento con LPS durante la I/Rs, provocó una menor fragmentación de la procaspasa 8, alcanzando un valor del 77% respecto del control (*p<0,05 vs control). Al comparar los valores obtenidos en la I/Rs más LPS versus I/R (77% vs 44%, respecto del control), se obtiene una diferencia estadísticamente significativa (###p<0,001 vs I/R),

indicando que el tratamiento de las células con LPS durante la I/Rs previene la fragmentación de la procaspasa 8.

Como se observa en la figura 8, no se obtuvieron variaciones en cuanto al procesamiento de la procaspasa 8 en el control estimulado con LPS. Este resultado sugiere que LPS, sin la presencia de un estímulo deletéreo, no afecta la activación de la caspasa 8.

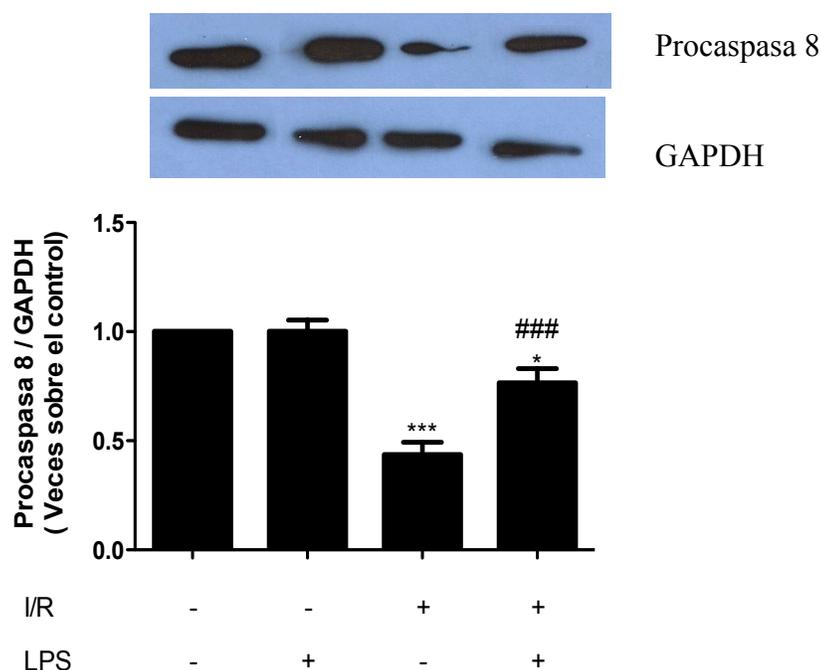


Figura 8. Efecto del LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8 en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs. Las células se trataron con 1 µg/mL de LPS durante las 8 h de ischemia y las 16 h de reperfusion. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 8 por Western blot. GAPDH se usó como control de carga. n=12, *** p<0,001 vs control; * p<0,05 vs control; ### p<0,001 vs I/R.

6.6.1.2. Participación del TLR4 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 inducido por I/Rs

En la figura 9 se observa que la I/Rs es capaz de inducir la fragmentación de la procaspasa 8, alcanzando un valor del 53% respecto del control (**p<0,001 vs control). El tratamiento con LPS previno la fragmentación de esta proteína, alcanzando un valor del 76% frente al control (*p<0,05 vs control). Sin embargo, el tratamiento de las células con LPS en presencia de TAK-242, reveló que el efecto provocado por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8 se perdía completamente, obteniendo un valor del 45%

respecto del control (**p<0,001 vs control). Confrontando el valor obtenido en las células tratadas con LPS frente a las células tratadas con LPS en presencia de TAK-242 (76% vs 45%, respectivamente), se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos valores (\$p<0,05 vs I/R con LPS y TAK-242). Este resultado sugiere la participación del TLR4 en el efecto ejercido por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8.

La aplicación de TAK-242 por si solo sobre las células sometidas a I/Rs, no generó la fragmentación adicional de la proteína, obteniendo un valor del 57% (**p<0,001 vs control). Este resultado sugiere que la inhibición del TLR4 durante la I/Rs no genera un aumento en la activación de la caspasa 8 frente al efecto ejercido por el evento de I/Rs. En las células control tratadas con LPS o TAK-242 no se observaron variaciones en cuanto al procesamiento de la procaspasa 8.

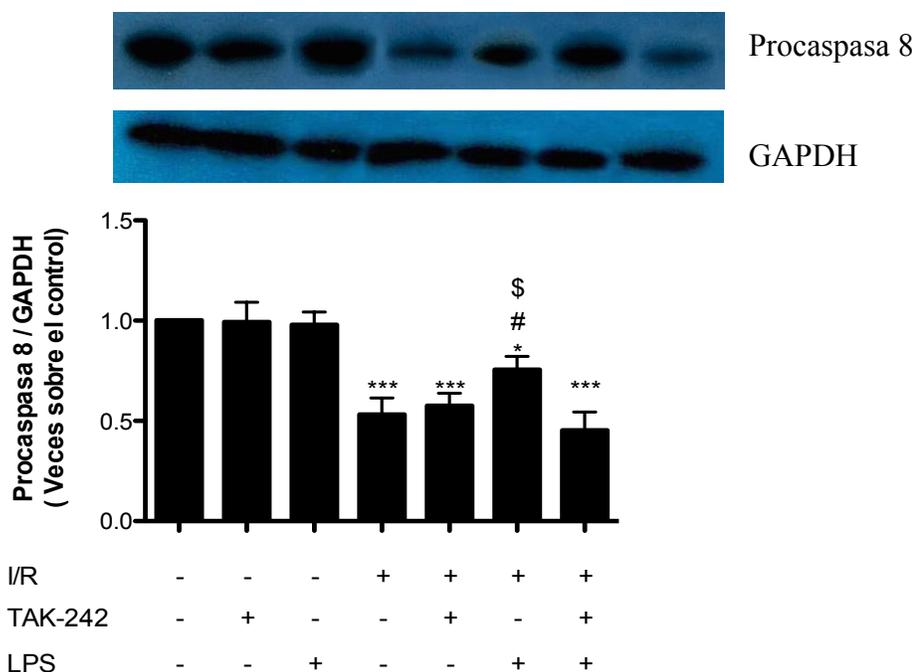


Figura 9. Participación del TLR4 en el efecto ejercido por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8 en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs. Las células se trataron con LPS (1 µg/mL) en presencia de TAK-242 (1µM) durante las 8 h de isquemia y las 16 h de reperusión. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 8 mediante Western blot. GAPDH se usó como control de carga. n=8, *** p<0,001 vs control; * p<0,05 vs control; # p<0,05 vs I/R; \$ p<0,05 vs I/R con LPS y TAK-242.

6.6.1.3. Participación de la vía de señalización PI3K/Akt en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 inducido por I/Rs

En la figura 10 se observa que la I/Rs fue capaz de gatillar de manera significativa el procesamiento de la procaspasa 8, disminuyendo al 42% respecto del control ($***p<0,001$ vs control). El tratamiento de las células con LPS previno la proteólisis, alcanzando un valor del 78% respecto del control. La diferencia obtenida entre ambos valores resultó ser estadísticamente significativa ($\#p<0,05$ vs I/R). Ly294002 previno completamente el efecto provocado por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8, alcanzando la proteína un valor del 30% respecto del control ($***p<0,001$ vs control). Al contrastar el resultado obtenido mediante el tratamiento de las células con LPS en presencia de Ly294002 versus las células tratadas con LPS (30% vs 78%, respectivamente), se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($$$p<0,01$ vs I/R con LPS y Ly294002). Este resultado sugiere que la vía de señalización PI3K/Akt se encuentra implicada en el efecto ejercido por LPS sobre la fragmentación de la procaspasa 8.

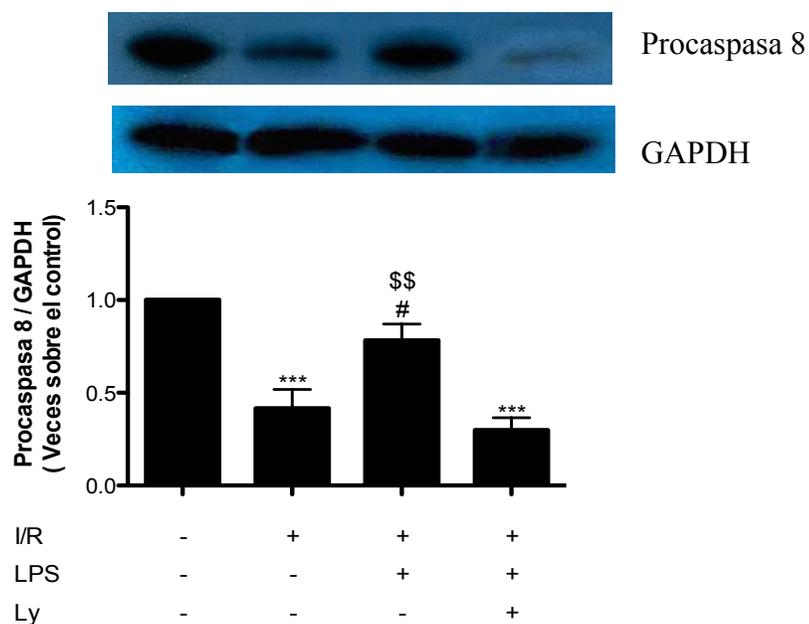


Figura 10. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de LY294002 sobre el procesamiento de la procaspasa 8. Fibroblastos cardiacos se trataron con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y LY294002 (10 μM) durante las 8 h de isquemia y las 16 h de reperfusion. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 8 mediante Western blot. GAPDH se usó como control de carga. $n=5$. Los resultados se expresan como promedio \pm SD, $***p<0,001$ vs control; $\#p<0,05$ vs I/R; $$$p<0,01$ vs I/R en presencia de LPS y LY294002.

6.6.1.4. Participación de la vía de señalización ERK1/2 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 inducido por I/Rs

Como se muestra en la figura 11, la I/Rs provocó la proteólisis de la procaspasa 8, alcanzando un valor del 47% respecto del control. A su vez, el tratamiento de las células con LPS gatilló una disminución del procesamiento de la procaspasa 8, manteniendo los niveles de la proteína en un 78% respecto del control. Sin embargo, en las células tratadas con PD98059 y LPS no se observó el efecto generado por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8, disminuyendo los niveles de la proteína al 32% respecto del control. Contrastando los valores obtenidos en las células tratadas con LPS versus las células tratadas con LPS y PD98059 (78% vs 32%, respectivamente), se observa una clara tendencia la cual indicaría la participación de la vía de señalización de ERK1/2 en el efecto ejercido por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 8.

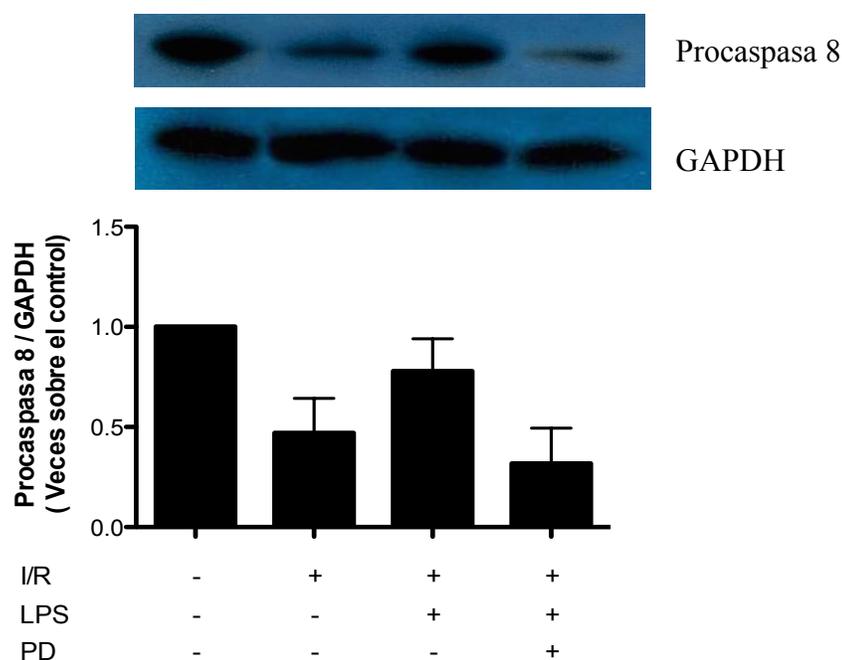


Figura 11. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de PD98059 sobre el procesamiento de la procaspasa 8. Fibroblastos cardiacos se trataron con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y PD98059 (25 μM) durante las 8 h de ischemia y las 16 h de reperfusion. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 8 mediante Western blot. GAPDH se usó como control de carga. $n=3$. Los resultados se expresan como promedio \pm SD.

6.6.2. Participación de la caspasa 3 en la muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs

6.6.2.1 Efecto del tratamiento con LPS sobre el procesamiento proteolítico de la procaspasa 3 en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs

Como se observa en la figura 12, la I/Rs ocasionó el procesamiento de la procaspasa 3, disminuyendo los niveles de la proteína a un 54% respecto del control. La disminución obtenida resultó ser estadísticamente significativa ($***p<0,001$ vs control). Esto indica que la I/Rs, por si sola, es capaz de activar la caspasa 3. El tratamiento de las células con LPS durante la I/Rs produjo una disminución en el procesamiento de la procaspasa 3, manteniéndose en un 84% respecto del control. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($##p<0,01$ vs I/R), lo cual indica que LPS es capaz de prevenir el procesamiento de la procaspasa 3.

Como se observa en la figura 12, no se obtuvieron variaciones en cuanto al procesamiento de la procaspasa 3 en el control estimulado con LPS, lo cual indica que LPS, sin la presencia de un estímulo deletéreo, no afecta la activación de esta proteína apoptótica.

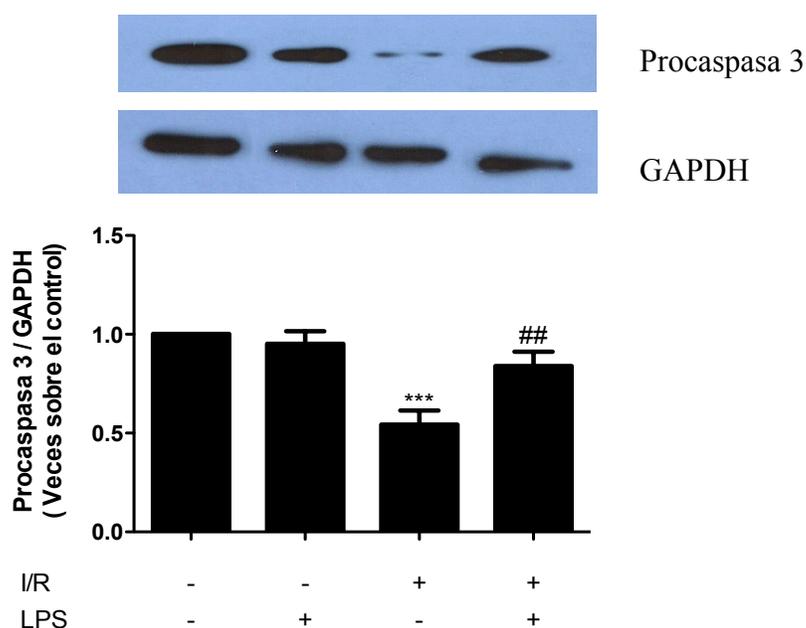


Figura 12. Efecto del LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3 en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs. Las células se trataron con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS durante las 8 h de ischemia y las 16 h de reperfusion. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 8 por Western blot. GAPDH se usó como control de carga. $n=11$, $*** p<0,001$ vs control; $## p<0,01$ vs I/R.

6.6.2.2 Participación del TLR4 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 3 inducido por I/Rs

Como se indica en la figura 13, la I/Rs induce el procesamiento de la procaspasa 3, disminuyendo los niveles de la proteína a un 67% con respecto al control (* $p < 0,05$ vs control). El tratamiento de las células con LPS generó una disminución del procesamiento de la proteína, alcanzando un valor del 86% frente al control, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa entre estos grupos experimentales (# $p < 0,05$ vs I/R). Sin embargo, el tratamiento de las células con TAK-242, bloqueó el efecto generado por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3, disminuyendo el nivel de la proteína a un 58% respecto del control, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa (** $p < 0,01$ vs control). Contrastando los valores correspondientes a la I/Rs más LPS versus I/Rs más LPS y TAK-242, (86% vs 58%, respectivamente), se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos (\$ $p < 0,05$ vs I/R con LPS y TAK-242). Esto sugiere la participación del TLR4 en el efecto ejercido por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3.

La aplicación de TAK-242 sobre las células sometidas a I/Rs no generó un aumento adicional del procesamiento de la procaspasa 3, alcanzando un valor similar a I/Rs (52% respecto del control, *** $p < 0,001$ vs control). En las células control tratadas con LPS o TAK-242 no se observaron variaciones en cuanto al procesamiento de la procaspasa 3.

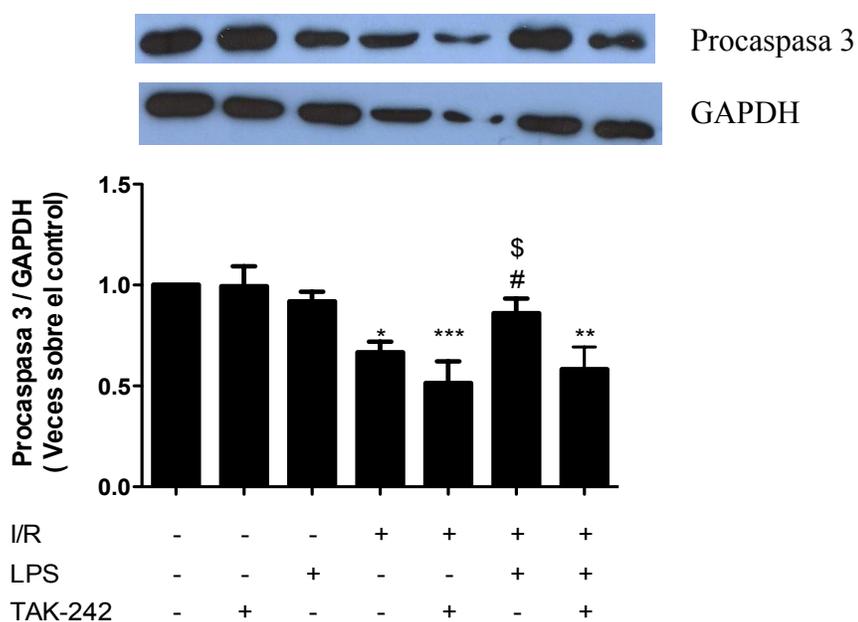


Figura 13. Participación del TLR4 en el efecto ejercido por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3 en fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs. Las células se trataron con LPS (1 µg/mL) en presencia de TAK-242 (1 µM) durante las 8 h de ischemia y las 16 h de reperfusión. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 3 mediante Western blot. GAPDH se usó como control de carga. n=7, *** p<0,001 vs control; ** p<0,01 vs control; *p<0,05 vs control; # p<0,05 vs I/R; \$ p<0,05 vs I/R con LPS y TAK-242.

6.6.2.3. Participación de la vía de señalización PI3K/Akt en el procesamiento de la procaspasa 3 inducido por I/Rs

Como se observa en la figura 14, la I/Rs gatilló de manera significativa el procesamiento de la procaspasa 3, disminuyendo está al 56% respecto del control (***p<0,001 vs control). El tratamiento de las células con LPS previno la proteólisis, alcanzando la procaspasa 3 un valor del 83% respecto del control. La diferencia obtenida entre ambos valores resultó ser estadísticamente significativa (#p<0,05 vs I/R). En las células tratadas con LPS en presencia de Ly294002, la proteína alcanzó un valor del 87% respecto del control, manteniéndose el efecto ejercido por LPS sobre la activación de la caspasa 3 (#p<0,05 vs I/R). Lo anterior sugiere que la vía PI3K/Akt no participa en la mediación del efecto generado por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3 inducido por I/Rs.

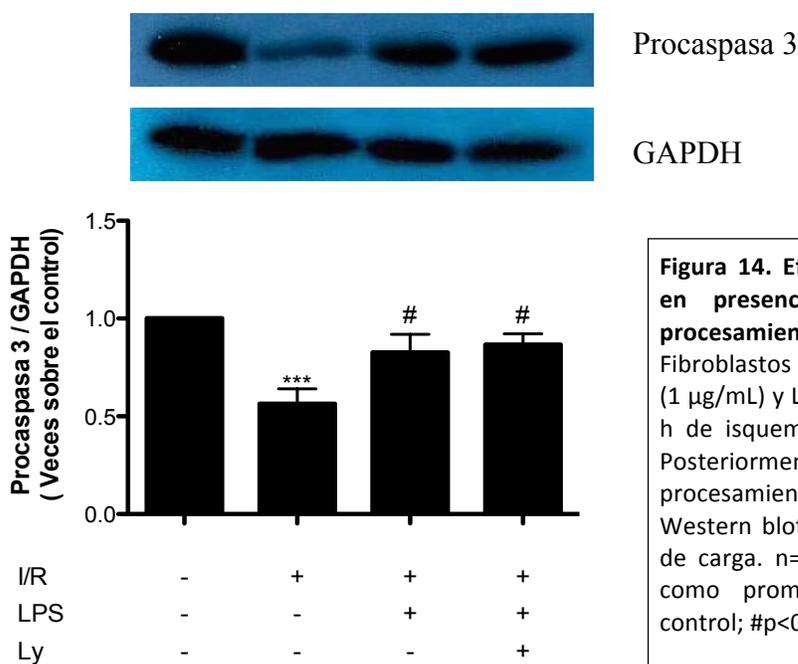


Figura 14. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de LY294002 sobre el procesamiento de la procaspasa 3. Fibroblastos cardiacos se trataron con LPS (1 µg/mL) y LY294002 (10 µM) durante las 8 h de ischemia y las 16 h de reperfusión. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 8 mediante Western blot. GAPDH se usó como control de carga. n=6. Los resultados se expresan como promedio ± SD, ***p<0,001 vs control; #p<0,05 vs I/R.

6.6.2.4. Participación de la vía de señalización de ERK1/2 en el procesamiento proteolítico de la procaspasa 3 inducido por I/Rs

Como se muestra en la figura 15, la I/Rs indujo el procesamiento de la procaspasa 3, disminuyendo la proteína a un 50% respecto del control. El tratamiento de las células con LPS durante la I/Rs gatilló una disminución en la activación de la casapasa 3, aumentando su forma inactiva, la que alcanzó un 71% respecto del control. De acuerdo a la tendencia que se observa en la figura 15, el tratamiento con PD98059 no fue capaz de bloquear el efecto gatillado por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3, manteniéndose la proteína en un 84% respecto del control. Esto sugiere que la vía de ERK1/2 no participa en la mediación del efecto generado por LPS sobre el procesamiento de la procaspasa 3 inducido por I/Rs.

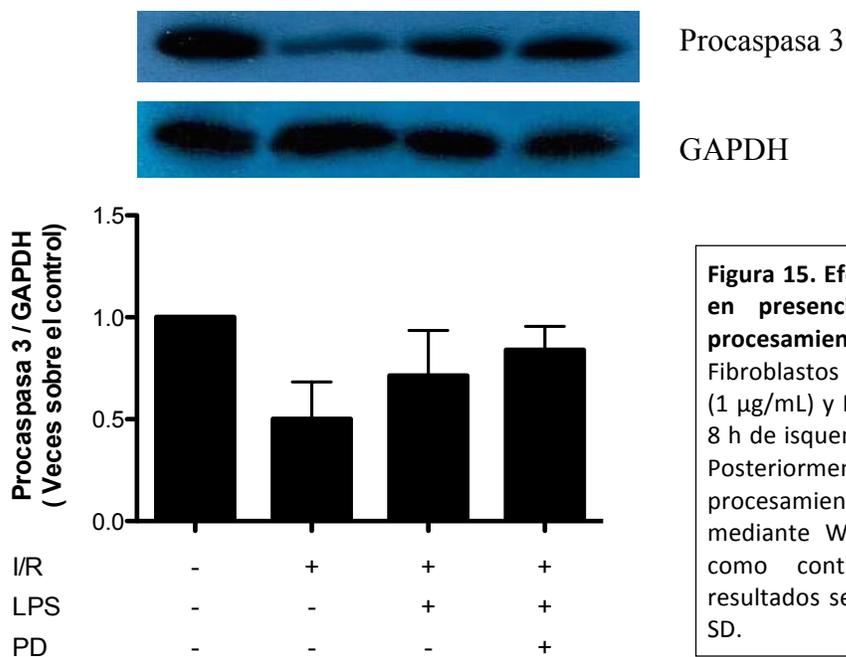


Figura 15. Efecto del tratamiento con LPS en presencia de PD98059 sobre el procesamiento de la procaspasa 3. Fibroblastos cardiacos se trataron con LPS (1 µg/mL) y PD98059 (25 µM) durante las 8 h de ischemia y las 16 h de reperfusion. Posteriormente se determinó el procesamiento de la procaspasa 8 mediante Western blot. GAPDH se usó como control de carga. n=3. Los resultados se expresan como promedio ± SD.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó el efecto cito-protector ejercido por LPS sobre FC sujetos a I/Rs. Nuestros principales resultados fueron: (1) FC sometidos a 8 h de isquemia y 16 h de reperfusión experimentan una pérdida significativa de la viabilidad; (2) el precondicionamiento de 16 y 24 h con LPS, así como, el tratamiento con LPS durante la isquemia o la reperfusión no previenen la muerte de los FC inducida por I/Rs; (3) el tratamiento con LPS durante la isquemia y reperfusión previene la muerte de FC inducida por I/Rs; (4) el efecto cito-protector producido por LPS es mediado por TLR4; (5) LPS a través de las vías de señalización PI3k/Akt y Erk1/2 ejerce el efecto cito-protector; (6) LPS, a través de TLR4, previene el procesamiento de la procaspasa 3 y 8 inducido por I/Rs.

7.1. Muerte de fibroblastos cardiacos inducida por I/Rs

Se han reportado diversos estudios que señalan que tanto la oclusión de arterias coronarias por periodos prolongados de tiempo, así como también, el cultivo de cardiomiocitos *in vitro* en medios de cultivo con ausencia de O₂, provocan alteraciones metabólicas y funcionales que culminan con la muerte de las células cardiacas. En relación a ello, se ha descrito la pérdida de viabilidad de las células cardiacas frente a la ocurrencia de un infarto cardiaco, siendo los efectos sobre los cardiomiocitos los más estudiados⁵⁶,⁵⁷. Sin embargo, poco se ha descrito del efecto sobre otras células no musculares, tales como FC, frente a eventos de cambios en los niveles de oxígeno como lo es la I/R⁵⁸. Más aun, la importancia del rol que juegan los FC en las respuestas adaptativas del miocardio frente a las condiciones isquémicas y al posterior daño por reperfusión no ha sido del todo estudiada en profundidad.

Nuestro trabajo utilizó un modelo de I/R *in vitro*, cuyo uso ha sido descrito en otros estudios^{17,18}. Si bien es cierto, los modelos *in vivo* son los más representativos y cercanos a lo que acontece durante la ocurrencia de un infarto cardiaco, la gran complejidad de interacciones e interconexiones que ocurren entre las distintas células del corazón sometido a un infarto, dificultan el estudio detallado de los eventos y mecanismos

moleculares que ocurren a un tipo celular determinado. Esto dificulta atribuir los resultados observados a un solo factor en cuestión. En este sentido, los modelos *in vitro* presentan importantes ventajas, ya que permiten simular las condiciones de infarto en un ambiente controlado y aislado de otras variables. Dentro de estas variables están la contribución de otras células presentes en la sangre y tejido cardiaco, la presencia de diversos estímulos que se encuentran de manera basal en el tejido y que son secretados por otros tipos celulares, etc. Debido a esto, se eligió trabajar con un modelo de I/R *in vitro* lo cual permitiría delimitar los efectos observados en FC sólo al efecto propio del estímulo en estudio. Sin embargo, la principal limitación de los modelos *in vitro* es que no son capaces de reproducir por completo los eventos fisiopatológicos observados en el corazón infartado, y que por ende, los resultados obtenidos pueden diferir entre un modelo y otro.

Nuestros resultados indican que cultivos de FC sometidos a 8 h de isquemia y 16 h de reperfusión experimentaron una muerte celular significativa, quedando alrededor de un 53% de células viables luego del evento deletéreo. Esta magnitud de muerte celular de FC inducida por I/Rs ya ha sido descrita previamente por nuestro laboratorio ^{31, 32}. En la literatura se encuentran muchos antecedentes acerca del daño gatillado por I/Rs en otros tipos celulares, fundamentalmente cardiomiocitos. Con respecto a esto, es posible extrapolar nuestros resultados a los obtenidos por Bhawanjit K. Brar (2000), el cual describe que cultivos de cardiomiocitos neonatos sujetos a 6 h de isquemia *in vitro* y 2 h de reoxigenación experimentaron un 57% de muerte celular ¹⁷, y con 6/24 h de I/Rs respectivamente, se obtuvo un 83% de muerte celular ⁵⁹. Por otro lado, Shen Min et al. (2012), describen que cardiomiocitos de ratas neonatas sujetos a 2/4 h de isquemia/reperfusión *in vitro* respectivamente, experimentan un 35% de viabilidad ⁶⁰. De acuerdo a estos antecedentes, nuestros resultados muestran que los FC sometidos a tiempos similares de I/R tienen un nivel de mortalidad menor que los cardiomiocitos. De esta manera, los tiempos a los cuales se observa una pérdida de viabilidad significativa en FC sujetos a I/R (8/16 h), son mucho mayores que los observados en la literatura con respecto a cardiomiocitos *in vitro* (6/2, 6/24 y 2/4 h de I/R respectivamente) e *in vivo* (40-

60 min) ⁶¹. Estos antecedentes se correlacionan con reportes que describen que frente a condiciones de hipoxia, los cardiomiocitos son extremadamente sensibles, y que se gatillan mecanismos tempranos de muerte, mientras que los FC son capaces de adaptarse e incluso proliferar frente a eventos deletéreos, como lo es la I/R ^{58, 62}. Independiente del tipo celular, es importante aclarar que los modelos *in vivo* de infarto cardiaco 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 células del sistema inmune, los que influyen directamente en el daño ocasionado por I/R. Además de los elementos ya mencionados, las diferencias observadas pueden deberse a otros factores, tales como las condiciones utilizadas para simular la I/Rs, la duración del evento de I/Rs 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 las células. Antecedentes descritos por Vivar et al. (2012), señalan que los FC deben ser sometidos a tiempos mayores a 12 h de isquemia, o 8 h de isquemia acompañada por 16 a 48 h de reperfusión para lograr una pérdida de viabilidad significativa ³². En la literatura se ha descrito que el daño inducido por reperfusión genera eventos deletéreos adicionales a los gatillados por la isquemia, aumentando el daño celular generado durante la isquemia ⁶³. Sin embargo, otros estudios señalan que la muerte inducida por reperfusión es solo el enmascaramiento de aquel daño irreversible producido durante el periodo isquémico ⁶⁴. Tomando en consideración estos antecedentes, no sería posible descartar la posibilidad de que la pérdida de viabilidad de FC observada en la I/Rs sea producto de la continuación del daño que se generó previamente en la isquemia, en lugar de atribuir los efectos sobre la viabilidad tanto al evento isquémico como a la reperfusión.

7.2. Efecto de LPS sobre la pérdida de viabilidad de fibroblastos cardiacos sujetos a I/Rs

En la literatura se encuentran ampliamente descritos los múltiples efectos provocados por LPS en diversos tipos celulares mediante estudios realizados *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Numerosos estudios han demostrado que LPS es capaz de inducir un efecto protector en el tejido cardiaco^{65,66}, siendo fundamental el momento en el cual se inicia el tratamiento con LPS dentro de la secuencia de eventos deletéreos. Nuestros resultados mostraron que el pre-condicionamiento de FC durante 24 y 16 h con LPS no fue capaz de ejercer un efecto cito-protector frente al daño ocasionado por la I/Rs. Estos resultados son en cierta forma similares a lo que se ha descrito en la literatura, puesto que dependería mucho del tipo celular, pero más que ello de la temporalidad del pre-tratamiento. En este sentido, Tuanzhu et al. (2008), demostraron que el pre-tratamiento *in vivo* con LPS 24 h antes de que los corazones fueran sometidos a isquemia (45 min) y reperusión (4 h), generó una disminución en el tamaño del área cardiaca infartada, disminución de la aparición de cardiomiocitos apoptóticos y un aumento en las proteínas implicadas en sobrevida celular, tales como Akt, GSK-3 β , y proteínas de shock térmico⁵¹. Estos resultados han sido replicados en diversos estudios. Uno de ellos señala que el pre-condicionamiento tardío con LPS (24 h) es capaz de producir un efecto cardioprotector a través de la vía de señalización de iNOS, disminuyendo el daño ocasionado por el evento de I/R⁶⁷. El efecto protector inducido por el pre-condicionamiento tardío con LPS se ha demostrado también en diversos tipos celulares. Heemann et al. (2000), observaron que en un modelo *in vivo* de I/R renal, la administración de bajas dosis de LPS durante 3 a 4 días antes de la realización de la I/R trajo consigo un efecto protector frente al daño letal ocasionado por el evento deletéreo, previniendo de esta forma la destrucción del tejido renal y la infiltración de leucocitos inducida por la I/R renal⁶⁸. Resultados similares se han obtenido en hepatocitos⁶⁹, y en neuronas de ratas neonatas⁷⁰. Estos resultados en su conjunto destacan que el efecto cito-protector generado por LPS frente al daño ocasionado por la I/R, sería dependiente de un pre-condicionamiento tardío con LPS, siendo necesarios tiempos de pre-tratamiento mayores a 24 h^{51, 67, 70} o 2 días^{68, 69} para observar el efector protector. En apoyo a esta tesis, Sano et al. (2013), inyectaron LPS a ratas por 20 h o 30

min antes de la realización de la isquemia, y demostraron que el pre-tratamiento con LPS solo 20 h antes del evento deletéreo fue capaz de ejercer un efecto protector frente al daño generado por la I/R ⁷¹. Más aún, Meng et al. (1997), describen que la cardioprotección ejercida por LPS frente al daño isquémico se observa al ser administrado 24 h, 3 días, y 7 días antes de la realización de la isquemia, ocurriendo la protección máxima a los 3 días; dicho efecto no se produjo con el pre-tratamiento de 2 o 12 h ⁷². Estos resultados se correlacionan con los nuestros, ya que a tiempos de pre-condicionamiento con LPS menores a 24 h no fue posible observar un efecto cito-protector, siendo necesario incluso en algunos casos tiempos mayores a 2 días de pre-tratamiento. En su conjunto, estos resultados sugieren que tiempos prolongados de pre-tratamiento con LPS son necesarios para la adquisición de la protección cardiaca contra el daño provocado por I/Rs. Este mecanismo podría involucrar la síntesis de novo y acumulación de proteínas cito-protectoras.

La contribución ejercida por la isquemia o reperfusión en cuanto a la muerte de los FC resulta muy controversial, ya que no se conoce con exactitud la participación e implicancias de cada uno de estos eventos en los efectos deletéreos provocados a nivel celular. Por esta razón, resulta fundamental evaluar el eventual rol protector que ejercería el tratamiento con LPS de manera independiente ya sea durante la isquemia o reperfusión, lo cual podría evidenciar el grado de participación de cada uno de estos eventos en la muerte de FC provocada por la I/Rs. Los resultados obtenidos mediante el tratamiento con LPS ya sea durante la isquemia o reperfusión, no mostraron cito-protección. A diferencia de nuestros resultados, en la literatura se señala que el tratamiento de FC con IGF-1 durante la fase de reperfusión tiene mayor preponderancia en la viabilidad de los FC que el tratamiento de las células durante la isquemia. Esto sugeriría, además, que los eventos ocurridos durante la reperfusión son críticos para los FC ³².

Por otro lado, nuestros resultados indican que el tratamiento de FC con LPS durante la isquemia y la reperfusión (durante ambos procesos), aumentó el número de células

viabiles al compararse con los FC sujetos a I/Rs sin tratamiento. Estos resultados demuestran el efecto cito-protector ejercido por LPS frente a la muerte de FC inducida por I/Rs. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Chao et al. (2005), el cual describe que el tratamiento de cardiomiocitos con LPS durante el evento de hipoxia/privación de suero mejora la sobrevivida de estas células, inhibiendo, además, la fragmentación del DNA, apoptosis y activación de la caspasa-3⁷³. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los descritos por Vivar et al. (2012), los que sugieren que los eventos ocurridos principalmente durante la reperfusión son críticos para la sobrevivencia de los FC. Cabe destacar que en este caso ellos emplearon IGF-1 como estímulo cito-protector³², el cual regula vías de sobrevivida distintas a las activadas por LPS, lo que permitiría explicar las diferencias obtenidas en cuanto a la temporalidad de la protección de los FC sujetos a I/R *in vitro*.

7.3 Participación del TLR4 en el efecto cito-protector mediado por LPS en FC sujetos a I/Rs

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio demuestran que TLR4 es altamente expresado en FC de manera basal. LPS es un conocido agonista de TLR4, siendo capaz de activar las vías de señalización mediadas por este receptor⁴⁴. Sin embargo, existe evidencia que señala que LPS es capaz, además, de ejercer un efecto agonista sobre TLR2, receptor encargado de activar vías de señalización similares a TLR4³⁸. Conjuntamente, en la literatura se describe que el tratamiento de ratas con ligandos de TLR2, como peptidoglicano o pam3csk4, produce un efecto cardioprotector frente al daño por I/R⁷⁴. Debido a estos antecedentes resulta fundamental determinar si el efecto cito-protector ejercido por LPS observado en nuestro trabajo es mediado a través de TLR4 o TLR2.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de FC con LPS en presencia de TAK-242 (Inhibidor de TLR4), durante la I/Rs generó una pérdida significativa de la viabilidad celular, similar a la obtenida en FC sujetos a I/Rs sin tratamiento. Los FC sujetos a I/R en presencia de TAK-242 presentaron un número de células viables similar al obtenido en las

células sometidas a I/R en ausencia del inhibidor. Esto sugiere que el bloqueo del TLR4 durante la I/R no induce un aumento en la pérdida de la viabilidad ya observada. A su vez, en las células control tratadas con TAK-242 no se observó una disminución en el número de células viables con respecto al control sin tratamiento. Estos resultados nos permiten concluir que el efecto cito-protector inducido por LPS frente al daño ocasionado por la I/Rs es mediado a través de TLR4. Además, el empleo de TAK-242 nos permite descartar la participación del TLR2 en la mediación del efecto ejercido por LPS. En cuanto al efecto cito-protector mediado a través de TLR4, en la literatura existen resultados opuestos. Por un lado, nuestros resultados concuerdan con múltiples antecedentes descritos en la literatura. Zhu et al. (2006), señalaron que LPS, a través de TLR4, conduce a una reducción significativa en la apoptosis de cardiomiocitos *in vitro* inducida por la privación de suero y un mejoramiento en la función celular observada una vez transcurrido el evento deletéreo. Además, la activación de TLR4 protegió a los cardiomiocitos del daño inducido por un evento de hipoxia/re-oxigenación *in vitro*. Estos efectos cito-protectores se abolieron completamente en cardiomiocitos TLR4^{-/-} ⁵². En concordancia con estos antecedentes, Wang et al. (2011), demostraron que el efecto cardioprotector ejercido por el tratamiento con LPS en un modelo de I/R *ex vivo* se abolió en ratas deficientes en TLR4, pero se mantuvo intacto en ratas deficientes en TLR2, señalando que el efecto cardioprotector ejercido por LPS es dependiente de TLR4 e independiente de TLR2 ⁵³. Consistente con nuestro estudio, en células madres mesenquimales, la aplicación de LPS previno la apoptosis inducida por H₂O₂/privación de suero. Sin embargo, dicho efecto protector no se observó en las células madres carentes de TLR4 ⁷⁵. Esto confirma que el efecto cito-protector ejercido por LPS es mediado a través de TLR4. De acuerdo a estos antecedentes, la vía de señalización mediada por TLR4 es responsable del efecto de sobrevivencia y mejoramiento funcional ejercido por LPS en cardiomiocitos aislados sometidos a un estímulo deletéreo. Estos resultados concuerdan con nuestro trabajo y diversos antecedentes publicados ⁷⁶. Sin embargo, otros resultados señalan que ratas deficientes en TLR4 exhiben una reducción en la inflamación del tejido y en el tamaño de la zona miocárdica infartada

luego de la I/R. Esto sugiere la participación del TLR4 en la mediación de la inflamación y en el daño del tejido cardiaco ⁷⁷. La razón de estas diferencias obtenidas no están claras; aunque, nosotros creemos que la deficiencia sistémica de TLR4 podría generar cierta confusión en el modelo *in vivo*, debido a que la carencia de TLR4 en las fuentes extra-cardiacas tales como macrófagos, linfocitos y neutrófilos podría tener un impacto directo sobre la inflamación cardiaca y el daño luego de la I/R. Estudios recientes confirman la idea de que las fuentes extra-cardiacas de TLR4 juegan un rol esencial en la mediación del daño y disfunción cardiaca bajo ciertas condiciones patológicas tales como endotoxemia ⁷⁸.

7.4 Participación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en el efecto cito-protector mediado por LPS en FC sometidos a I/Rs

Existen antecedentes que describen que el proceso de I/Rs activa cascadas de señalización implicadas en la sobrevida celular, mediante el reclutamiento de factores anti-apoptóticos y la inhibición de los pro-apoptóticos ⁷⁹. Las proteínas PI3K/Akt han demostrado conferir protección frente al daño ocasionado por I/R ⁸⁰. En este sentido, Vivar et al. (2012) indicaron, en un modelo de I/R *in vitro* (8/24 h, respectivamente), que el tratamiento de FC con IGF-1 aumentó significativamente los niveles de p-Akt mediante la activación de la vía PI3K/Akt, y conjuntamente previno, aunque parcialmente, la pérdida de viabilidad inducida por la I/Rs. Sin embargo, la inhibición de la proteína PI3K por Ly294002, provocó una mayor muerte celular que la causada por la I/Rs, bloqueando además el efecto protector ejercido por IGF-1 ³². Estos resultados exponen el efecto cito-protector mediado por la vía PI3K/Akt frente al daño por I/Rs. Sumado a esto, existen antecedentes que indican que la vía de señalización mediada por TLR4 activa la vía PI3K/Akt, provocando con esto una atenuación del daño miocárdico en un modelo *in vivo* ³⁹. Trabajos previos realizados en el laboratorio demostraron que LPS a través de TLR4 activa la vía de señalización PI3K/Akt en FC. Sin embargo, se desconoce el rol que cumplen las proteínas PI3K/Akt en la protección de FC ejercida por LPS frente a los efectos deletéreos

provocados por la I/R. Nuestros resultados indican que FC sujetos a I/R en presencia de LPS y Ly294002 no presentan un aumento en el número de células viables con respecto a la I/R sin tratamiento. Se observó además una disminución significativa en el número de FC posterior a la I/Rs comparado al grupo experimental tratado con LPS bajo I/Rs. Estos resultados indican que Ly294002 bloqueó el efecto cito-protector de LPS sobre la pérdida de viabilidad inducida por I/Rs. De acuerdo a nuestros resultados, podemos concluir que el efecto cito-protector ejercido por LPS sobre FC bajo I/Rs, es mediado, al menos en parte, por la vía de señalización de PI3K/Akt. Conjuntamente, nuestros datos concuerdan con el trabajo de Liu et al. (2010). Ellos demostraron que en un modelo *in vivo* de I/R realizado mediante la oclusión de la arteria coronaria izquierda seguido por la restauración del flujo sanguíneo, el tratamiento de las ratas con LPS activó la vía de PI3K/Akt en el miocardio, la que correlacionó con la cardioprotección producida por la aplicación de LPS, observada mediante una disminución en el tamaño del área infartada. La cardioprotección inducida por LPS se abolió en las ratas tratadas con un inhibidor farmacológico de PI3K, así como en ratas transgénicas que presentaban una expresión cardiaca defectiva en la proteína Akt. Esto sugiere que el efecto protector originado por LPS fue mediado a través de un mecanismo dependiente de PI3K/Akt⁸¹. Resultados similares se observaron por Ha et al. (2008), en un modelo *ex vivo* de I/R, donde el pre-tratamiento de las ratas durante 24 h con LPS produjo una atenuación del daño miocárdico y de los cardiomiocitos apoptóticos, el cual estuvo ausente en ratas KO para Akt⁵¹. En esta misma línea, Matsui et al. (1999), señalaron que IGF-1 previno la apoptosis de cardiomiocitos sometidos a 24 h de hipoxia *in vitro*. Este efecto se inhibió al tratar las células simultáneamente con un inhibidor de PI3K. De igual forma, en las mismas condiciones de hipoxia *in vitro* los cardiomiocitos se transducieron con adenovirus con formas constitutivamente activas de PI3K o Akt. El aumento de estas proteínas fue capaz de inhibir significativamente la apoptosis de los cardiomiocitos sujetos a hipoxia⁸⁰. Esto demostró el rol cito-protector ejercido por la vía PI3K/Akt frente a la apoptosis gatillada por un estímulo deletéreo. Es importante destacar que el tratamiento de FC con Ly294002 bajo I/R no produjo un aumento en la pérdida de viabilidad comparado con los FC bajo I/R en ausencia del inhibidor. Esto indicaría que el

bloqueo de la vía PI3K/Akt durante las 8/16 h de I/R no es fundamental en la sobrevida de los FC. Sin embargo, estos resultados no se correlacionan con los obtenidos por Vivar et al. (2012). Ellos señalan que FC bajo 8/24 h de I/R en presencia de Ly294002 provocó un aumento en la pérdida de viabilidad con respecto a las células bajo I/R en ausencia del inhibidor ³². Esta diferencia se podría deber al mayor tiempo de reperfusión empleado en este estudio, lo que generaría una mayor susceptibilidad de las células al estímulo dañino, haciéndolas de esta forma más sensibles a la inhibición de las vías implicadas en la sobrevida celular. Nosotros también demostramos que la inhibición de PI3K/Akt bajo condiciones normales no incrementó la muerte de FC, sugiriendo que en la condición de control esta vía no estaría involucrada en la sobrevida de FC.

La cascada de señalización de ERK1/2 está involucrada en 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 ⁸². Estudios realizados en FC bajo I/R *in vitro*, demostraron que la proteína ERK1/2 se encontraba ya activada en condiciones basales, y sus niveles de activación disminuían al comienzo del evento isquémico. Sin embargo, al comienzo de la reperfusión, los niveles de activación fueron similares a los observados en el control ³². En este mismo estudio se señala que la aplicación de IGF-1 sobre FC sometidos a I/Rs ejerce un efecto cito-protector y antiapoptótico. Sin embargo, el empleo de PD98059 (inhibidor de la vía de ERK1/2) bloqueó completamente estos efectos, indicando que la prevención de la pérdida de viabilidad y el efecto anti-apoptótico conferido por IGF-1 son parcialmente dependientes de ERK1/2. En esta misma línea, se demostró que el efecto antiapoptótico ejercido por TGF- β 1 sobre FC sujetos a I/Rs *in vitro* se perdía completamente en presencia de PD98059 ⁵⁵. Diversos autores han recalcado la importancia de la activación de esta vía en la sobrevida celular. También se indica que su inhibición en el momento de la reperfusión podría exacerbar el daño causado por I/Rs. En este sentido, Yue et al. (2000), mostraron que la reperfusión de corazones de rata infartadas en presencia del inhibidor PD98059, incrementa el daño causado por I/R ⁸². Estos reportes dan cuenta del efecto antiapoptótico y cardioprotector mediado a través

de la vía de señalización de ERK1/2 durante la ocurrencia de un evento de I/R. Trabajos previos realizado en el laboratorio demostraron que LPS a través de TLR4 activa la vía de ERK1/2 en FC. Sin embargo, no existen estudios que relacionen directamente la protección ejercida por LPS en FC bajo I/Rs con la cascada de transducción de la familia de MAPK. De acuerdo a nuestros resultados, los FC sometidos a I/Rs en presencia de LPS y PD98059 no presentaron un aumento en el número de células viables con respecto a la I/Rs sin tratamiento. Se observó además una disminución significativa en el número de FC posterior a la I/Rs comparado al grupo experimental tratado con LPS bajo I/Rs. Estos resultados muestran que PD98059 abolió por completo el efecto provocado por LPS en la disminución de la pérdida de viabilidad gatillada por la I/Rs. De acuerdo a esto, podemos concluir que el efecto cito-protector ejercido por LPS sobre los FC sometidos a I/Rs, es mediado, al menos en parte, por la vía de señalización de ERK1/2. Es importante mencionar que el tratamiento de FC con PD98059 bajo I/R no produjo un aumento en la pérdida de viabilidad comparado con los FC bajo I/R en ausencia del inhibidor. Esto sugeriría que el bloqueo de la vía de ERK1/2 durante las 8/16 h de I/Rs no es fundamental en la sobrevida de los FC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante el uso de Ly294002. Sin embargo, no concuerdan con ciertos estudios realizados en FC sujetos a I/Rs de 8/24 h ³², lo cual se podría deber, como se mencionó anteriormente en el caso de Ly294002, al mayor tiempo de reperfusión empleado en este estudio. También demostramos que la inhibición de ERK1/2 bajo condiciones normales no incrementa la muerte de FC, sugiriendo que en la condición de control esta vía no estaría involucrada en la sobrevida de FC.

La probable explicación que da cuenta del mecanismo cito-protector vía ERK1/2 ha sido analizada por Philip et al. (2013), quienes demostraron que en FC el estrés oxidativo inducido por el tratamiento con H₂O₂ promueve la activación de NF-κB. Además, la inhibición de este factor transcripcional resultó en un aumento significativo en la apoptosis de los FC. A su vez, este grupo observó que en las células sometidas con H₂O₂ hubo un aumento en la activación de ERK1/2. La inhibición de esta proteína con PD98059

comprometió significativamente la viabilidad de los FC, indicando el rol antiapoptótico gatillado por ERK1/2 bajo condiciones de estrés oxidativo. Más aun, la inhibición de ERK1/2 también atenuó la degradación de I κ B α , indicando que la vía clásica de activación de NF- κ B vía degradación de I κ B α , podría ser dependiente de ERK1/2⁸³. Estos antecedentes dan cuenta de que la activación de NF- κ B dependiente de ERK1/2, podría ser clave en la protección de los FC frente al daño oxidativo. Además, otros estudios señalan que la inhibición de NF- κ B compromete fuertemente la viabilidad de FC bajo condiciones de hipoxia *in vitro*⁸⁴, dando indicios del rol crítico de NF- κ B en la protección de FC frente a condiciones deletéreas. Antecedentes del laboratorio y diversos datos publicados demuestran que LPS vía TLR4 es capaz de activar NF- κ B, el cual se correlacionaría con la activación de la vía MAPK⁸³. Asimismo, resultados de nuestro laboratorio demostraron que la inhibición de NF- κ B en FC bajo I/Rs de 8/16 h, provoca una pérdida significativa de la viabilidad celular, lo cual coincide con los antecedentes mencionados anteriormente⁸⁴. En conclusión, estos resultados concuerdan con nuestros antecedentes en cuanto a que la cito-protección promovida a través de la activación de TLR4 por LPS es mediada por la vía de ERK1/2. Además, de acuerdo a los datos mencionados anteriormente, NF- κ B jugaría un rol crítico en la mediación de la sobrevivencia de los FC vía ERK1/2. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para evaluar la relación que pueda existir entre las vías de señalización PI3K/Akt, ERK1/2 y NF- κ B, y la regulación cruzada que podría darse entre ellas en FC sujetos a I/R.

7.5 Evaluación del efecto antiapoptótico mediado por LPS en FC sujetos a I/Rs

Nuestros resultados mostraron que los FC sometidos a I/Rs durante 8/16 h experimentaron una muerte celular de tipo apoptótica, medida a través del procesamiento proteolítico de la procaspasa 8 y 3. El evento de I/Rs generó la activación de la caspasa 8 y 3, evidenciado a través de una disminución significativa de la procaspasa 8 y 3, sugiriendo un aumento de las formas activas de estas proteínas. Esto desencadenaría los eventos que conducen a la muerte celular apoptótica. La disminución

obtenida en los niveles de la procaspasa 8 fue mayor a los obtenidos con respecto a la procaspasa 3. Esto se podría deber a que la caspasa iniciadora es más factible de activar que la caspasa ejecutora, ya que su procesamiento depende de estímulos río arriba de la cascada de señalización apoptótica. De esta manera existiría una mayor probabilidad de activación por medio de diversos estímulos, a diferencia de lo que ocurre con la caspasa ejecutora. Esta última, si bien puede ser activada por otras caspasas diferentes a la caspasa 8, su activación ocurre río abajo, lo cual dificulta su procesamiento debido a los diversos estímulos antiapoptóticos que existen a este nivel transduccional los que podrían inhibir su activación. Nuestros resultados concuerdan con los datos publicados por Vivar et al. (2013), los que señalan que en FC sujetos a I/Rs *in vitro* durante 8/16 h se produjo una disminución significativa de los niveles de la procaspasa 8, 3 y 9. Además, ellos observaron un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas una vez concluida la I/Rs ⁵⁵. En esta misma línea, FC sometidos a 8 h de isquemia no experimentaron apoptosis, mientras que el posterior evento de reperfusión generó un aumento de muerte por apoptosis de manera tiempo dependiente, observándose a las 8/16 h de I/Rs un porcentaje significativo de muerte por apoptosis ³². Lo anterior sugiere que el daño inducido por reperfusión es capaz de gatillar la activación de elementos proapoptóticos que finalmente llevan a la muerte del FC 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 ⁸⁵. Debido a esto es que la apoptosis suele ser relacionada principalmente con la reperfusión en desmedro de la isquemia, ya que la apoptosis es un proceso dependiente de ATP, molécula cuyos niveles son depletados en la isquemia y recuperados tras la reperfusión. De acuerdo a nuestros resultados, podemos concluir que la I/Rs de 8/16 h gatillarían la apoptosis de FC.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran que el tratamiento de FC con LPS durante el evento de I/Rs previno el procesamiento de la procaspasa 8 y 3. La inhibición de la activación de las caspasas iniciadora y ejecutora trae como consecuencia un bloqueo de los mecanismos necesarios para llevar a cabo la muerte de los FC vía apoptosis. Estos

resultados demuestran el efecto antiapoptótico ejercido por LPS, lo cual trae como consecuencia una disminución en la muerte de los FC. Estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos mediante los estudios de viabilidad celular. En la literatura existen diversos estudios que demuestran el efecto antiapoptótico ejercido por LPS. Entre ellos destaca el efecto antiapoptótico de LPS en cardiomiocitos expuestos a un evento de hipoxia/privación de suero. En estos experimentos LPS previno la disminución en la fragmentación del ADN e inhibió la proteólisis de la procaspasa 3⁷³. En esta misma línea, el pre-tratamiento de ratas con LPS durante 1 h antes que los corazones se sometieran a I(45 min)/R(4 h) generó una disminución de los cardiomiocitos apoptóticos⁸¹. A su vez, ratas tratadas con LPS 24 h antes de la realización de la I(45 min)/R(4 h) presentaron una reducción en el porcentaje de cardiomiocitos apoptóticos y en la actividad de la caspasa 3⁵¹. Estos antecedentes refuerzan nuestra hipótesis en cuanto al efecto antiapoptótico ejercido por LPS en FC.

Es importante destacar que los FC control tratados con LPS no presentaron variaciones en los niveles de la procaspasa 8 y 3 comparado al control sin tratamiento. Esto indicaría que en la ausencia de un estímulo deletéreo, LPS no afectaría los niveles de estas proteínas apoptóticas. En contraste con nuestros resultados, Wang et al. (2013), señalan que cardiomiocitos incubados durante 4 h con LPS presentan un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas⁸⁶. Sin embargo, cabe destacar que en este estudio se empleó una concentración de LPS 25 veces mayor a la utilizada en nuestro modelo experimental. Esta mayor concentración de LPS podría estar relacionado a los efectos dañinos y al aumento en el porcentaje de células apoptóticas, tomando en cuenta que el empleo de 1 µg/mL de LPS es ya considerada una concentración elevada.

En la literatura se describe que cardiomiocitos expuestos a 6 h de privación de suero *in vitro* experimentan un aumento en el número de células apoptóticas. Esto se inhibió al ser tratados con LPS durante el evento deletéreo, confirmando el efecto antiapoptótico ejercido por LPS. Sin embargo, en cardiomiocitos deficientes en TLR4 (TLR4^{-/-}) sometidos a 6 h de privación de suero el efecto antiapoptótico de LPS se bloqueó completamente, aumentando de manera significativa el porcentaje de células apoptóticas al ser

comparado con los cardiomiocitos “wild type” tratados con LPS ⁵². Estos resultados afirman que el efecto antiapoptótico ejercido por LPS es mediado a través de TLR4. Resultados similares se obtuvieron en células madres mesenquimales, las que se protegieron de la apoptosis inducida por H₂O₂/privación de suero por el tratamiento con LPS. Sin embargo, en estas células carentes de TLR4 (TLR4^{lps-del}) el efecto antiapoptótico ejercido por LPS se abolió ⁷⁵, señalando que este efecto es dependiente de la activación de TLR4. En esta misma línea, nuestros resultados muestran que el efecto ejercido por LPS sobre la prevención del procesamiento de la procaspasa 8 y 3 se abolió completamente en FC tratados con LPS en presencia del inhibidor TAK-242. Al comparar el nivel alcanzado luego de las 8/16 h de I/Rs en FC tratados con LPS versus los FC tratados con LPS y TAK-242, se observa que en estos últimos los niveles de estas proteínas disminuyeron drásticamente, alcanzando un valor similar al obtenido en los FC bajo I/R sin tratamiento. Esto generaría un aumento en los niveles de la caspasa 8 y 3, desencadenando la muerte vía apoptosis. De acuerdo a esto, se puede concluir que el efecto antiapoptótico ejercido por LPS es mediado a través de TLR4. En contraste con nuestros resultados, Ding et al. (2013), señalan que en un modelo de I(30 min)/R(6 h) *in vivo* la apoptosis cardiaca se redujo marcadamente en las ratas deficientes en TLR4 comparadas con las ratas “wild-type” ⁸⁷. Sin embargo, cabe destacar que la deficiencia sistémica de TLR4 puede ocasionar diversos efectos deletéreos a nivel cardiaco, lo cual podría estar induciendo un aumento en la apoptosis observada en el tejido, siendo necesario una evaluación *in vitro* con células deficientes en TLR4 que permitieran descartar la contribución ejercida por los factores extra-cardiacos.

Los FC bajo I/Rs en presencia de TAK-242 no presentaron un aumento en el procesamiento de la procaspasa 8 y 3 con respecto a los FC bajo I/R en ausencia del inhibidor. Esto sugiere que la inhibición del TLR4 durante la I/R no afecta la activación de estas proteínas apoptóticas. Esto demostraría que el efecto agonista sobre TLR4 ejercido por la liberación de DAMPs durante el daño por I/R es incapaz de ejercer un efecto antiapoptótico en FC, siendo necesario para esto la participación de LPS. Estos resultados

concuerdan con los obtenidos mediante los estudios de viabilidad celular presentados anteriormente.

Respecto de las vías de señalización implicadas en el procesamiento de la procaspasa 8 y 3, nuestros resultados muestran que los FC con LPS y Ly294002 bajo I/Rs presentaron un nivel significativamente menor de la procaspasa 8 al ser comparado respecto a FC con LPS bajo I/Rs. Esto muestra que Ly294002 bloquea completamente el efecto ejercido por LPS sobre la disminución del procesamiento de la procaspasa 8. Por otro lado, FC con LPS y Ly294002 bajo I/Rs presentaron prácticamente el mismo nivel de la procaspasa 3 respecto a los FC con LPS. De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que la vía PI3K/Akt participa en el efecto ejercido por LPS sobre la prevención del procesamiento de la procaspasa 8. Sin embargo, esta vía transduccional no estaría relacionada con la activación de la caspasa 3. Estos resultados sugieren que la proteína Akt, activada por LPS, actuaría río arriba de la cascada de señalización implicada en la apoptosis, inhibiendo la proteólisis de la procaspasa 8 de manera directa o indirecta. De esta manera, el efecto antiapoptótico se produciría al bloquear la formación de la caspasa iniciadora. Sin embargo, Akt no sería capaz de actuar río abajo de la vía apoptótica e inhibir la activación de la caspasa ejecutora. Por lo cual, el efecto antiapoptótico producido por LPS a través de PI3K/Akt ocurriría mediante la inhibición exclusiva de la caspasa 8.

Con respecto a la participación de la vía ERK1/2, nuestros resultados indican que el tratamiento de FC bajo I/Rs con LPS y PD98059 provocaron una disminución en los niveles de la procaspasa 8 y no alteraron los niveles de la procaspasa 3, al ser comparados respecto a los FC tratados con LPS bajo I/R. A pesar de no obtener diferencias estadísticamente significativa, se observó una clara tendencia de la participación de ERK1/2 en la inhibición del procesamiento de la procaspasa 8 en FC tratados con LPS bajo I/R. Esto indicaría que ERK1/2 estaría ejerciendo un efecto antiapoptótico a través del bloqueo, ya sea de manera directa o indirecta, de la activación de la caspasa 8. Por el contrario, estos datos señalan que ERK1/2 no participaría en la prevención del procesamiento de la procaspasa 3 ejercido por LPS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en cuanto a la participación de la vía PI3K/Akt en la prevención de

la activación de la caspasa 8, sin participar en el efecto ejercido por LPS sobre la activación de la caspasa 3. De acuerdo a estos resultados, nosotros concluimos que las vías PI3K/Akt y ERK1/2 se encuentran implicadas en la inhibición del procesamiento de la procaspasa 8 ejercido mediante la activación del TLR4. Esta inhibición sería responsable de mediar el efecto antiapoptótico gatillado por este receptor en FC frente a un estímulo deletéreo. Sin embargo, se desconoce que vías transduccionales participarían en la inhibición de la proteólisis de la procaspasa 3 ejercido por la activación del TLR4. De acuerdo a diversos resultados obtenidos en nuestro laboratorio y antecedentes descritos en la literatura^{84, 88, 89}, nosotros sugerimos que el factor transcripcional NF- κ B y la proteína antiapoptótica c-IAPs, activados por TLR4, podrían participar en la inhibición de las caspasas. Este efecto se produciría controlando la activación de la caspasa 3. Otros estudios necesitan ser realizados para evaluar que otras vías de señalización podrían estar implicadas en la regulación de las caspasas. Futuros estudios de nuestro laboratorio se enfocaran a evaluar el posible efecto antiapoptótico gatillado por la activación de NF- κ B y cIAP dependientes de TLR4.

8. CONCLUSIONES

- FC sujetos a 8/16 h de I/Rs experimentan una pérdida significativa en la sobrevivencia celular.
- El pre-condicionamiento de FC con LPS durante 24 o 16 h, y el tratamiento con LPS durante la isquemia o reperfusión, no previenen la pérdida de viabilidad inducida por I/Rs.
- El tratamiento de FC con LPS durante la isquemia y reperfusión (ambas inclusive) previene la pérdida de viabilidad inducida por I/Rs.
- El efecto cito-protector ejercido por LPS durante la I/Rs es mediado a través de TLR4.
- Las vías de sobrevivencia PI3K/Akt y ERK1/2 participan en el efecto cito-protector ejercido por LPS.
- LPS a través de TLR4 previene el procesamiento de la procaspasa 8 y 3 inducido por I/Rs .
- Las vías PI3K/Akt y ERK1/2 participan en la prevención del procesamiento de la procaspasa 8 ejercido por LPS, pero no tienen efecto en el procesamiento de la procaspasa 3.

9. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud, 55ª Asamblea Mundial de la Salud, A55/16, punto 13.11, 2002.
2. Weber, K.T. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertension*. 2004; 22: 47-50.
3. Baum, J., Duffy, H. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about?. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 57: 376-379.
4. Buja, M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2005; 14: 170-175.
5. Camelliti, P., Borg, T., Kohl, P. Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005; 65: 40-51.
6. Sun, Y., Weber, K. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovas Res*. 2000; 46: 250-256.
7. Tao, Z., Cavasi,n M., Yang, F., Liu, Y., Yang, X. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci*. 2004; 74: 1561-1572.
8. MacKenna, D., Summerour, S., Villarreal, F. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblasts function and extracelular matrix synthesis. *Cardiovas Res*. 2000; 46: 257-263.
9. Camelliti, P., Green, C., LeGrice, I., Kohl, P. Fibroblast Network in Rabbit Sinoatrial Node: Structural and Functional Identification of Homogeneous and Heterogeneous Cell Coupling. *Circ Res*. 2004; 94: 828-835.
10. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003; 200: 500-503.
11. Jennings, R.B. & Reimer, K.A. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 1991; 42: 225-246.
12. Hamacher-Brady, A., Brady, N.R. & Gottlieb, R.A. The interplay between pro death and pro survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2006; 20: 445-62.
13. Jennings, R.B., Steenbergen, C.Jr., Reimer, K.A. Myocardial ischemia and reperfusion. *Monographs in Pathol*. 1995; 37: 47-80.

14. Buerke, M., Murohara, T., Skurk, C., Nuss, C., Tomasellit, K., and Lefer, A. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(17): 8031 – 8035.
15. Zaitone, S., Abo-Gresha, N. Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: role of iNOS and VEGF. *Europ J of Pharmacol*. 2012; 691: 134 – 142.
16. Qiu, Y., Li, t., Li, H., Zuo, Y. Continuous spinal cord stimulation reduced cardiac ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Heart, Lung and Circ*. 2012; 21: 564 – 571.
17. Brar, B., et al. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependet pathway. *J Biol Chem*. 2000; 275: 8508 – 8514.
18. Webster, K., et al. Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *Circ*. 1998; 98: 1743.
19. Buja, L.M., Hagler, H.K., and Willerson, J.T. Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium*. 1988; 9(5-6): 205-217.
20. Trumo, B., Berezesky, I., Chang, S., and Phelps, P. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, y necrosis. *Toxicol pathol*. 1997; 25: 82.
21. Guimaraes, C., Linden, R. Programmed cell death Apoptosis and alternative death styles. *Eur J Biochem*. 2004; 271: 1638-1650.
22. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S., Ahmad, M., Alnemti, E., and Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997; 91: 479-489.
23. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B., and Yuan, J. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-b. *Nature*. 2000; vol 403.
24. Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P. More tan one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 1999; 18: 7719-7730.
25. Gottlieb, R., Burleson, K., Kloner, R., Bablor, B., Engler, R. Reperfusion Injury Induces Apoptosis in Rabbit Cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994; 94: 1621-1628.

26. Matsumura, K., Jeremy, R., Schaper, J., Becker, L. Progression of Myocardial Necrosis During Reperfusion of Ischemic Myocardium. *Circ.* 1998; 97: 795-804.
27. Takashi, E., Ashraf, M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 209-224.
28. Freude, B., et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol cell cardiol.* 2000; 32: 197-208.
29. Ohno, M., et al. "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation. *Circ.* 1998; 98: 1422-1430.
30. Baines, C.P. et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005; 434: 658 -662.
31. Vivar, R., et al. TGF- β 1 prevents simulated ischemia/reperfusion-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of both canonical and non-canonical signaling pathways. *Bioch Bioph Acta.* 2013; 1832: 754-562.
32. Vivar, R., et al. Cardiac fibroblast death by ischemia/reperfusion is partially inhibited by IGF-1 through both PI2K/Akt and MEK-ERK pathways. *Exper Mol Path.* 2012; 93: 1-7.
33. Eguchi, Y., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Shimizu, S. And Tsujimoto, Y. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. *Cancer Res.* 1999; 59: 2174-2181.
34. Hashimoto, C., Hudson, K., Anderson, K. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic a polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988; 52: 269-279.
35. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassettes patzle/toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell.* 1996; 86: 973-983.
36. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388: 394-397.
37. Rock, F., Hardiman, G., Timans, J., Kastelein, R., Bazan, F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 588-593.

38. Takeda, K., Akira, S. TLR signaling pathways. *Sem Immunol.* 2004; 16: 3-9.
39. Ha, T., Liu, L., Kelley, J., Kao, R., Williams, D., Li, C. Toll-Like Receptors: New Players in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Antiox Redox Signal.* 2011; 15: 7.
40. Foldes, G, et al. Targeting the toll-system in cardiovascular sciences. Recent patents on inflammation & allergy drug discovery. 2007; 1: 57-67.
41. Takeuchi, O., Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010; 140: 805-20.
42. Kanzler, H., Barrat, F., Hessel, E., Coffman, R. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Med.* 2007; 13: 5.
43. Hennessy, E., Parker, A., O'Neill, L. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9: 293-307.
44. Lu, Y., Yeh, W., Ohashi, P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytok.* 2008; 42: 145-151.
45. Gioannini, T., Weiss, J. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res.* 2007; 39: 249-260.
46. Mitsuzawa, H., et al. Recombinant soluble forms of extracellular TLR4 domain and MD-2 inhibit lipopolysaccharide binding on cell surface and dampen lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *J Immunol.* 2006; 177: 8133-8139.
47. Frantsz, S., Ertl, G. and Bauersachs, J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat clinic prac cardiovas med.* 2007; vol 4 N°8.
48. Zarembek, K., Godowski, P. Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002; 168: 554 – 561.
49. Wang, C., et al. Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via suppression of TLR4-NFkB signal pathway. *Neurochemistry international.* 2013; 63: 741-749.
50. Suzuki, Y., et al. Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia. *Scientific reports,* 2012.

51. Ha, T., et al. Lipopolysaccharide-induced myocardial protection against icaemia/reperfusion injury is mediated through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Cardiovas Res.* 2008; 78: 546-553.
52. Zhu, X., et al. MyD88 and NOS2 are essential for Toll-like receptor 4-mediated survival effect in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H1900-H1909.
53. Wang, E., et al. Toll-like Receptor 4 Signaling Confers Cardiac Protection Against Ischemic Injury via Inducible Nitric Oxide Synthase- and Soluble GuanylateCyclase - dependent Mechanisms. *Anesthesiology.* 2011; 114: 603-613.
54. Vivar, R., et al. Phospholipase C/proteína kinase C pathway mediates angiotensin II-dependent apoptosis in neonatal rat cardiac fibroblasts expressing AT1 receptor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 52: 184-190.
55. Vivar, R., et al. TGF- β 1 prevents simulated ischemia/reperfusion-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of both canonical and non-canonical signaling pathways. *Bioch Bioph Acta.* 2013; 1832: 754-562.
56. Maxwell, S.R.J. and G.Y.H. Lip. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *International Jornal of Cardiology.* 1997; 58: 95-117.
57. 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 volumen regulation, and sarcolemmal integrity. *Circ Res.* 1981; 49: 901-911.
58. Porter, K.E. and Turner N.A. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Therap* 2009; 123: 255-278.
59. Brar, B., et al. Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischemia and at reoxygenation. *Cardiovas Res.* 2001; 51: 265-274.
60. Shen, Min., et al. Resveratrol attenuates ischemia/reperfusion injury in neonatal cardiomyocytes and its underlying mechanism. *Plos one.* 2012, volumen 7, issue 12.
61. Jenning, 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 citro vs, severe ischemia *in vivo*. *Circ Res.* 1981; 49: 892-900.

62. Li, P., Dietz, R., Harsdorf, R. Superoxide induce apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor- β 1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Letters*. 1999; 448: 206-210.
63. Vanden Hoek, T.L., et al., Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia. *Am J Physiol*. 1996; 270: H1334-H1341.
64. Kloner, R., Braunwald, E. Myocardial reperfusion: a double edged sword?. *J Clin Invest*. 1985; 76: 1713-1719.
65. Brown, J., et al. Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Physiol Sci*. 1989; 86: 2516-2520.
66. Yao, Z., et al. Cardioprotective effects of monophosphoryl lipid-A, a novel endotoxin analogue, in dog. *Cardiovasc Res*. 1993; 27: 832-838.
67. Wang, Y., et al. Lipopolysaccharide triggers late preconditioning against myocardial infarction via inducible nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. 2002 56: 33-42.
68. Heemann, U., et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2000; 56: 33-42.
69. Rao, J., Qin, J., Qian, X., Lu, L., Wang, P., et al. Lipopolysaccharide preconditioning protects hepatocytes from ischemia/reperfusion injury (IRI) through inhibiting ATF4-CHOP pathway in mice. *PLoS ONE*. 2013; 8(6).
70. Lin, H., Wu, C., and Huang, C. The Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in lipopolysaccharide preconditioning-induced hypoxic-ischemic tolerance in the neonatal rat brain. *Stroke*. 2010; 41: 1543-1551.
71. Sano, T., et al. Protective effect of lipopolysaccharide preconditioning in hepatic ischemia reperfusion injury. *HBP*. 2010; 12: 538-545.
72. Meng, X., et al. LPS induces late cardiac functional protection against ischemia independent of cardiac and circulating TNF- α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1997; 273: H1894 – H1902.
73. Chao, W., et al. Lipopolysaccharide improves cardiomyocyte survival and function after serum deprivation. *J Biol Chem*. 2005; 280: 21007-22005.

74. Ha, T., et al. TLR2 ligands induce cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt – dependent mechanism. *Cardiovas Res.* 2010; 87: 694-703.
75. Wang, Z., et al. Lipopolysaccharides can protect mesengymal stem cells (MSCs) from oxidative estress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor (TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biol Int.* 2009; 33: 665-674.
76. Chao, W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296: H1-H12.
77. Oyama, J., et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4 – deficient mice. *Circ.* 2004; 109:784-789.
78. Tavener, S.A., et al. Immune cell toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res.* 2004; 95: 700-707.
79. Cross, T.G., et al. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. *Exper Cell Res.* 2000. 256: 34-41.
80. Matsui, T., et al., Adenoviral Gene Transfer of Activated Phosphatidylinositol 3`-Kinase and Akt Inhibits Apoptosis of Hypoxic Cardiomyocytes *In Vitro.* *Circ.* 1999; 100: 2373-2379.
81. Liu, X., et al. The cardioprotection induced by lipopolysaccharide involves phosphoinositide 3-kinase/Akt and high mobility group box 1 pathways. *J Biom Res.* 2010; 24: 324-331.
82. 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: 692-699.
83. Philip, L., Shivakura, K. cIAP-2 protects cardiac fibroblasts from oxidative damage: An obligate regulatory role for ERK1/2 MAPK and NF-kB. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 62: 217-226.
84. Sangeetha, M., et al. NF-kB inhibition compromisos cardiac fibroblast viability under hipoxia. *Experl Cell Res.* 2011; 317: 899-909.
85. Lundberg, K.C., and Szweda, L.I. Initiation of mitochondrial-mediated apoptosis during cardiac reperfusion. *Arch Biochem and Biophs.* 2004; 432: 50-57.
86. Wang, H., et al. LPS induces cardiomyocyte injury through calcium-sensing receptor. *Mol Cell Biochem.* 2013; 379: 153-159.

87. Ding, H.S., et al. The HMGB1-TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis. *Gene*. 2013; 527: 389-393.
88. Wang, C.Y., et al. NF- κ B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation. *Sci*. 1998; 281: 1680-1683.
89. Karin, M., and Lin, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002; 3: 221-227.