

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Proteína VCAM-1 en la sobrevida del cardiomiocito
precondicionado con TNF- α frente el daño por isquemia/reperfusión**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de

Doctor en Bioquímica por:

José Jafet Ortiz Quintero

Directores de Tesis

Dra. Lorena García

Dr. Sergio Lavandero

Santiago, Chile

Junio 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

JOSE JAFET ORTIZ QUINTERO

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Bioquímica, en el examen público de tesis rendido el día ____ de _____ del 2023.

Directores de tesis:

Dra. Lorena García _____

Dr. Sergio Lavandero _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes _____

Dra. Sonja Buvinic _____

Dra. Paulina Donoso _____

Dr. Mauricio Boric _____

Índice de contenido

Agradecimientos	1
Financiamiento	3
Divulgación científica de esta Tesis	4
Publicaciones.....	4
Presentaciones en congresos	4
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	7
Abreviaturas, siglas y acrónimos	7
1. Resumen	9
2. Abstract	12
3. Introducción	15
Enfermedades cardiovasculares	15
Proteína de adhesión celular vascular-1	16
Regulación transcripcional de VCAM-1	16
Regulación post-traducciona l de VCAM-1	17
VCAM-1 cardíaco	18
Precondicionamiento como mecanismo de cardioprotección	19
Factor de necrosis tumoral alfa	20
Transducción de señales por TNF- α	21
Efectos de TNF-alfa en el corazón	23
4. Hipótesis y objetivos	26
Hipótesis.....	26
Objetivo general	27
Objetivos específicos.....	27
5. Materiales y métodos	28
Reactivos	28
Animales.....	29
Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas	29
Tratamiento de cardiomiocitos con TNF- α	30
Evaluación de la viabilidad celular.....	30
Medición de niveles intracelulares de ATP.....	31

Medición de la actividad LDH	31
Extracción y preparación de proteínas totales	32
Análisis de proteínas mediante Western blot	32
Extracción del RNA total	34
Síntesis de DNA complementario	35
PCR en tiempo real	35
Inhibición de la transcripción y la traducción	35
Ensayo de estabilidad del RNA mensajero	36
Transfección de cardiomiocitos.....	37
Ensayo de isquemia/reperfusión simulada	38
Inhibición de la vía JAK2/STAT3.....	40
Expresión de resultados y análisis estadísticos	40
6. Resultados	41
Objetivo específico 1: Determinar el efecto de TNF- α sobre la expresión de la proteína y mRNA de VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.....	41
Efecto de TNF- α en la viabilidad celular de los cardiomiocitos de rata neonatas.....	41
Efecto de TNF- α en los niveles proteicos de VCAM-1 en el cardiomiocito.....	43
Efecto de TNF- α sobre la expresión del mRNA de VCAM-1 en los cardiomiocitos	45
Efecto de la inhibición de la transcripción y la traducción en la expresión de la proteína VCAM-1 inducida por TNF- α	47
Objetivo específico 2: Evaluar si la expresión de VCAM-1 estimulada por TNF- α es dependiente del receptor TNFR2 y la vía de señalización JAK2/STAT3 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.	49
Señalización de TNF- α en el cardiomiocito y expresión de VCAM-1.....	49
Inhibición de la la vía JAK2/STAT3 y la expresión de VCAM-1	54
Objetivo específico 3: Estudiar si la proteína VCAM-1 media el efecto protector frente el daño por isquemia/reperfusión simulada en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata precondicionados con TNF- α	58
Efecto del precondicionamiento con TNF- α en la protección del cardiomiocito frente el daño por I/R simulada	58
Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la cardioprotección frente el daño por I/R simulada inducida por TNF- α	61
Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes asociados a sobrevida y cardioprotección frente I/R.....	65
7. Discusión	68
8. Conclusiones	80

9. Limitaciones del estudio..... 82
10. Figuras anexas 83
11. Referencias Bibliográficas 85

*A mi familia, mis padres, mi hermana, mi hermano, mi sobrino y mis sobrinas
por apoyarme y alentarme en este proceso,
por su amor incondicional.*

Agradecimientos

Agradezco tener la fortuna de haber formado parte del Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), en donde durante todo el desarrollo de mi tesis compartí con personas brillantes y de una calidad humana excepcional. Allí siempre encontré un alto nivel académico y científico: logré formar mi pensamiento crítico, y compartir con la/os profesora/es en un ámbito profesional de respeto y humildad.

Agradezco en especial a mi equipo de trabajo conformado por Mayarling Troncoso, Carolina Hernández, Danica Jiménez, Ximena Calle, Felipe Muñoz, Juan Francisco Silva y en general al Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares (LTSM), junto a ellos compartí penas, frustraciones, días y noches infinitas en el laboratorio. Pero también compartimos momentos de alegría, cafecitos, almuerzos, celebraciones y “carretes”. Gracias por su compañerismo y amistad, por su gentileza y “apañe”. Ustedes hicieron que este camino fuera más llevadero y me sintiera como en casa.

A Andrea Ramírez, Valeria Garrido, Mónica Villa, Camila López, Ignacio Norambuena, Pablo Morales y Matías Monsálvez, por sus consejos y palabras de ánimo en el laboratorio, pero sobre todo por su amistad. Su alegría, gentileza y cariño incondicional hicieron más llevadera mi estancia en Chile.

En especial agradezco a mis directores de tesis, el Dr. Sergio Lavandero y la Dra. Lorena García, quienes a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre estaban dispuestos a escucharme a reunirnos para evaluar avances, a revisar y corregir mis trabajos. Su apoyo constante, consejos y confianza en mi trabajo lograron impulsar mi carrera y llegar hasta el final del camino.

A los Dres. Mario Chiong, Valentina Parra y Jaime Riquelme por todo el apoyo, cariño y confianza que entregan a todos sus alumnos del LTSM día a día. A mi comisión de tesis, los Dres. Alfonso Paredes, Sonja Buvinic, Paulina Donoso y Mauricio Boric, por todo el apoyo y enseñanza brinda en este proceso.

Gracias a todos los profesores y Comité Académico del Programa de Doctorado en Bioquímica, quienes, con cada conversación, experiencia recibida, consejos y exigencias me impulsaron a crecer y a mejorar constantemente.

A Gindra Latorre, Fidel Albornoz y Sebastián Leiva por su apoyo incondicional con asuntos técnicos y administrativos del laboratorio, pero sobre todo gracias por su gentileza y cariño.

A las secretarias de la Escuela de Posgrado de la Facultad, en especial a Karina y Francisca, que con gentileza siempre estuvieron dispuestas a colaborar y brindar información en todas las gestiones administrativas y académicas.

A mis compañeros del doctorado, Esteban Palacios, Valentina Carrasco y Paulina Villar por su cariño y “apañe” durante mi estadía en Chile. Compartir un almuerzo, una cerveza o un “matecito” con ustedes siempre fue un respiro entre las exigencias del doctorado.

A la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, en especial al programa de “Relevo Docente” por estar siempre pendiente de mí y por su apoyo para complementar mi estadía en Chile.

A mis “roomies”, Gabo y Pablo por su amistad y todo su cariño. Fueron por varios años mi familia en Chile.

Agradezco a mi familia por su amor incondicional. A mis padres por su apoyo constante y palabras de ánimo en cada momento. A mis hermanos por estar siempre pendientes de mí, aún a la distancia. A mi sobrino, por alegrarme cada vez con sus ocurrencias y chistes de hormigas.

Por último, agradezco a Chile por recibirme y acogerme durante estos cinco años. Conocí lugares y personas maravillosas, siempre los tendré en mi corazón.

Financiamiento

El desarrollo de esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares (LTSM), el cual pertenece al Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de las siguientes instituciones:

1. Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Chile:
 - Beca Doctorado Nacional 21171588 (JOQ)
 - Proyecto FONDECYT 1181147 (RC/SL). FONDECYT 1200490 (SL)
 - Proyecto FONDAP 15130011 (SL/LG)
2. Programa de Financiamiento de Movilidades y Becas Internacionales “Relevo Docente”, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH).

Divulgación científica de esta Tesis

Publicaciones

- Troncoso MF*, **Ortiz-Quintero J***, Garrido-Moreno V, Sanhueza-Olivares F, Guerrero-Moncayo A, Chiong M, Castro PF, García L, Gabrielli L, Corbalán R, Garrido-Olivares L, Lavandero S. VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *BBA Mol Basis Dis*, **2021**. DOI: 10.1016/j.bbadis.2021.166170 ***Equal contribution**.
- Morales PE, Monsalves-Álvarez M, Tadinada SM, Harris MP, Ramírez-Sagredo A, **Ortiz-Quintero J**, Troncoso MF, De Gregorio N, Calle X, Pereira RO, Lira VA, Espinosa A, Abel ED, Lavandero S. Skeletal muscle type-specific mitochondrial adaptation to high-fat diet relies on differential autophagy modulation. *FASEB J*, **2021**. DOI: 10.1096/fj.202001593rr
- Ramírez-Sagredo A, Quiroga C, Garrido-Moreno V, López-Crisosto C, Leiva-Navarrete S, Norambuena-Soto I, **Ortiz-Quintero J**, Díaz-Vesga MC, Perez W, Hendrickson T, Parra V, Pedrozo Z, Altamirano F, Chiong M, Lavandero S. Polycystin-1 regulates cardiomyocyte mitophagy. *FASEB J*, **2021**. DOI: 10.1096/fj.202002598r
- Jiménez JM, Salazar M, Arancibia S, Villar J, Salazar F, Brown GD, Lavelle EC, Martínez-Pomares L, **Ortiz-Quintero J**, Lavandero S, Manubens A and Becker MI. TLR4, but neither Dectin-1 nor Dectin-2, participates in the mollusk hemocyanin-induced proinflammatory effects in antigen-presenting cells from mammals. *Front Immunol*, **2019**. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01136
- Alemán L, Ramírez-Sagredo A, **Ortiz-Quintero J**, Lavandero S. Diabetes mellitus tipo 2 y cardiopatía isquémica: fisiopatología, regulación génica y futuras opciones terapéuticas. *Rev Chil Cardiol*, **2018**. DOI: 10.4067/S0718-85602018000100042

Presentaciones en congresos

- Silva-Agüero JF, Aliaga-Tobar V, Calle X, **Ortiz-Quintero J**, Latorre M, Parra V. BCL6: a novel transcription factor involved in cardiac hypertrophy revealed through human transcriptional regulatory networks. XLV Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2022 November 22-25; Cuncumén, Chile.
- **Ortiz-Quintero J**, Troncoso MF, Corbalán R, García L, Lavandero S. VCAM-1 mediates the protective effect of TNF- α preconditioning against ischemia/ reperfusion injury in cultured cardiomyocytes. XLIV Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2021 October 26-28; Santiago, Chile.

- Jiménez-Gallegos D, **Ortiz-Quintero J**, Ávalos-Guajardo Y, Jara-Guajardo P, Kogan M, Lavandero S, Morales-Zavala F. Antifibrogenic tannic acid-modified gold nanoparticles for heart targeting and delivery. XLIV Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2021 October 26-28; Santiago, Chile.
- **Ortiz-Quintero J**, Troncoso MF, Corbalán R, García L, Lavandero S. VCAM-1 expression mediates the protective effect of TNF- α preconditioning against ischemia/ reperfusion injury in cultured cardiomyocytes. Video poster. XXXV Annual Meeting of the Chilean Physiological Sciences Society (SCHCF); 2020 November 16-20; On-line.
- Troncoso MF, **Ortiz-Quintero J**, Garrido-Moreno V, Muñoz-Cordova F, Calle-Chalco X, Sanhueza-Olivares F, de Gregorio N, Silva D, Garcia L, Corbalán R, Lavandero S. Role of cardiac VCAM-1 in experimental diabetic cardiomyopathy. Video poster. XXXV Annual Meeting of the Chilean Physiological Sciences Society (SCHCF); 2020 November 16-20; On-line.
- **Ortiz-Quintero J**, Troncoso MF, Garrido-Moreno V, López-Crisosto C, Corbalán R, Lavandero S, García L. TNF- α preconditioning induces cardiomyocytes VCAM-1 expression and protection against ischemia/reperfusion injury. XLII Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBMCh); 2019 October 08-11; Iquique, Chile.
- Troncoso MF, **Ortiz-Quintero J**, Morales PE, Corbalán R, Lavandero S. Cardiac VCAM-1 expression is increased both in *in vitro* and *in vivo* inflammation models. XLII Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBMCh); 2019 October 08-11; Iquique, Chile.
- Ramírez-Sagredo A, Ávalos Y, López-Crisosto C, **Ortiz-Quintero J**, Altamirano F, Pedrozo Z, Chiong M, Lavandero S. Down regulation of polycystin-1 induces mitochondrial dysfunction and hypertrophy in cultured cardiomyocytes. XLII Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBMCh); 2019 October 08-11; Iquique, Chile.
- **Ortiz-Quintero J**, Lavandero S, García L. TNF- α preconditioning stimulate VCAM-1 expression and protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. XXXIII Annual Meeting of the Chilean Physiological Sciences Society; 2018 August 28-31; Reserva Ecológica Huilo Huilo, Chile.
- Ramírez-Sagredo A, López-Crisosto C, **Ortiz-Quintero J**, Pedrozo Z, Ocaranza MP, Chiong M, Lavandero S. Polycystin-1 regulates cardiomyocyte mitochondrial dynamic and survival. XXXIII Annual Meeting of the Chilean Physiological Sciences Society; 2018 August 28-31; Reserva Ecológica Huilo Huilo, Chile.

Índice de Figuras

Figura 1. Proteína VCAM-1 en un contexto inflamatorio.	18
Figura 2. Señalización de TNF- α a través de TNFR2.	23
Figura 3. Hipótesis de trabajo.	26
Figura 4. Diseño experimental utilizado en esta tesis.	39
Figura 5. Efecto de TNF- α en la viabilidad de cardiomiocitos de rata.	42
Figura 6. Efecto de TNF- α en la expresión de proteína de VCAM-1 en el cardiomiocito.	44
Figura 7. Efecto de TNF- α en la expresión de mRNA de VCAM-1 en el cardiomiocito.	46
Figura 8. Efecto de TNF- α en la estabilidad del mRNA de VCAM-1 en el cardiomiocito.	47
Figura 9. Efecto de la inhibición de la transcripción y la traducción en la expresión de la proteína VCAM-1 inducida por TNF- α	48
Figura 10. Efecto de TNF- α en la activación de vías de señalización asociadas a sobrevida en el cardiomiocito.	50
Figura 11. Silenciamiento de receptores de TNF- α en los cardiomiocitos.	52
Figura 12. Efecto del TNF- α y del silenciamiento de los TNFRs en los niveles de mRNA de VCAM-1 y TNF- α	53
Figura 13. Inhibición de STAT3 y viabilidad celular de los cardiomiocitos.	55
Figura 14. Efecto de la inhibición de STAT3 en la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito.	56
Figura 15. Viabilidad celular por reducción de MTT posterior a I/R simulada en cardiomiocitos precondicionados con TNF- α	59
Figura 16. Viabilidad celular de cardiomiocitos posterior al precondicionamiento por 24 h e I/R simulada.	60
Figura 17. Silenciamiento de VCAM-1 en los cardiomiocitos.	62
Figura 18. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la cardioprotección frente I/R en cardiomiocitos precondicionados con TNF- α	64
Figura 19. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes proinflamatorios en cardiomiocitos precondicionados con TNF- α	66
Figura 20. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes asociados con la respuesta antioxidante en cardiomiocitos precondicionados con TNF- α	67
Figura 21. Modelo final. Proteína VCAM-1 en la sobrevida del cardiomiocito precondicionado con TNF- α frente el daño por isquemia/reperfusión.	¡Error! Marcador no definido.

Índice de Figuras anexas

Figura anexa 1. Fraccionamiento subcelular y detección de proteína VCAM-1 en el cardiomiocito.	83
Figura anexa 2. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes relacionados con hipertrofia en cardiomiocitos precondicionados con TNF- α	84

Índice de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis.....	33
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.	34
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo de tesis.	36
Tabla 4. siRNAs utilizados en esta tesis.....	37

Abreviaturas, siglas y acrónimos

ADAM	: Adamalisin (del inglés, "a desintegrin and metalloproteases")
ADAM17	: Adamalislina-17
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
Akt	: Proteína quinasa B
ANOVA	: Análisis de varianza
AP-1	: Proteína activadora 1
ATP	: Trifosfato de adenosina
CAT	: Catalasa
cDNA	: DNA complementario
cIAP	: Inhibidores celulares de proteínas apoptóticas
CICUAL	: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CIE-X	: Clasificación Internacional de Enfermedades, décima versión
DD	: Domino de muerte
ECVs	: Enfermedades cardiovasculares
ERK1/2	: Proteínas p44/42 MAPK
FADD	: Proteína del DD asociada a Fas
FoxO1	: Factor "Forkhead Box O1"
GAPDH	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HO-1	: Hemooxigenasa-1
I/R	: Isquemia/reperfusión
IAM	: Infarto agudo del miocardio
Ig	: Inmunoglobulina
I κ B α	: Inhibidor de NF- κ B
IKK	: Quinasa de inhibidores de NF- κ B
IL-6	: Interleuquina 6
JAK	: Quinasas Janus
KATP	: Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP
LDH	: Lactato deshidrogenasa
LDL α	: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPS	: Lipopolisacárido
MAPK	: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	: Matriz extracelular
MPTP	: Poro mitocondrial de permeabilidad transitoria
mRNA	: ARN mensajero

mTNF	: Forma de TNF- α asociado a membrana
NF-kB	: Factor nuclear kB
Nfr2	: Factor nuclear eritroide relacionado con el factor 2
NIH	: Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos
NIK	: Quinasa inductora de NF-kB
OMS	: Organización Mundial de la Salud
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	: Proteína quinasa C
RIPK1	: Proteína de interacción con receptores 1
RISK	: Vía "Reperfusion Injury Salvage Kinase"
RNA	: Ácido ribonucleico
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	: PCR en tiempo real con transcripción reversa
SAFE	: Vía "Survivor Activating Factor Enhancement"
SEM	: Error estándar medio
siRNA	: ARN interferentes pequeños
SOD2	: Superóxido dismutasa 2
STAT3	: Transductor de señal y activador de la transcripción 3
sTNF	: Forma soluble del TNF- α
sVCAM-1	: Forma soluble de la proteína VCAM-1
TACE	: Enzima convertidora de TNF- α
TAK1	: Proteína quinasa 1 activada por TGF- β
TGF- β 1	: Factor de crecimiento transformante beta 1
TNFR1	: Receptor 1 de TNF- α
TNFR2	: Receptor 2 de TNF- α
TNFRs	: Receptores de TNF- α
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral alfa
TRADD	: Proteína del DD asociada al TNFR1
TRAF	: Factores asociados a los TNFRs
VCAM-1	: Proteína de adhesión celular vascular 1

1. Resumen

Antecedentes: Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de mortalidad en Chile y el mundo, a expensas principalmente de las enfermedades isquémicas del corazón. Diferentes mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la proteína de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), desempeñan un papel clave en el desarrollo y complicaciones de las ECV. Se ha descrito que TNF- α causa muerte celular por apoptosis en diferentes tipos celulares. Sin embargo, paradójicamente esta citoquina a bajas concentraciones genera preconditionamiento y cardioprotección frente el daño por hipoxia o isquemia/reperfusión. Se ha propuesto que esta acción disímil podría ser mediada por diferentes receptores, el receptor 2 de TNF- α (TNFR2) se asocia a sobrevida celular y tiene un papel cardioprotector en los efectos del preconditionamiento cardíaco.

Por otro lado, VCAM-1 se expresa en diversos tejidos y tipos celulares, su función se ha estudiado principalmente en el endotelio vascular. VCAM-1 está involucrada en la transmigración leucocitaria, diferenciación muscular, proliferación celular y en el desarrollo del corazón. La expresión de VCAM-1 se puede inducir por citoquinas proinflamatorias, altos niveles de especies reactivas del oxígeno y lipoproteínas de baja densidad oxidadas, entre otros. Dicha inducción es canónicamente mediada por el factor transcripcional NF- κ B. Sin embargo, la función y los mecanismos de regulación de VCAM-1 en el cardiomiocito se conocen escasamente. Estudios previos de nuestro Laboratorio mostraron que VCAM-1 se asocia a sobrevida en un modelo de isquemia simulada en cardiomiocitos.

Hipótesis de trabajo: “TNF- α , a bajas concentraciones y a través de la vía de señalización TNFR2/JAK2/STAT3, estimula la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito como mecanismo de protección frente el daño por isquemia/reperfusión simulada”.

Objetivos específicos: 1) Determinar el efecto de TNF- α sobre la expresión de la proteína y mRNA de VCAM-1 en los cardiomiocitos; 2) Evaluar si la expresión de VCAM-1 estimulada por TNF- α depende del receptor TNFR2 y la vía de señalización JAK2/STAT3 en los cardiomiocitos; 3) Examinar si la proteína VCAM-1 media el efecto protector frente el daño por isquemia/reperfusión simulada en cardiomiocitos preconditionados con TNF- α .

Diseño experimental y metodologías: Todos los experimentos se realizaron en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata estimulados con TNF- α recombinante de rata. Se evaluó viabilidad celular por ensayo de reducción de MTT, incorporación de azul de tripán y niveles intracelulares de ATP. Se midieron niveles relativos de mRNA de *VCAM-1*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TNF- α* , *IL-6*, *Nfr2*, *SOD2*, *HO-1* y *CAT* por RT-qPCR. Los niveles de proteínas totales y fosforiladas de VCAM-1, NF- κ B, STAT3, Akt y ERK1/2 se determinaron por Western blot. La biosíntesis *de novo* de VCAM-1 se evaluó mediante la inhibición farmacológica de la transcripción y la traducción. La estabilidad del mRNA de VCAM-1 se determinó midiendo el mRNA remanente después del tratamiento con actinomicina-D. El papel de los receptores TNFR1/TNFR2 en la expresión de VCAM-1 se evaluó mediante el silenciamiento de estos receptores con siRNA y la medición de los niveles de mRNA por RT-qPCR. El papel de la vía JAK2/STAT3 en la expresión de VCAM-1 se evaluó utilizando inhibidores farmacológicos de la vía y la medición de los niveles proteicos totales y fosforilados de VCAM-1 y STAT3 por Western blot. El efecto cardioprotector del preconditionamiento con TNF- α se evaluó con un ensayo de isquemia/reperfusión (I/R) simulada. Se evaluó muerte por necrosis por ensayo de actividad de LDH. El papel de VCAM-1 en la cardioprotección inducida por TNF- α se evaluó mediante el silenciamiento con siRNA previo al ensayo de isquemia/reperfusión simulada. El efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes asociados a supervivencia celular y cardioprotección se evaluó midiendo niveles de mRNA de estos genes por RT-qPCR.

Resultados: El tratamiento con TNF- α a concentraciones < 100 ng/mL no estimula muerte significativa de los cardiomiocitos. TNF- α a concentraciones entre 10 – 100 ng/ mL aumenta los niveles proteicos de VCAM-1 después de 6 h de tratamiento. De igual manera, TNF- α aumenta los niveles de mRNA de VCAM-1 en los cardiomiocitos. La inhibición de la transcripción y la traducción reducen los niveles proteicos de VCAM-1 y TNF- α no altera la estabilidad del mRNA de VCAM-1, lo que sugiere que TNF- α aumenta la expresión de VCAM-1 a través de un mecanismo transcripcional. Por otro lado, TNF- α estimula la activación de NF-kB, STAT3, Akt y ERK1/2, vías de señalización asociadas con sobrevida y cardioprotección. Nuestros datos sugieren que la expresión de VCAM-1 es dependiente del receptor TNFR1 y no del TNFR2. Además, nuestros datos sugieren que la vía JAK2/STAT3 participa en la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito. Finalmente, el tratamiento con TNF- α a concentraciones de 10 ng/mL por al menos 6 h provee protección a los cardiomiocitos frente el daño por I/R. La proteína VCAM-1 media el efecto protector del preconditionamiento con TNF- α frente el daño por I/R en los cardiomiocitos. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de VCAM-1 en los cardiomiocitos reduce la expresión de TNF- α , IL-6 y SOD2, genes asociados a sobrevida y cardioprotección frente estrés oxidativo. Lo que sugiere que VCAM-1 podría ser un regulador positivo de SOD2 y de esta forma activar la respuesta antioxidante como mecanismo de cardioprotección frente el daño por I/R.

Conclusiones: Se rechazó la hipótesis planteada en este estudio y se concluye que TNF- α a concentraciones de 10 ng/mL estimula la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito como mecanismo protector frente el daño por isquemia/reperfusión, a través de la vía de señalización TNFR1/JAK2/STAT3. Sin embargo, nuestros datos no son suficientes para concluir si VCAM-1 activa la respuesta antioxidante como mecanismo de cardioprotección frente el daño por isquemia/reperfusión.

2. Abstract

VCAM-1 protein in the survival of cardiomyocytes preconditioned with TNF- α against ischemia/reperfusion injury.

Background: Cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of mortality in Chile and worldwide, mainly at the expense of ischemic heart diseases. Different proinflammatory mediators, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1), play a key role in the development and complications of CVD. TNF- α has been reported to cause cell death by apoptosis in different cell types. However, paradoxically, this cytokine at low concentrations generates preconditioning and cardioprotection against damage by hypoxia or ischemia/reperfusion. It has been proposed that this dissimilar action could be mediated by different receptors. TNF- α receptor 2 (TNFR2) is associated with cell survival and has a cardioprotective role in the effects of cardiac preconditioning.

On the other hand, VCAM-1 is expressed in various tissues and cell types, its function has been studied mainly in the vascular endothelium. VCAM-1 is involved in leukocyte transmigration, muscle differentiation, cell proliferation, and heart development. VCAM-1 expression can be induced by proinflammatory cytokines, high levels of reactive oxygen species, and oxidized low-density lipoproteins, among others. This induction is canonically mediated by the transcriptional factor NF- κ B. However, the function and regulatory mechanisms of VCAM-1 in the cardiomyocyte are poorly understood. Previous studies from our Laboratory showed that VCAM-1 is associated with survival in a model of simulated ischemia in cardiomyocytes.

Hypothesis: "TNF- α , at low concentrations and through the TNFR2/JAK2/STAT3 signaling pathway, stimulates the expression of cardiomyocyte VCAM-1 as a protective mechanism against damage by ischemia/ simulated reperfusion".

Specific aims: 1) To determine the effect of TNF- α on the expression of the protein and mRNA of VCAM-1 in cardiomyocytes; 2) To assess whether the expression of VCAM-1 stimulated by TNF- α depends on the TNFR2 receptor and the JAK2/STAT3 signaling pathway in cardiomyocytes; 3) To examine whether the VCAM-1 protein mediates the protective effect against simulated ischemia/reperfusion damage in cardiomyocytes preconditioned with TNF- α .

Experimental design and methodologies: All experiments were performed on primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes stimulated with recombinant rat TNF- α . Cell viability was evaluated by MTT reduction assay, trypan blue incorporation and intracellular ATP levels. Relative mRNA levels of *VCAM-1*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TNF- α* , *IL-6*, *Nfr2*, *SOD2*, *HO-1*, and *CAT* were measured by RT-qPCR. Total and phosphorylated protein levels of VCAM-1, NF- κ B, STAT3, Akt, and ERK1/2 were determined by Western blot. VCAM-1 de novo biosynthesis was assessed by pharmacological inhibition of transcription and translation. The stability of VCAM-1 mRNA was determined by measuring the mRNA remaining after treatment with actinomycin-D. The role of TNFR1/TNFR2 receptors in VCAM-1 expression was assessed by silencing these receptors with siRNA and measuring mRNA levels by RT-qPCR. The role of the JAK2/STAT3 pathway in VCAM-1 expression was assessed using pharmacological inhibitors of the pathway and measurement of total and phosphorylated VCAM-1 and STAT3 protein levels by Western blot. The cardioprotective effect of TNF- α preconditioning was assessed with a *in vitro* ischemia/reperfusion (I/R) assay. Cell death by necrosis was evaluated by LDH activity assay. The role of VCAM-1 in TNF- α -induced cardioprotection was assessed by siRNA silencing prior to the ischemia/reperfusion assay. The effect of VCAM-1 silencing on the expression of genes associated

with cell survival and cardioprotection was evaluated by measuring mRNA levels of these genes by RT-qPCR.

Results: Treatment with TNF- α at concentrations <100 ng/mL does not stimulate significant cardiomyocyte death. TNF- α at concentrations between 10 – 100 ng/mL increases VCAM-1 protein levels after 6 h of treatment. Similarly, TNF- α increases VCAM-1 mRNA levels in cardiomyocytes. Inhibition of transcription and translation reduces VCAM-1 protein levels and TNF- α does not alter VCAM-1 mRNA stability, suggesting that TNF- α increases VCAM-1 expression through a mechanism transcriptional. On the other hand, TNF- α stimulates the activation of NF- κ B, STAT3, Akt and ERK1/2, signaling pathways associated with survival and cardioprotection. Our data suggest that VCAM-1 expression is dependent on the TNFR1 receptor and not on TNFR2. Furthermore, our data suggest that the JAK2/STAT3 pathway is involved in the expression of VCAM-1 in the cardiomyocyte. Finally, treatment with TNF- α at concentrations of 10 ng/mL for at least 6 h provides protection to cardiomyocytes against I/R damage. The VCAM-1 protein mediates the protective effect of TNF- α preconditioning against I/R damage in cardiomyocytes. Our results show that the silencing of VCAM-1 in cardiomyocytes reduces the expression of TNF- α , IL-6 and SOD2, genes associated with survival and cardioprotection against oxidative stress. This suggests that VCAM-1 could be a positive regulator of SOD2 and thus activate the antioxidant response as a cardioprotective mechanism against I/R damage.

Conclusions: The hypothesis proposed in this study was rejected and it is concluded that TNF- α at concentrations of 10 ng/mL stimulates the expression of VCAM-1 in the cardiomyocyte as a protective mechanism against ischemia/reperfusion damage, through the TNFR1/JAK2/STAT3 signaling pathway. However, our data are not sufficient to conclude whether VCAM-1 activates the antioxidant response as a cardioprotective mechanism against ischemia/reperfusion damage.

3. Introducción

Enfermedades cardiovasculares

Este proyecto de tesis se enmarca en un conjunto de enfermedades crónicas denominadas enfermedades cardiovasculares (ECVs), las cuales son causadas por trastornos del corazón y/o vasos sanguíneos (1). Según la décima versión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-X) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre las enfermedades del aparato circulatorio se incluyen: cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, hipertensivas, vasculopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas e insuficiencia cardíaca (1).

Las ECV han sido, por décadas, la principal causa de mortalidad en Chile y a nivel mundial. Cada año mueren más personas de las ECVs que por otras causas. La OMS ha estimado que cada año mueren 17.9 millones de personas por esta causa, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. Más del 75% de las defunciones por ECVs se produjeron en los países de ingresos bajos y medios (1). Las cifras son alarmantes, sin embargo, no se debe olvidar que la mayoría de las ECVs se pueden prevenir si se actúa sobre los factores de riesgo como el consumo de tabaco, dietas no saludables, obesidad, inactividad física, consumo nocivo de alcohol, manejo de la presión arterial, entre otros; utilizando estrategias de salud pública que tengan impacto en toda la población (2).

Las ECVs, fundamentalmente la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular son una de las causas principales de mortalidad y discapacidad en la Región de las Américas (3). En Chile en el 2016, estas patologías representaron un 27,1% del total de defunciones, a expensas principalmente de los eventos cerebrovasculares (46,4/100.000 habitantes) y del infarto agudo del

miocardio (44,8/100.000 habitantes) (4). Los mecanismos que subyacen en la patogénesis de las ECVs no son del todo conocidos. No obstante, es bien aceptado que la inflamación crónica de bajo grado desempeña un papel clave en el desarrollo y las complicaciones de diversas ECVs.

Proteína de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1)

VCAM-1 es un integrante de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) (5). Desde el punto de vista estructural, es una proteína transmembrana del tipo I, N-glicosilada y formada básicamente por tres regiones: a) región extracelular, que corresponde a repeticiones de dominios tipo Ig, lo que da lugar a diferentes variantes de esta proteína en el humano y en otras especies de mamíferos. Estas variantes son producto del corte y empalme alternativo; b) un único dominio transmembrana del tipo I; y c) dominio citoplásmico en el carboxilo terminal que es conservado en diferentes especies de mamíferos (5).

VCAM-1 se expresa en diversos tejidos y tipos celulares (5, 6). Sin embargo, su función canónica se ha estudiado principalmente en el endotelio vascular (7, 8) y se asocia a inflamación, trans migración leucocitaria, diferenciación muscular, proliferación celular, entre otras (9, 10) (**Figura 1**).

Regulación transcripcional del gen de *VCAM-1*

La expresión del gen de *VCAM-1* puede ser inducida por componentes microbianos como lipopolisacárido (LPS), citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1), altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox), entre otros (5, 11, 12). La vía

clásica de activación de VCAM-1 en las células endoteliales y fibroblastos cardíacos está regulada por el factor nuclear-kB (NF-kB) (5). Sin embargo, su expresión también puede ser regulada por otros factores transcripcionales, tales como la proteína activadora-1 (AP-1) y el factor “Forkhead Box O1” (FoxO1) (13, 14). Hasta la fecha no se ha estudiado la participación de estos factores transcripcionales en la regulación de VCAM-1 específicamente en el cardiomiocito (**Figura 1**).

Regulación post-traducciona1 de VCAM-1

Diferentes estudios han mostrado que VCAM-1 es blanco de un grupo de enzimas con dominios desintegrinas/metaloproteinasas denominadas adamalinas (ADAMs), principalmente la adamalina-17 (ADAM17) (15). De esta manera se genera una forma soluble de la proteína VCAM-1 (sVCAM-1), la que contrarresta la adhesión de leucocitos al endotelio y así regula la respuesta inflamatoria (16, 17) (**Figura 1**). sVCAM-1 se detecta en el plasma sanguíneo humano y de otros mamíferos y su aumento en el plasma se correlaciona con patologías como aterosclerosis, artritis reumatoide, fibrosis pulmonar, fibrilación auricular, entre otras (8, 12, 18, 19). El aumento de sVCAM-1 puede ser producto de un exceso en la expresión o a un incremento en su liberación por acción de las proteasas ADAMs. La forma soluble de VCAM-1 se ha utilizado como biomarcador para predecir la incidencia y/o mortalidad de ECVs como la fibrilación auricular (19).

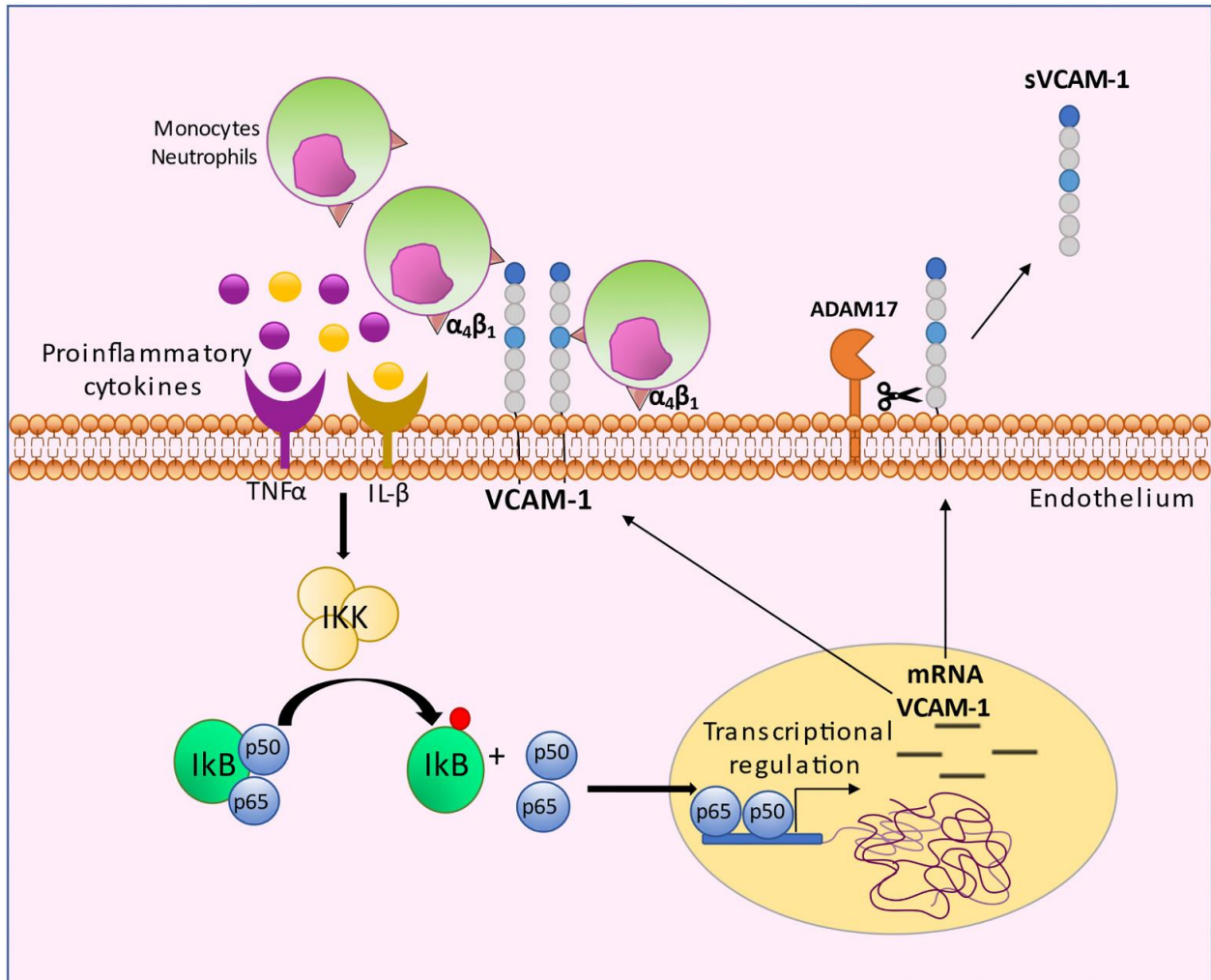


Figura 1. Proteína VCAM-1 en un contexto inflamatorio. Imagen reproducida de Troncoso et al (19).

VCAM-1 cardíaco

Se ha descrito que, durante la inflamación, VCAM-1 participa en la adhesión de leucocitos al endotelio vascular y su sobre expresión se ha asociado con daño cardíaco. Sin embargo, existen antecedentes que sugieren una función diferente de VCAM-1 en el corazón: a) ratones carentes en forma global del gen VCAM-1 no son viables, presentan defectos en el desarrollo de la placenta y diversas anomalías en el desarrollo del corazón (20); b) la delección del ligando canónico de

VCAM-1, la integrina $\alpha 4$, produce defectos similares (21); c) VCAM-1 participa en la diferenciación de células musculares (22); d) En diferentes modelos, esta proteína de adhesión promueve la fusión celular (23); e) La interacción con su ligando integrina $\alpha 4\beta 1$ participa en la inervación simpática del corazón (24); f) VCAM-1 se utiliza como marcador de diferenciación de cardiomiocitos obtenidos a partir de células troncales humanas (25).

La función y los mecanismos de regulación de VCAM-1 en el cardiomiocito son desconocidos. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo (Tesis de doctorado de Ariel Díaz, Universidad de Chile) mostraron que esta proteína se asocia a sobrevida celular en un modelo de isquemia simulada en cardiomiocitos de ratas neonatas y que esta función cardioprotectora estaría mediada por la proteína quinasa Akt (Akt) (26). Sin embargo, el mecanismo por el cual la proteína VCAM-1 ejerce su función cardioprotectora es aún desconocido.

Precondicionamiento como mecanismo de cardioprotección

El preconditionamiento tiene dos fases de protección; la primera fase ocurre 1-3 h después del estímulo de preconditionamiento (27), es de naturaleza temporal y se atribuye a la modificación postraduccional de proteínas preexistentes en el tejido (28). La segunda fase ocurre 18-24 h después del estímulo y dura por aproximadamente 48 h, en esta etapa se favorece la inducción de proteínas citoprotectoras (29). La fase temprana de protección es inducida a través de la mitocondria donde la señalización por ROS activa diversas proteínas como Akt, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) p44/42 (ERK1/2) y proteína quinasa C (PKC) (30). La protección tardía se debe a la activación de factores transcripcionales por estas proteínas quinasas, así como también el reclutamiento de vías de señalización de sobrevida para atenuar el tamaño del infarto (31).

Las vías de señalización de sobrevida actúan de forma paralela para lograr el efecto cardioprotector, se han descrito tres vías principales. La primera, es la activación de PKC que resulta en la apertura de los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) (30). La segunda, es la vía “Reperfusion Injury Salvage Kinase” (RISK) la cual es activada por receptores acoplados a proteínas G y actúa a través de diversas proteínas quinasas asociadas con sobrevida, incluyendo Akt y ERK1/2 (32). Y la tercera, es la vía “Survivor Activating Factor Enhancement” (SAFE) que es activada por diversas citoquinas como interleuquina-6 (IL-6) y TNF- α y actúa mediante las proteínas quinasas JAK y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (33). El efecto conjunto de estas vías es mitigar los daños celulares al preservar la función mitocondrial a través de la inhibición del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (MPTP), la apertura de los canales K_{ATP} mitocondriales y la inhibición de factores apoptóticos (30).

Factor de necrosis tumoral alfa

TNF- α es una citoquina proinflamatoria que participa en el inicio y mantención de la inflamación (34) y se conoció inicialmente como una citoquina inductora de muerte por apoptosis (35). Actualmente, se sabe que regula diversos procesos celulares como ser respuesta inmune, proliferación, crecimiento y diferenciación celular (35). Es una citoquina ubicua dado que diversas células pueden producirla y secretarla. Incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos, células de la musculatura lisa, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales y osteoblastos (36).

TNF- α es una proteína transmembrana de tipo II, conformada de 233 aminoácidos, masa molecular de 26 kDa y que existe principalmente en forma trimérica. El TNF- α asociado a la membrana (mTNF- α) puede ser procesado proteolíticamente por la enzima convertidora de TNF- α (TACE) o también denominada ADAM17 (36). La acción de TACE sobre el mTNF- α genera

una forma soluble de 17 kDa (sTNF- α), la cual mantiene la actividad biológica de la citoquina (37). El TNF- α está involucrado en la fisiopatología de diversas ECVs, incluyendo el infarto del miocardio, insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial y aterosclerosis (38). Además, se ha descrito un incremento crónico en el nivel basal de TNF- α circulante en patología como artritis reumatoide, osteoporosis, sepsis y cáncer (35, 36).

Transducción de señales por TNF- α

TNF- α ejerce sus efectos biológicos al interactuar con dos subtipos de receptores (TNFRs): el receptor 1 de TNF- α (TNFR1) y el receptor 2 de TNF- α (TNFR2). sTNF- α solo puede activar eficientemente al TNFR1, mientras que el mTNF- α se puede unir y activar a ambos subtipos de receptores (37). El TNFR1 es una proteína de 55 kDa, presenta un dominio de muerte (dominio DD) en su región intracelular y se expresa en casi todos los tipos celulares. TNFR2 es una proteína de 75 kDa que se expresa en un número limitado de células. A diferencia del TNFR1, el TNFR2 no posee un dominio DD en su región intracelular. De forma general, TNFR1 media la muerte celular por apoptosis o necroptosis (35, 39), mientras que TNFR2 se asocia con protección y supervivencia (40–42). Se ha descrito que el subtipo TNFR2 media la protección de cardiomiocitos y neuronas frente al daño isquémico (43, 44).

La unión del TNF- α al TNFR1 estimula la trimerización de los receptores y sus dominios DD con la subsecuente formación de dos complejos de señalización diferentes. El complejo I promueve la expresión de genes proinflamatorios y la supervivencia celular, mientras que el complejo II gatilla procesos de muerte celular (45). Luego de la unión del TNF- α , el dominio DD del TNFR1 recluta a la proteína del dominio de muerte asociada al TNFR1 (TRADD). Esta proteína genera una plataforma para el reclutamiento de los factores asociados a los receptores de TNF- α

(TRAF2 y TRAF5) y la proteína serina/treonina quinasa de interacción con receptores 1 (RIPK1) (45). Posteriormente, las proteínas TRAF reclutan a los inhibidores celulares de proteínas apoptóticas (cIAP1 y cIAP2) para completar la formación del complejo I y junto con otras proteínas conducen a la activación de la proteína quinasa 1 activada por TGF- β (TAK1) y la quinasa de inhibidores de NF- κ B (IKK) y, consecuentemente, factores transcripcionales como AP-1 y NF- κ B (46). Luego de la activación del TNFR1, el receptor puede sufrir un proceso endocítico que implica alteración en su conformación y modificación de las proteínas adaptadoras con las que interacciona. Bajo estas condiciones, RIPK1 junto con RIPK3, TRADD, proteína del dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y procaspasa-8 forman el complejo II. Finalmente, este complejo puede conducir a apoptosis o necroptosis dependiendo de la inactivación de RIPK1/3 o la inhibición de caspasas, respectivamente (37).

Por otro lado, cuando el TNF- α se une al TNFR2 provoca la trimerización de los receptores y la interacción directa con TRAF2 (**Figura 2**). A continuación, se unen las proteínas TRAF1 y TRAF3, cIAP1, cIAP2 a través de la unión con TRAF2. La **Figura 2** muestra que este complejo induce la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- κ B. TNFR2 induce tanto la vía canónica y no canónica de activación de NF- κ B a través de la activación de vías de las MAPK y degradación del inhibidor de NF- κ B (conocido como I κ B α) o activación de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK), respectivamente (37).

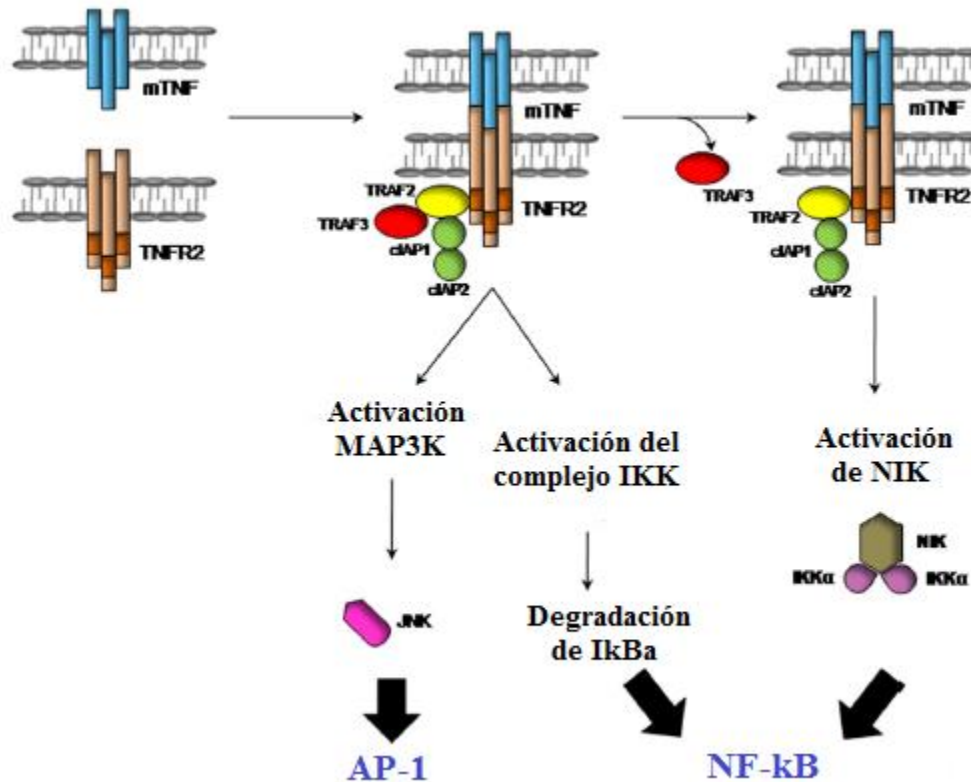


Figura 2. Señalización de TNF- α a través de TNFR2. Imagen modificada de Cabal-Hierro et al. (37).

Efectos de TNF-alfa en el corazón

Como se describió anteriormente, el TNF- α se produce principalmente por células del sistema inmune y no se expresa en el tejido cardíaco normal (47, 48). Sin embargo, diversas investigaciones han mostrado que tanto lesiones y estados inflamatorios propios del corazón como el infarto agudo del miocardio (IAM) y ciertas condiciones patológicas como sepsis, miocarditis viral e insuficiencia cardíaca (49) pueden promover la producción de TNF- α tanto en macrófagos miocárdicos como en los cardiomiocitos (36).

TNF- α se considera cardiotóxico (50) pues estudios *in vitro* han mostrado que suprime la contractilidad cardíaca (51, 52), estimula el desarrollo de hipertrofia cardíaca (53) e induce

apoptosis del cardiomiocito (39). También tiene efectos directos sobre la estructura de la matriz extracelular (MEC) y el colágeno y se ha asociado con el desarrollo del remodelado cardíaco, por lo cual desempeña un papel importante en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca (39, 48). Sin embargo, evidencias de estudios clínicos sugieren que ni el uso del receptor soluble de TNF- α o anticuerpos neutralizantes de esta citoquina resultaron beneficiosos para los pacientes con insuficiencia cardíaca, ambas terapias mostraron resultados desfavorables y en algunos casos empeoraron la situación clínica de los pacientes (47). Estos hallazgos sugieren que el TNF- α podría no ser exclusivamente tóxico, pero ser parcialmente protector en las ECVs (40).

No obstante, hay condiciones en las cuales niveles bajos de TNF- α protegen al cardiomiocito de la exposición posterior a cierto tipo de daños. A este efecto protector se ha denominado “precondicionamiento” por TNF- α , observándose cardioprotección ante la hipoxia o la isquemia/reperfusión (I/R) (34, 47). Se han postulado algunos mecanismos por los cuales el preconditionamiento por TNF- α podría conferir cardioprotección. TNF- α a través de su receptor TNFR2 desempeña un papel en los efectos cardioprotectores del preconditionamiento (34). Algunas evidencias sugieren que el preconditionamiento por bajas concentraciones de esta citoquina incrementaría el desprendimiento del dominio extracelular de los receptores de TNF- α , generando sus formas solubles y que los niveles del receptor soluble TNFR2 exceden los de TNFR1 (47). También se ha descrito que TNF- α protege contra el daño por hipoxia mediante la activación de proteína kinasa A (PKA) y del fosfolambán para prevenir la sobrecarga de calcio en cardiomiocitos de ratas neonatas (54).

Ambos receptores de TNF- α se expresan en los cardiomiocitos. Además, los dominios citoplasmáticos de ambos receptores son diferentes y activan vías de señalización intracelulares distintas o que en algunos casos se solapan. A pesar de que la mayoría de las funciones biológicas

de TNF- α en el corazón ocurren por señalización a través del TNFR1, se sabe muy poco sobre la función del TNFR2 en las células cardíacas.

En resumen, la inflamación sistema desempeña un papel clave en el desarrollo y complicaciones de las ECVs y que TNF- α presenta una acción dual: muerte-sobrevida. Diferentes estímulos pro-inflamatorios inducen la expresión de VCAM-1 y esta proteína ejerce funciones no canónicas en el cardiomiocito. Sin embargo, falta conocer el tipo de receptor involucrado y vías de señalización activadas por TNF- α para inducir la expresión de VCAM-1, la regulación transcripcional y post-traducciona de VCAM-1 en el cardiomiocito y finalmente, el papel de VCAM-1 en el efecto protector del preconditionamiento por TNF en el cardiomiocito.

4. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), a bajas concentraciones y a través de la vía de señalización TNFR2/JAK2/STAT3, estimula la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito como un mecanismo de protección frente el daño por isquemia/reperfusión simulada (**Figura 3**).

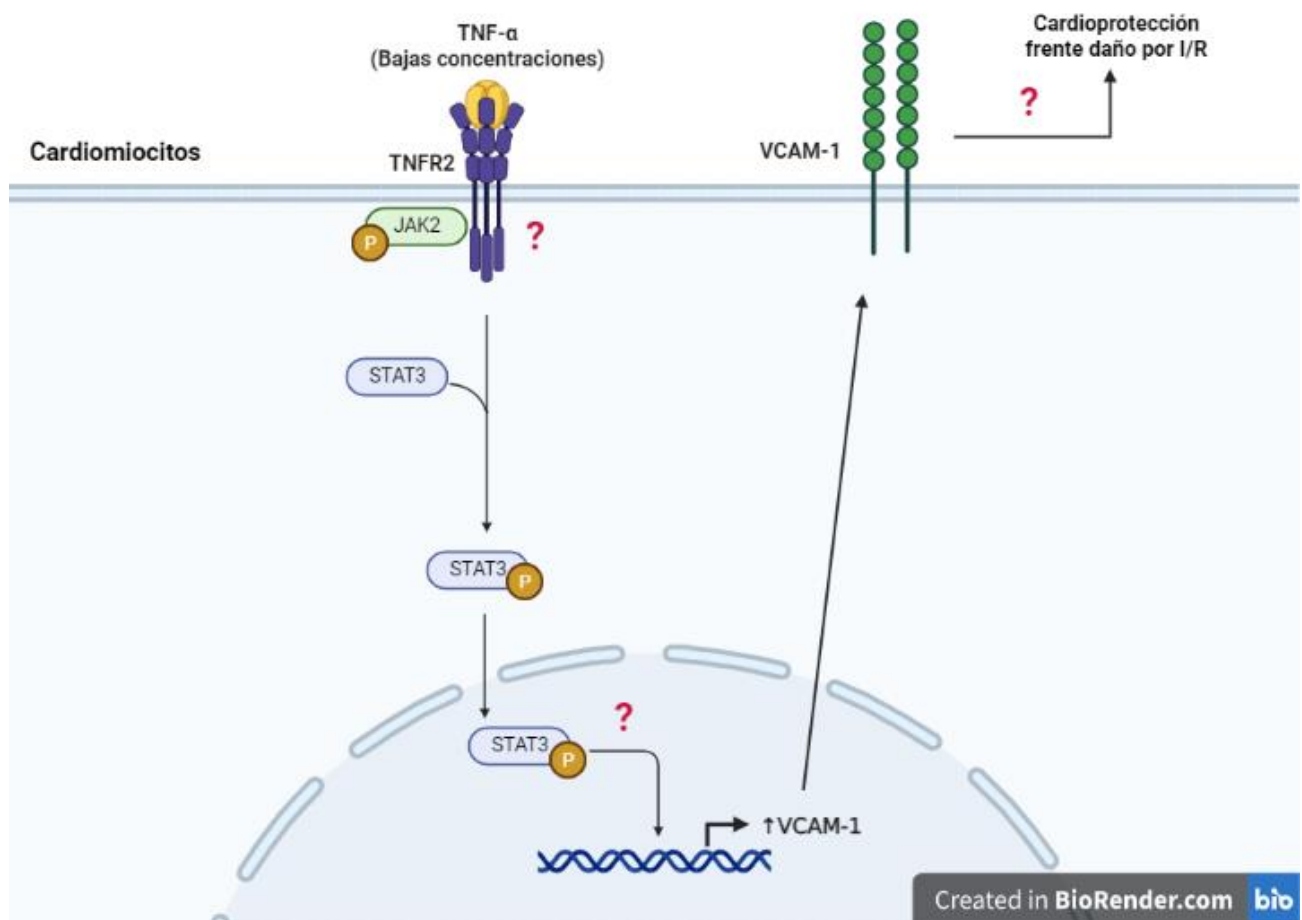


Figura 3. Hipótesis de trabajo.

Objetivo general

Determinar *in vitro* si bajas concentraciones de TNF- α a través del receptor TNFR2 y activación de la vía JAK2/STAT3 estimula la expresión de VCAM-1 en cardiomiocitos de rata como mecanismo de protección frente el daño por isquemia/reperfusión.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de TNF- α sobre la expresión de la proteína y mRNA de VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.
2. Evaluar si la expresión de VCAM-1 estimulada por TNF- α es dependiente del receptor TNFR2 y la vía de señalización JAK2/STAT3 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.
3. Estudiar si la proteína VCAM-1 media el efecto protector frente el daño por isquemia/reperfusión simulada en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata preconditionados con TNF- α

5. Materiales y métodos

Reactivos

Pancreatina, D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa, 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), actinomicina D (ActD), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio M199, siRNA Scramble (siScr, número catálogo SIC001), siRNA VCAM-1 (siVCAM-1, número catálogo SASI_Rn01_00066469 y SASI_Rn01_00066471), siRNA TNFR1 (siTNFR1, número catálogo SASI_Rn01_00038797) y siRNA TNFR2 (siTNFR2, número catálogo SASI_Rn02_00267427) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA). Suero fetal bovino (FBS), EZ-ECL, penicilina/estreptomicina 100X y Tripsina-EDTA 0,5% se obtuvieron de Biological Industries (Beit-Haemek, Israel). Colagenasa tipo II, medio Opti-MEM, suero de becerro recién nacido (NBCS), lipofectamina RNAimax, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), PowerUp SYBR Green, TRIzol, Azul de tripán 0.4% y albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/mL se adquirieron de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Los inhibidores de proteasas y fosfatasas (cOmplete-Inhibitor cocktail tablets y PhosSTOP-phosphatase inhibitor cocktail tablets) se obtuvieron de Roche (Basel, Switzerland). Protein Assay Dye Reagent y iScript cDNA synthesis kit se adquirieron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). CellTiter-Glo luminescent Cell viability assay y CytoTox96 Non-radioactive cytotoxicity assay se obtuvieron de Promega (Madison, WI, USA). Cicloheximida (CHX), AG490 y Stattic se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). TNF- α recombinante de rata se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA, número catálogo 510-RT-010). Compuestos orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron de Merck (Darmstadt, Germany) o Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA).

Animales

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley neonatas, de 1 – 3 días de edad, del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. El protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad de Chile (Certificado n°: 19229-CYQ-UCH). Los animales se manipularon de acuerdo con las “Guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio” de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH).

Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas

Los cultivos primarios de cardiomiocitos utilizados corresponden a miocitos ventriculares de ratas neonatas (NRVM) aislados de acuerdo con un protocolo descrito anteriormente (55). Brevemente, los ventrículos de los corazones aislados se disgregaron mecánicamente mediante bisturí y se sometieron a digestiones enzimáticas sucesivas con colagenasa tipo II (0,2 mg/mL) y pancreatina (0,6 mg/mL). Luego, se plaquearon los homogenizados ventriculares por 2,5 h para enriquecer el cultivo en cardiomiocitos y descartar otros tipos celulares. La fracción de cardiomiocitos se sembró a una densidad de $1 \times 10^6 / \text{mm}^2$ sobre placas de 35 mm precubiertas con gelatina y se mantuvieron con medio de cultivo para cardiomiocitos DMEM:M199 en proporción 4:1, suplementado con 5% FBS, 10% NBCS y antibióticos por 24 h en incubador a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire. Se utilizó 0,1 mM BrdU para bloquear la proliferación de fibroblastos cardíacos (56).

Tratamiento de cardiomiocitos con TNF- α

Transcurridas 18-24 h después del cultivo, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4) y se les cambió medio de mantención fresco suplementado con BrdU 0,1 mM. A la mañana siguiente, se les cambio medio de mantención sin suero (DMEM:M199 en proporción 4:1), se trataron con TNF- α recombinante de rata (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a la concentración y tiempo requeridos para cada experimento, se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire.

Evaluación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó por los métodos de exclusión de azul de tripán y ensayo de reducción de MTT. En el ensayo de exclusión de azul de tripán, se recolectó y centrifugó el medio de cultivo para recuperar las células muertas. Las células se lavaron con PBS 1X, se les agregó tripsina-EDTA (0,05% y 0,02%, respectivamente) y se incubaron por 10 min a 37°C. A continuación, se neutralizó la tripsina-EDTA con medio de mantención 10% FBS y la suspensión celular se mezcló con azul de tripán 0,4%. Se procedió a contar células en cámara de Neubauer, se contaron células vivas y células muertas (56). Para el ensayo de reducción de MTT, se aspiró el medio, se lavó dos veces con PBS 1X y se añadió 1 mL de solución de MTT (0,5 mg/mL) en medio de mantención, se incubó a 37°C por 3 horas. Posteriormente, se aspiró el medio, se añadió 500 μ L de DMSO, se dejó en agitación por 15 min protegido de la luz, se transfirió el homogenizado a una microplaca de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 560 nm en el lector de placas GloMax

Multidetection System (Promega, Madison, WI, USA). Se utilizó peróxido de hidrogeno (H_2O_2) 300 μ M como control positivo de muerte celular (57).

Medición de niveles intracelulares de ATP

Se plaquearon 150.000 células en placas de 25 pocillos cubiertas con gelatina y se determinó el contenido de trifosfato de adenosina (ATP) utilizando el ensayo basado en la reacción luciferina/luciferasa (58). Para la medición de los niveles intracelulares relativos de ATP, se aspiró el medio de cultivo y se reemplazó por el medio de Krebs (NaCl 145 mM; KCl 5 mM; $CaCl_2$ 2,6 mM; $MgCl_2$ 1 mM; HEPES 10 mM; glucosa 5,6 mM; pH 7,4) para después usar el reactivo CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó oligomicina 2 μ M como control positivo, disminuye los niveles de ATP intracelulares al inhibir la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa (59, 60). A continuación, el lisado celular se transfirió a una placa opaca de 96 pocillos y se midió luminiscencia en el lector de placas GloMax Multidetection System (Promega, Madison, WI, USA).

Medición de la actividad LDH

La medición de la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizó para evaluar la muerte por necrosis (56). LDH es una enzima citoplásmica que se libera al espacio extracelular cuando ocurre permeabilización de la membrana plasmática, un signo característico de las células necróticas (61). La actividad LDH se determinó utilizando los reactivos CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se midieron las

absorbancias a 490 nm en el lector de placas GloMax Multidetecion System (Promega, Madison, WI, USA).

Extracción y preparación de proteínas totales

Las células se lavaron con PBS 1X frío, se añadió 65 μ L de buffer RIPA (Tris-HCl 10 mM; EDTA 4,5 mM; NaCl 150 mM; ácido desoxicólico 1%; tritón X-100 1%; SDS 0,1%; pH 7,2; suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas) y se rasparon las placas mantenidas en hielo. Se recuperaron los homogenizados y se sonicaron por 5 min. Posteriormente se centrifugaron a 12.000xg a 4°C por 15 min. Se recolectaron los sobrenadantes en tubos de 1,5 mL de microcentrífuga y se cuantificaron proteínas totales mediante el método de Bradford. Se utilizó el reactivo Bio-Rad Protein Assay, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las proteínas se desnaturalizaron con 1/3 del volumen de la muestra de solución de carga 4X (Tris-HCl 25 mM pH 6,8; glicerol 20%; 2-mercaptoetanol 10%; SDS 5%; azul de bromofenol 0,01%). Finalmente, se calentaron a 95°C por 5 min, se dejaron enfriar y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Análisis de proteínas mediante Western blot

Se cargaron 25-30 μ g de proteínas desnaturalizadas de cada uno de los estímulos en geles de poliacrilamida-SDS discontinuos (gel separador 10%, gel concentrador 3%). La corrida electroforética se realizó a 80 V, voltaje constante, por 2,5 h en tampón de electroforesis 1X (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%). Posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron (400 mA, amperaje constante por 1,5 h) a membranas de nitrocelulosa previamente humedecidas

con tampón de transferencia 1X (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%). Las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en solución salina tamponada con Tris-Tween (TBS-T) 1X (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Tris-HCl 0,248 mM; Tween 20 0,1%; pH 7,4) por 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 2**) durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente, se lavaron con TBS-T 1X, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (**Tabla 1**) por 1 h y se lavaron nuevamente con TBS-T 1X para luego ser reveladas con el reactivo comercial EZ-ECL. Las membranas se revelaron en el sistema de imágenes Odyssey FC (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas en el software UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific, Provo. UT, USA) y se normalizaron con respecto al control de carga (GAPDH).

Tabla 1. Anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis

Anticuerpo	Marca/Catálogo	Dilución
Anti-Conejo-HRP	Millipore Sigma, #401315	1:5.000
Anti-Ratón-HRP	Millipore Sigma, #402335	1:5.000

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.

Proteína	Marca/Catálogo	Dilución	Fuente	Peso molecular (kDa)
VCAM-1	SC, #1504	1:1000	Conejo	110
GAPDH	CS, #2118	1:1.000	Conejo	37
Akt	CS, #9272	1:1.000	Conejo	60
p-Akt (Ser473)	CS, #4060	1:1.000	Conejo	60
NF-kB p65	CS, #8242	1:1.000	Conejo	65
p-NF-kB p65 (Ser536)	CS, #3033	1:1.000	Conejo	65
ERK1/2	CS, #9102	1:1.000	Conejo	44, 42
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	CS, #4370	1:1.000	Conejo	44, 42
STAT3	SC, #8019	1:1.000	Ratón	91/86
p-STAT3 (Tyr705)	SC, #8059	1:1.000	Ratón	91/86

Marcas: CS= Cell Signaling Technology; SC= Santa Cruz Biotechnology; AB= Abcam

Extracción del RNA total

Posterior a los distintos tratamientos, las células se lavaron con PBS 1X frío. Se les añadió 1 mL de reactivo TRIzol y se procedió a extraer el ácido ribonucleico (RNA) total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se cuantificaron por absorbancia 260/280 en espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) (59). Se procedió de inmediato a la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA).

Síntesis de DNA complementario

La síntesis del cDNA, o transcripción reversa (RT), se realizó a partir del RNA total para cada condición mediante el kit de reactivos iScript Reverse Transcription Supermix de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

PCR en tiempo real

Se utilizaron partidores específicos para cada gen de interés diseñados para la especie *Rattus norvegicus* (**Tabla 3**) y el reactivo PowerUp SYBR Green Master Mix según las instrucciones del fabricante en un sistema de PCR en tiempo real (qPCR) StepOnePlus (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para analizar los datos (59). Se utilizó la expresión del gen GAPDH para normalizar los valores de cada gen de interés.

Inhibición de la transcripción y la traducción

A los cultivos primarios de cardiomiocitos se les cambió medio de mantención fresco y se procedió a tratar con el respectivo inhibidor previo al tratamiento con TNF- α . Un grupo de placas se trataron por 1 h con 5 $\mu\text{g/mL}$ de ActD, un inhibidor transcripcional (62). Otras placas se trataron por 4 h con 100 $\mu\text{g/L}$ de cicloheximida CHX, un inhibidor global de la traducción (63). Se utilizaron también placas sin tratar como controles.

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo de tesis.

Gen de interés	Partidor “Forward” (5'→3')	Partidor “Reverse” (5'→3')
<i>VCAM-1</i>	ACACCGGGAAAGCTCTTGTT	TTGAGCAGGTCAGGTTTACA
<i>GAPDH</i>	GACATGCCGCCTGGAGAAAC	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT
<i>TNF-α</i>	ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA	CGAGCAGGAATGAGAAGAGG
<i>TNFR1</i>	ACCAAGTGCCACAAAGGAAC	CTGGAAATGCGTCTCACTCA
<i>TNFR2 P2</i>	CACACATCCCTGTGTCCTTG	AGGGCTTCTTTTTCCTCTGC
<i>IL-6</i>	ACAGCATTGTCAGTCTGTGG	TCAGCATGAAAACGCACCAG
<i>Nrf2</i>	CAGTCTTCACCACCCTGAT	CAGTGAGGGGATCGATGAGT
<i>SOD2</i>	CAGACCTGCCTTACGACTATGG	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT
<i>CAT</i>	AGCGACCAGATGAAGCAGTG	TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG
<i>HO-1</i>	CGACAGCATGTCCCAGGATT	TCGCTCTATCTCCTCTTCCAGG

Ensayo de estabilidad del RNA mensajero

El ensayo de estabilidad del RNA mensajero (mRNA) se realizó utilizando el inhibidor transcripcional ActD. Inicialmente, se les cambió medio de mantención fresco a los cultivos primarios de cardiomiocitos. Un grupo de placas se trataron con TNF- α (10 ng/mL) por 24 h para aumentar los niveles del mRNA de VCAM-1, otro grupo de placas permaneció 24 h sin tratar con TNF- α . A continuación, todas las placas se trataron con 5 μ g/mL ActD por diferentes tiempos (0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h). Luego se procedió a retirar los estímulos, lavar con PBS 1X frío y colocar TRIzol para posteriormente realizar la extracción del RNA total. Los niveles de mRNA remanente se determinaron mediante RT-qPCR como se describió anteriormente en este documento. El

porcentaje de mRNA remanente se calculó a partir de la abundancia relativa del ARNm para cada tiempo, relativo al tiempo 0 h para cada set experimental (con y sin TNF- α).

Transfección de cardiomiocitos

Se utilizaron secuencias de RNA interferentes pequeños (del inglés, siRNA) específicas de rata para el silenciamiento de los genes *VCAM-1*, *TNFR1* y *TNFR2* (**Tabla 4**). Para *VCAM-1* se utilizaron dos secuencias diferentes (200 nM), utilizadas previamente en nuestro laboratorio (26). Para *TNFR1* y *TNFR2* se emplearon secuencias diseñadas comercialmente (120 nM). Se empleó un protocolo de transfección por 24 h en 1 mL de medio Opti-MEM y se utilizó el reactivo lipofectamina RNAiMAX como vehículo de transfección, se siguieron las instrucciones del fabricante. Se empleó un siRNA Scrambled como control de la transfección.

Posterior a la transfección, se trataron los cardiomiocitos con 10 ng/mL de TNF- α por 24 h para demostrar el silenciamiento del gen de *VCAM-1* ante este inductor o evaluar el efecto de *TNFR1* y *TNFR2* en la expresión de la proteína *VCAM-1*. La disminución de los niveles de las respectivas proteínas se evaluó mediante Western blot, para *VCAM-1* el silenciamiento se confirmó por RT-qPCR.

Tabla 4. siRNAs utilizados en esta tesis

Gen de interés	Código identificación	Secuencia referencia	Especie
<i>VCAM-1</i>	SASI_Rn01_00066469	NM_012889	Rata
<i>VCAM-1</i>	SASI_Rn01_00066471	NM_012889	Rata
<i>TNFR1</i>	SASI_Rn01_00038797	NM_013091	Rata
<i>TNFR2</i>	SASI_Rn02_00267427	NM_130426	Rata

Ensayo de isquemia/reperfusión simulada

Los cardiomiocitos se sometieron a un ensayo de isquemia/reperfusión simulada (I/Rs) como se resume en la **Figura 4A-B**. Brevemente, los cardiomiocitos se sometieron a isquemia simulada durante 6 h, mediante el uso de un medio isquémico (HEPES 5 mM; NaCl 139 mM; KCl 12 mM; MgCl₂ 0,5 mM; CaCl₂ 1,3 mM; 2-desoxiglucosa 10 mM; ácido láctico 20 mM; pH 6,2) e incubación a 37°C en una cámara de hipoxia para restringir las concentraciones de oxígeno (<1%) y aportar un ambiente hipóxico (95% N₂, 5% CO₂) al cultivo celular. La composición de este medio isquémico (falta de glucosa, bajo pH, altas concentraciones de potasio y lactato) simulan los cambios bioquímicos que ocurren en el miocardio durante la isquemia *in vivo* (64). Otro grupo de placas se incubaron a 37°C en presencia de un medio control (HEPES 5 mM; NaCl 139 mM; KCl 4,7 mM; MgCl₂ 0,5 mM; CaCl₂ 1,3 mM; glucosa 23 mM; pH 7,3) y en condiciones de normoxia (5% CO₂ y 95% aire). Posteriormente, la reperfusión se estableció reemplazando el medio isquémico o medio control por medio de mantención suplementado con 10% FBS e incubación por 16-18 h en condiciones de normoxia (56, 64). A continuación, se midió la actividad LDH para evaluar muerte por necrosis y se evaluó viabilidad celular por ensayos de incorporación de azul de tripán y reducción de MTT.

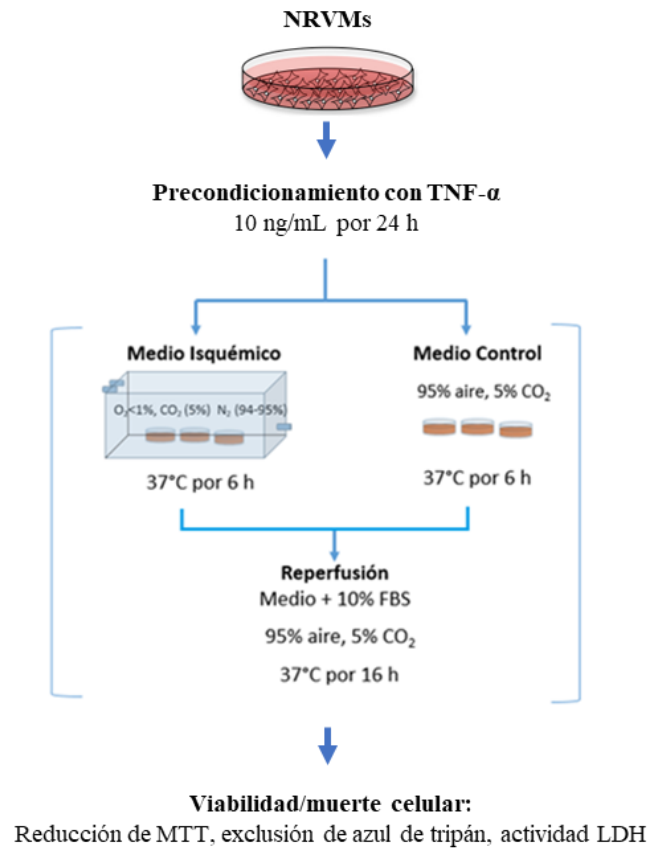
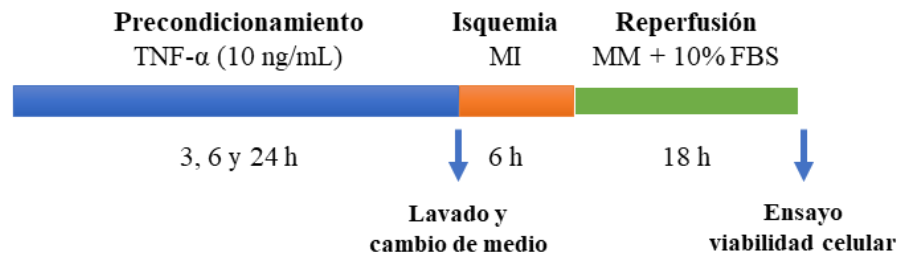
A**B**

Figura 4. Diseño experimental utilizado en esta tesis. A) Protocolo del preconditionamiento, I/R simulada y ensayos de viabilidad celular. B) Resumen del diseño experimental.

Inhibición de la vía JAK2/STAT3

A los cultivos primarios de cardiomiocitos se les cambió medio de mantención fresco y se les trató por 1 h con dos inhibidores diferentes de la vía JAK2/STAT3 previo al tratamiento con TNF- α (10 ng/mL). Un grupo de placas se trataron con AG490 (0, 10, 50 y 100 μ M), un inhibidor de JAK2 (65). Otro grupo de placas se trataron con Stattic (0, 5, 10 y 20 μ M), un inhibidor de STAT3 (66). Inicialmente, se evaluó el efecto de ambos inhibidores en la viabilidad celular de los cardiomiocitos y se seleccionó el inhibidor que no afectará significativamente la viabilidad celular. A continuación, las células se trataron con el inhibidor seleccionado por 1 h previo al tratamiento con TNF- α para evaluar mediante Western blot el efecto de la inhibición de esta vía en la expresión de la proteína VCAM-1.

Expresión de resultados y análisis estadísticos

Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio (SEM) de, al menos, tres experimentos independientes ($n \geq 3$) para cada condición de trabajo. Los experimentos con $n < 5$ se analizaron por una prueba de Mann-Whitney para comparaciones directas o una prueba de Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn para comparaciones múltiples. En los experimentos con $n \geq 5$, se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, y posteriormente se analizaron por una prueba t-Student (t-Test) no pareada para comparaciones directas y análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un post test de Holm-Sidak para comparaciones múltiples. En todos los análisis se consideró un valor de $p < 0,05$ como diferencia estadísticamente significativa. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6. Resultados

Objetivo específico 1: Determinar el efecto de TNF- α sobre la expresión de la proteína y mRNA de VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

Efecto de TNF- α en la viabilidad celular de los cardiomiocitos de rata neonatas.

TNF- α es una citoquina proinflamatoria de la que se ha reportado presenta una paradoja muerte/sobrevida y que este comportamiento es dependiente de la concentración. Por lo tanto, en primera instancia, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de TNF- α en la viabilidad celular de cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata. Para esto, los cardiomiocitos se trataron con TNF- α recombinante de rata a diferentes concentraciones (0 – 500 ng/mL) por 24 h. Para los ensayos de viabilidad se utilizó tratamiento con 300 μ M de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como control positivo de muerte. La viabilidad celular se determinó mediante ensayos de exclusión de azul de tripán y reducción de MTT como se describe en materiales y métodos. Los resultados de ambos ensayos de viabilidad muestran que TNF- α , a concentraciones entre 1 – 100 ng/mL no induce muerte significativa de los cardiomiocitos a las 24 h en comparación con el control sin tratamiento (**Figura 5A-B**). En nuestro modelo experimental, se observó muerte significativa con ambos métodos únicamente a los 500 ng/mL y en el control positivo de muerte. Además, se observaron diferencias entre ambos ensayos de viabilidad. Con el ensayo de reducción de MTT se observaron valores más bajos de viabilidad celular en comparación con el azul de tripán.

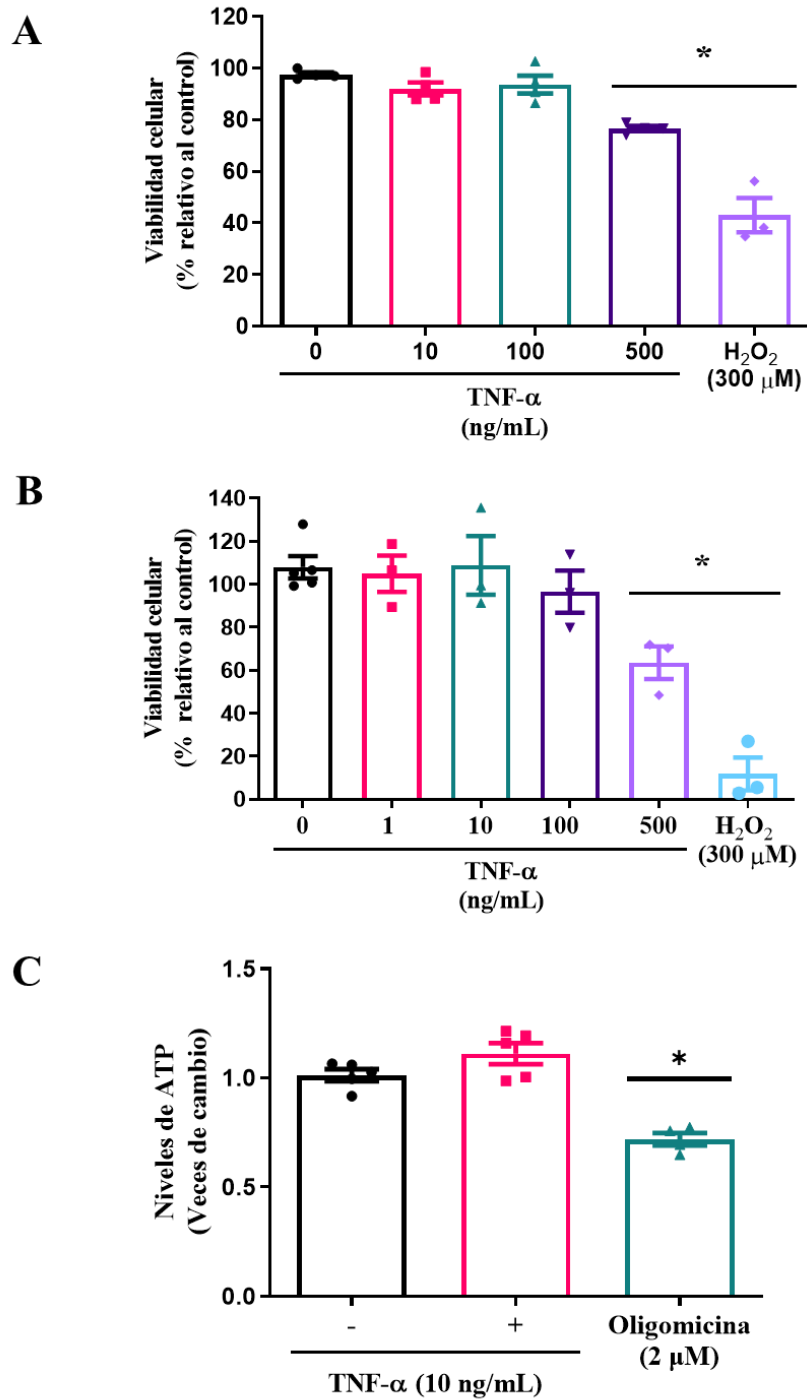


Figura 5. Efecto de TNF- α en la viabilidad de cardiomiocitos de rata. A) Ensayo de exclusión de azul de tripán; B) Ensayo de reducción de MTT; C) Niveles intracelulares de ATP. Se utilizó H₂O₂ como control de muerte y oligomycin como inhibidor de la producción de ATP. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs TNF- α 0 ng/mL, $n \geq 3$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Complementario a los ensayos de viabilidad que se describieron anteriormente, se realizó la medición de los niveles intracelulares de ATP en los cardiomiocitos tratados con 10 ng/mL de TNF- α por 24 h. Se utilizó oligomicina 2 μ M como control positivo debido a que reduce los niveles intracelulares de ATP. No se observó diferencia significativa en los niveles intracelulares de ATP entre los cardiomiocitos tratados y no tratados con 10 ng/mL de TNF- α por 24 h (**Figura 5C**).

En resumen, TNF- α a concentraciones entre 1 – 100 ng/mL no reduce significativamente la viabilidad celular de los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata ni tampoco aumenta los niveles intracelulares de ATP a las 24 h de tratamiento.

Efecto de TNF- α en los niveles proteicos de VCAM-1 en el cardiomiocito

Se ha descrito en diferentes modelos celulares que la expresión de la proteína VCAM-1 es inducida por diferentes estímulos, entre ellos estímulos proinflamatorios como TNF- α (5, 67). Sin embargo, la regulación de VCAM-1 por TNF- α en el cardiomiocito no es del todo conocida. Por tal razón, nos propusimos evaluar el efecto de TNF- α sobre la expresión de la proteína VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata.

Para estos experimentos se utilizó el rango de concentraciones en los cuales demostramos que no ocurría muerte significativa de los cardiomiocitos. Es decir, las células se trataron con diferentes concentraciones de TNF- α (0 – 100 ng/mL) por diferentes tiempos (0 – 24 h). A continuación, se determinaron los niveles proteicos de VCAM-1 mediante Western blot en extractos celulares totales, se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados muestran que TNF- α , a concentraciones de 10 y 100 ng/mL, estimula un incremento significativo en los niveles proteicos de VCAM-1 a las 6 y 24 h (**Figura 6A-B**). No se observó diferencia significativa entre la concentración de 10 ng/mL vs 100 ng/mL a las 6 y ni a las 24 h de tratamiento.

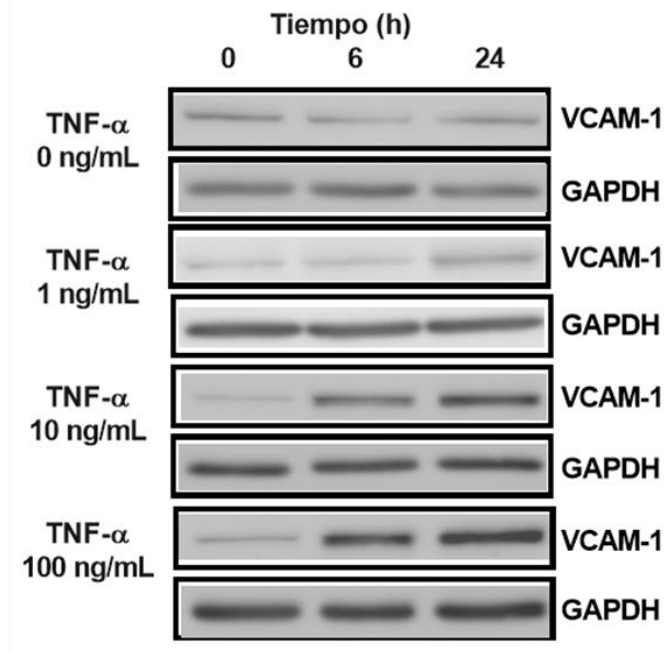
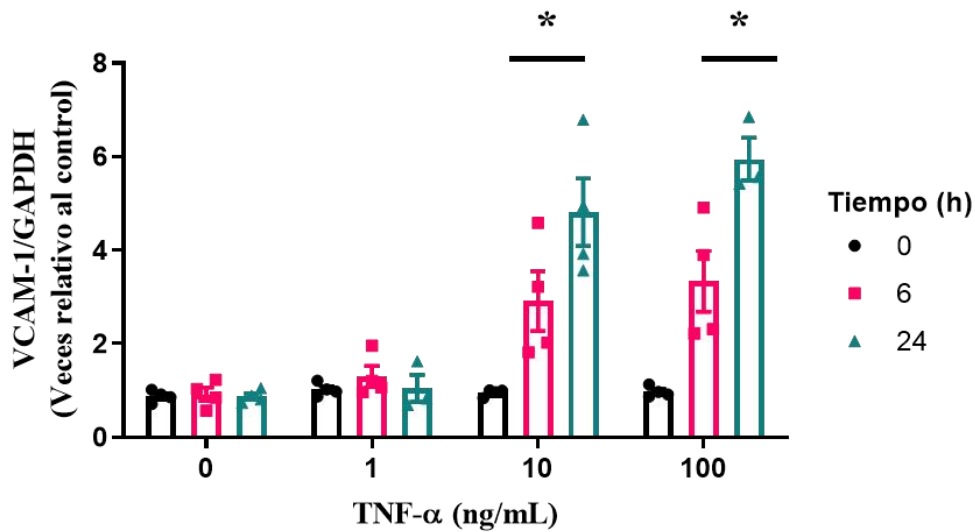
A**B**

Figura 6. Efecto de TNF- α en la expresión de proteína de VCAM-1 en el cardiomiocito. A) Imagen representativa del Western blot, se utilizó como control de carga la proteína GAPDH; B) Cuantificación densitométrica de los niveles proteicos de VCAM-1. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs TNF- α 0 ng/mL a 0 h, $n \geq 3$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Los resultados descritos hasta el momento muestran que TNF- α a concentraciones entre 1 – 100 ng/mL no altera significativamente la viabilidad celular de cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas. Además, concentraciones de 10 y 100 ng/mL incrementan significativamente los niveles proteicos de VCAM-1 a las 6 y 24 h. Por lo tanto, se seleccionó la concentración de 10 ng/mL de TNF- α por 24 h como estímulo estándar para los experimentos subsiguientes debido a que, en nuestras condiciones experimentales, es la concentración más baja de TNF- α a la cual aumenta VCAM-1 y no se ve afectada la viabilidad celular.

Efecto de TNF- α sobre la expresión del mRNA de VCAM-1 en los cardiomiocitos

Para determinar si el efecto de TNF- α sobre la expresión de VCAM-1 es a nivel transcripcional, se trataron los cultivos primarios de cardiomiocitos con 10 ng/mL de TNF- α por diferentes tiempos (0 – 48 h). A continuación, se midieron los niveles del mRNA de VCAM-1 mediante RT-qPCR, los datos se normalizaron con la expresión de GAPDH. Los resultados muestran que 10 ng/mL de TNF- α estimula un incremento significativo en los niveles del mRNA de VCAM-1 a partir de las 6 h y hasta las 48 h que duró este experimento (**Figura 7**). Además, se observó diferencia significativa entre el tiempo de 6 h en comparación con las 24 y 48 h de tratamiento.

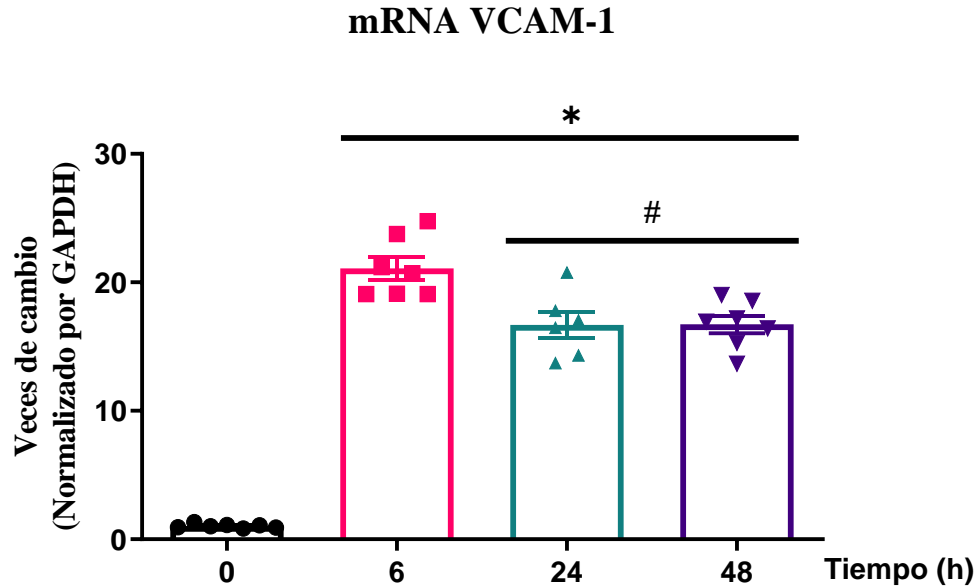


Figura 7. Efecto de TNF- α en la expresión de mRNA de VCAM-1 en el cardiomiocito. Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se trataron con 10 ng/mL de TNF- α por diferentes tiempos (0 – 48 h). Los datos se normalizaron con la expresión de GAPDH. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, * $p < 0,05$ vs control 0 h, # $p < 0,05$ vs t=6 h, $n \geq 6$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Para responder si el incremento del mRNA de VCAM-1 observado en el resultado anterior se da por un aumento en su síntesis y no por una disminución de su degradación, se evaluó si TNF- α altera la estabilidad del mRNA de VCAM-1. Para esto, los cardiomiocitos se trataron con TNF- α por 24 h para inducir la expresión del mRNA, luego se inhibió la transcripción con actinomicina D y a continuación se midió el mRNA remanente a diferentes tiempos. Los resultados muestran que, en nuestras condiciones experimentales, TNF- α no aumenta la vida media del mRNA de VCAM-1 ($t_{1/2} = 4,0$ h), sino que, por el contrario, la reduce en 1 h en comparación a las células no tratadas con TNF- α ($t_{1/2} = 5,1$ h). Sin embargo, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (**Figura 8**).

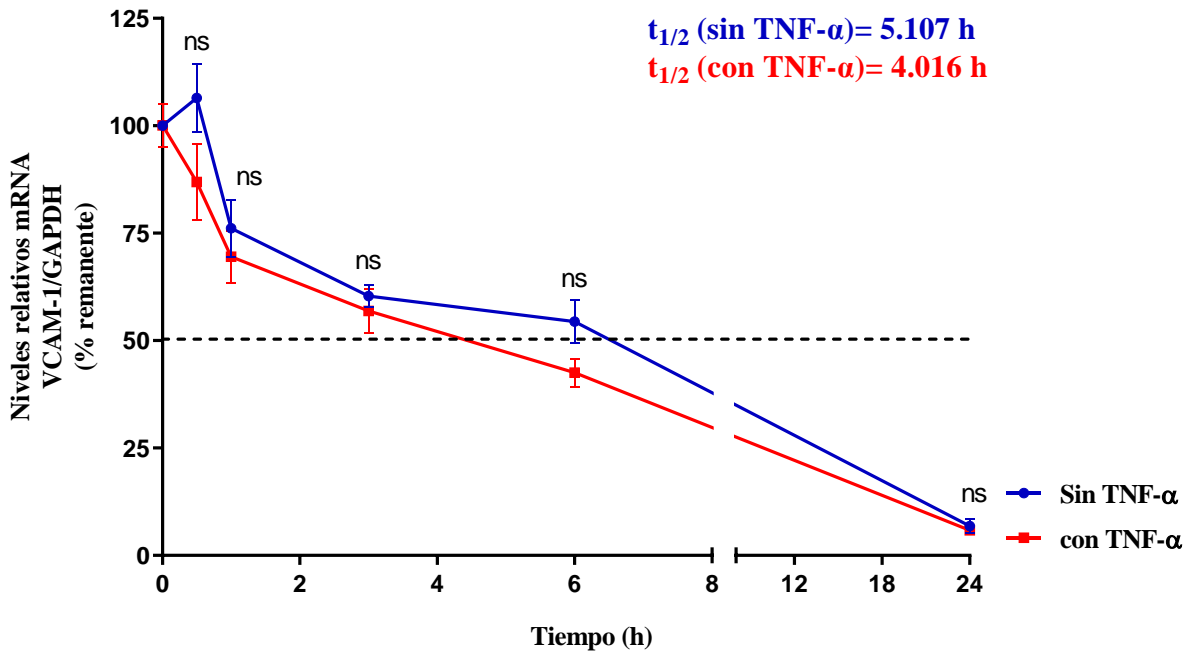


Figura 8. Efecto de TNF- α en la estabilidad del mRNA de VCAM-1 en el cardiomiocito. Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se estimularon con 10 ng/mL de TNF- α por 24 h y a continuación se trataron con 5 μ g/mL de ActD por diferentes tiempos. Se midieron los niveles de mRNA de VCAM-1 remanente mediante RT-qPCR. Se elaboró una curva de decaimiento de una fase con ajuste de mínimos cuadrados. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, ns= no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones, $n \geq 3$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Efecto de la inhibición de la transcripción y la traducción en la expresión de la proteína VCAM-1 inducida por TNF- α

Los resultados anteriores sugieren que el incremento en los niveles de mRNA de VCAM-1 correspondería a una regulación transcripcional y que, además, los niveles de mRNA se traducen en los niveles proteicos de VCAM-1. Por lo tanto, para confirmar si el incremento de la proteína VCAM-1 estimulado por TNF- α se debe a un aumento en su expresión, los cardiomiocitos se trataron con 5 μ g/mL de actinomicina D (inhibidor de la transcripción) por 1 h y 100 μ g/mL de cicloheximida (inhibidor de la traducción) por 4 h previo al tratamiento con TNF- α (10 ng/mL) por 24 h. Se determinaron los niveles proteicos de VCAM-1 mediante Western blot, se utilizó GAPDH

como control de carga. Los resultados muestran que el pretratamiento con actinomicina D y cicloheximida bloquean significativamente el incremento en los niveles proteicos de VCAM-1 inducido por TNF- α (Figura 9A-B), lo que sugiere que esta citoquina estimula la biosíntesis *de novo* de VCAM-1 en el cardiomiocito a través de un mecanismo transcripcional.

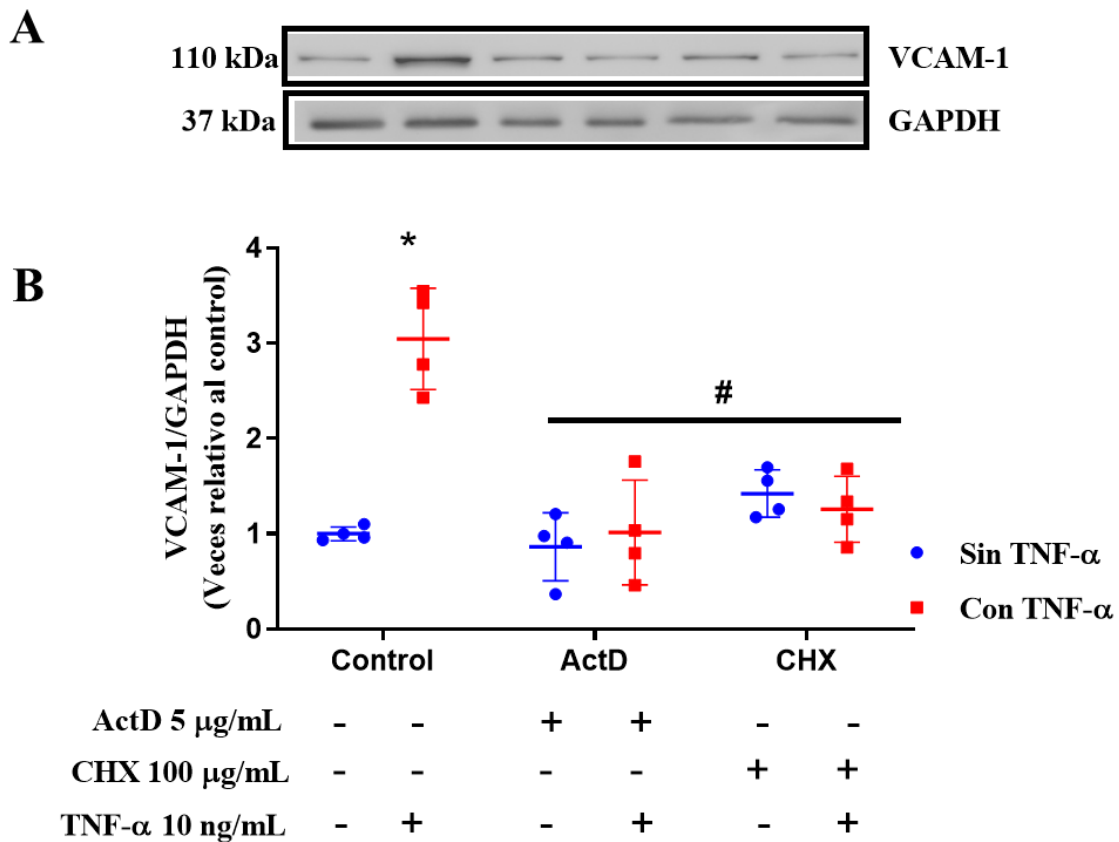


Figura 9. Efecto de la inhibición de la transcripción y la traducción en la expresión de la proteína VCAM-1 inducida por TNF- α . Cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se trataron con 5 $\mu\text{g/mL}$ de actinomicina D por 1 h y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida por 4 h previo al tratamiento con TNF- α (10 ng/mL) por 24 h. (A) Imagen representativa del Western blot de VCAM-1, se utilizó como control de carga a la proteína GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de VCAM-1. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs control sin TNF- α , # $p < 0,05$ vs control con TNF- α , $n = 4$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Objetivo específico 2: Evaluar si la expresión de VCAM-1 estimulada por TNF- α es dependiente del receptor TNFR2 y la vía de señalización JAK2/STAT3 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

Señalización de TNF- α en el cardiomiocito y expresión de VCAM-1

TNF- α señala a través de sus dos receptores TNFR1 y TNFR2 (37), activando principalmente las vías de señalización de NF- κ B y AP-1 (43). Además, esta citoquina ejerce cardioprotección mediante la activación de diferentes vías como son las vías RISK y SAFE (32, 33). Con estos antecedentes, se evaluó la señalización de TNF- α y la expresión de VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos.

Los cardiomiocitos se trataron con 10 ng/mL TNF- α a diferentes tiempos (0, 15, 60 y 360 min) para determinar la activación de vías de señalización asociadas a supervivencia celular. Se determinó la activación de las proteínas NF- κ B p65, STAT3, Akt y ERK1/2 mediante la detección por Western blot de las formas fosforiladas y totales de estas proteínas. Se utilizó tratamiento con insulina (100 nM) e IL-6 (100 ng/mL) como controles positivos de activación de estas vías de señalización y GAPDH como control de carga. El estado de fosforilación de cada proteína se determinó calculando la razón de proteína fosforilada en comparación con la proteína total y normalizados con el control de carga.

Los resultados muestran que TNF- α estimula la activación mediante fosforilación de las proteínas NF- κ B p65, STAT3, Akt y ERK1/2 en los cardiomiocitos (**Figura 10A-D**). Se observó que esta citoquina induce un aumento significativo de las formas fosforiladas de NF- κ B, Akt y ERK1/2 después de 15 min del tratamiento. Sin embargo, este incremento fue transitorio. Para Akt y ERK1/2 desapareció a los 60 min y para NF- κ B este incremento dejó de ser significativo a los

360 min. Por otro lado, la activación de STAT3 mostró una temporalidad diferente. La activación fue significativa a los 60 min posterior al tratamiento con TNF- α y regresó al valor basal a los 360 min.

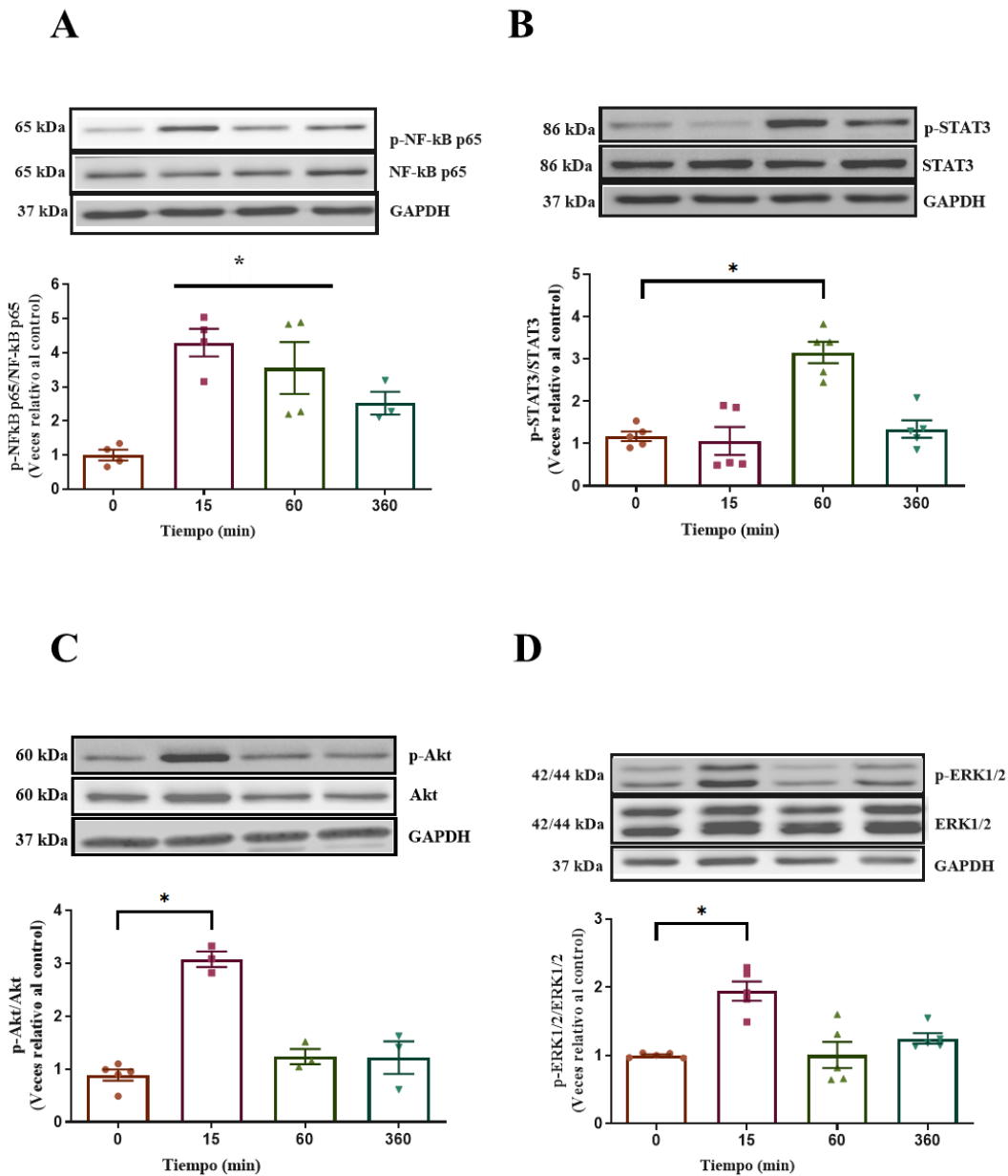


Figura 10. Efecto de TNF- α en la activación de vías de señalización asociadas a sobrevida en el cardiomiocito. Imagen representativa del Western blot y cuantificación densitométrica de los niveles de: A) NF-kB p65, B) STAT3, C) Akt y D) ERK1/2. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs control, $n \geq 3$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

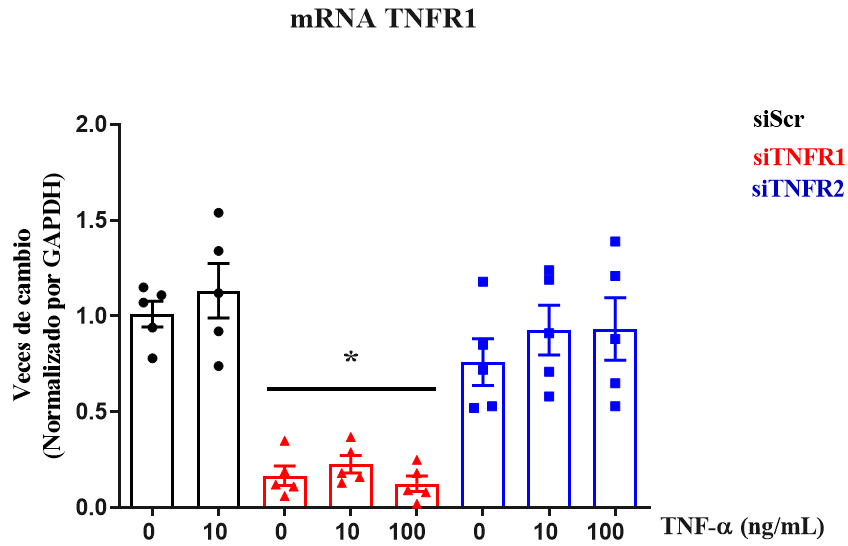
Luego de confirmar que TNF- α activa vías de señalización relacionadas a sobrevida y cardioprotección, y considerando los resultados del objetivo 1 que mostraron que TNF- α estimula la expresión de VCAM-1 a través de un mecanismo transcripcional en el cardiomiocito, se procedió a evaluar el efecto de los receptores de TNF- α en la expresión de la proteína VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos.

Inicialmente se validó un protocolo para el silenciamiento de los receptores TNFR1 y TNFR2 de TNF- α . Para este fin se transfectaron los cultivos primarios de NRVM con secuencias específicas de siRNAs para estos receptores por 24 h y luego se trataron con TNF- α por 24 h adicionales, se utilizaron las concentraciones de 10 y 100 ng/mL para considerar la afinidad de estos receptores por su ligando. El silenciamiento se validó con la medición de los niveles relativos de mRNA de ambos receptores mediante RT-qPCR.

Los resultados muestran que este protocolo de silenciamiento logró reducir significativamente la expresión del mRNA del TNFR1 en un 77 y 87% en presencia de 10 y 100 ng/mL de TNF- α , respectivamente (**Figura 11A**). Además, este protocolo logró reducir significativamente la expresión del mRNA del TNFR2 en un 54% y 58% en presencia de 10 y 100 ng/mL TNF- α , respectivamente (**Figura 11B**). No se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de 10 y 100 ng/mL de TNF- α para ambos receptores.

Una vez validado el protocolo de transfección, se evaluó el efecto del silenciamiento de los receptores TNFR1 y TNFR2 en la expresión de los mRNAs de VCAM-1 y TNF- α en los cardiomiocitos. Los resultados muestran que cuando se silencia el TNFR1 no aumenta la expresión del mRNA de VCAM-1 por tratamiento con 10 y 100 ng/mL de TNF- α , no se observaron diferencias significativas en relación con el control de transfección sin TNF- α (**Figura 12A**).

A



B

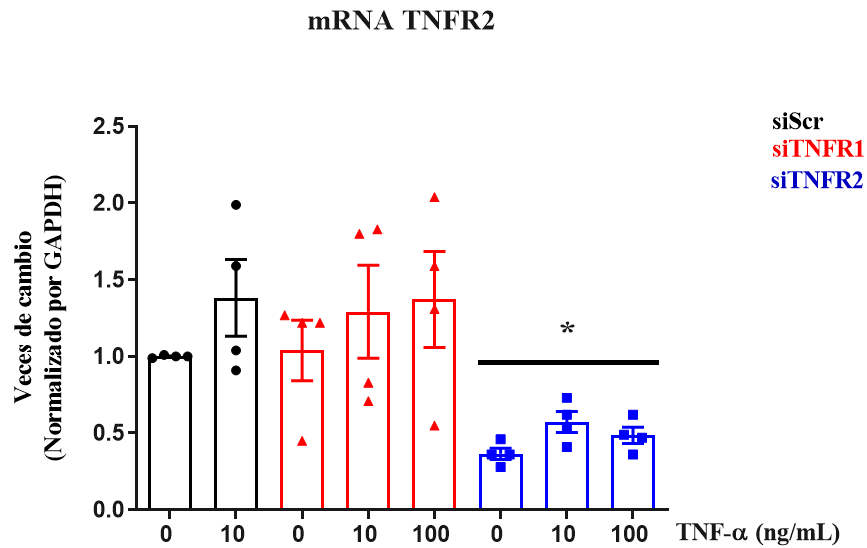


Figura 11. Silenciamiento de receptores de TNF- α en los cardiomiocitos. A) mRNA de TNFR1. B) mRNA de TNFR2. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs siScr con TNF- α , $n \geq 4$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

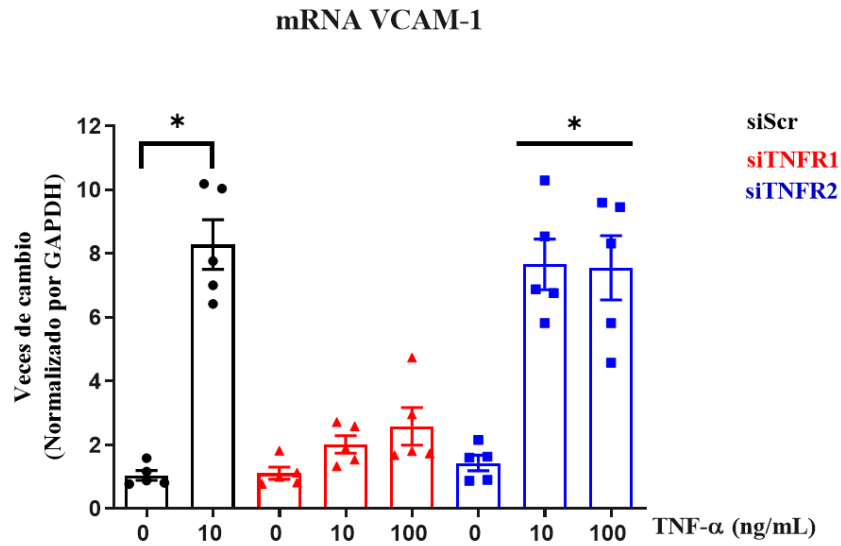
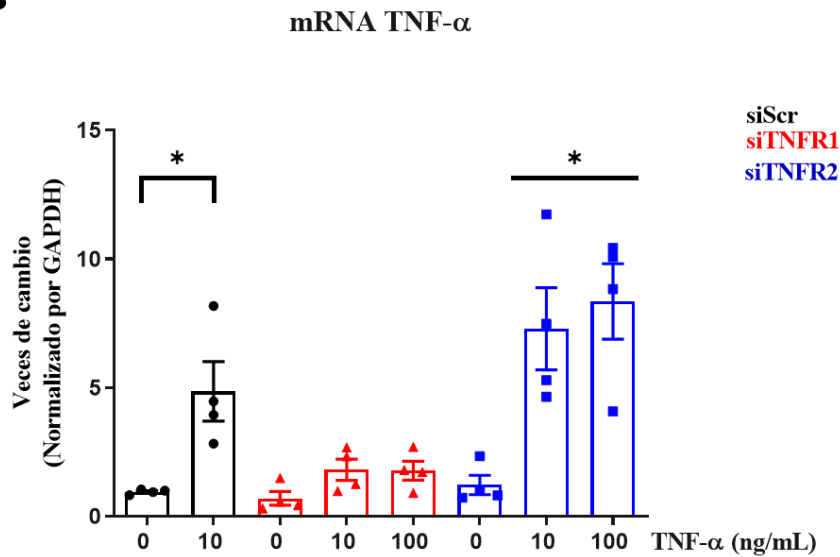
A**B**

Figura 12. Efecto del TNF- α y del silenciamiento de los TNFRs en los niveles de mRNA de VCAM-1 y TNF- α . A) mRNA VCAM-1, B) mRNA TNF- α . Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs siScr sin TNF- α , $n \geq 4$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Por otro lado, cuando se silencia el TNFR2 la expresión del mRNA VCAM-1 aumenta significativamente con el tratamiento de 10 y 100 ng/mL de TNF- α , en relación con el control de transfección sin TNF- α (**Figura 12A**). Además, se evaluó el efecto de ambos receptores en la expresión del propio TNF- α y se obtuvo un resultado comparable con el de VCAM-1, la expresión de esta citoquina en los cardiomiocitos es también dependiente del TNFR1 (**Figura 12B**). Una diferencia entre la expresión de los mRNA de VCAM-1 y TNF- α fue que cuando se silencia el TNFR2 los niveles de mRNA de TNF- α parecen ser mayores que los niveles de mRNA del control de transfección con TNF- α . Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En conclusión, estos resultados muestran que en los cardiomiocitos preconditionados con TNF- α el aumento de la expresión de los mRNAs de VCAM-1 y TNF- α es dependiente del TNFR1 y no del TNFR2.

Inhibición de la vía JAK2/STAT3 y la expresión de VCAM-1

TNF- α ejerce cardioprotección mediante la activación de diferentes vías como ser la vía RISK y la vía SAFE, cada una de estas vías actúan a través de diferentes proteínas quinasas y factores transcripcionales (32, 33). En esta tesis se planteó evaluar el efecto de la vía SAFE, a través de la vía de señalización JAK2/STAT3, en la expresión de VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos preconditionados con TNF- α .

Inicialmente se validó un protocolo para la inhibición de la vía JAK2/STAT3 previo al tratamiento con TNF- α . Para esto se evaluaron dos inhibidores: AG490 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), un inhibidor de JAK2 (65), y Stattic (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), un inhibidor de STAT3 (66).

Los resultados muestran que el tratamiento con el inhibidor Stattic disminuye significativamente la viabilidad de los cardiomiocitos a todas las concentraciones estudiadas (0, 5, 10 y 20 μM) (**Figura 13B**), a diferencia del inhibidor AG490 que no altera la viabilidad celular a todas las concentraciones estudiadas (0, 10, 50 y 100 μM) (**Figura 13A**). Por lo que se decidió utilizar el inhibidor AG490 para los experimentos subsiguientes.

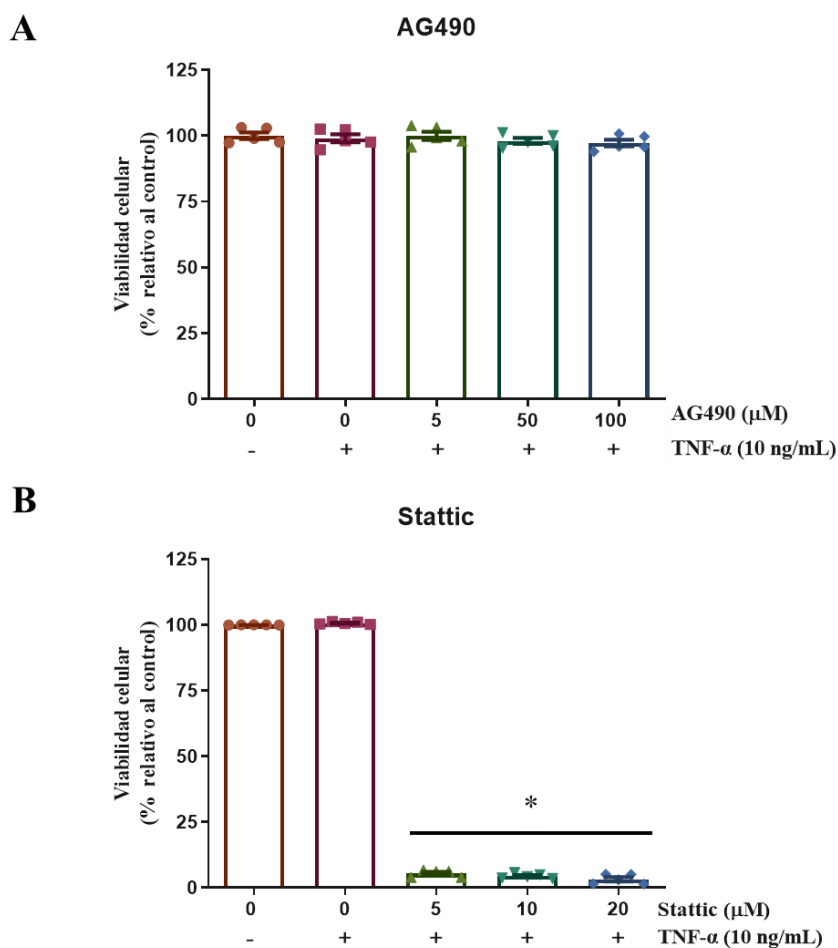


Figura 13. Inhibición de STAT3 y viabilidad celular de los cardiomiocitos. A) Inhibidor AG490, B) Inhibidor Stattic. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, $*p < 0,05$ vs control con TNF- α , $n \geq 4$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

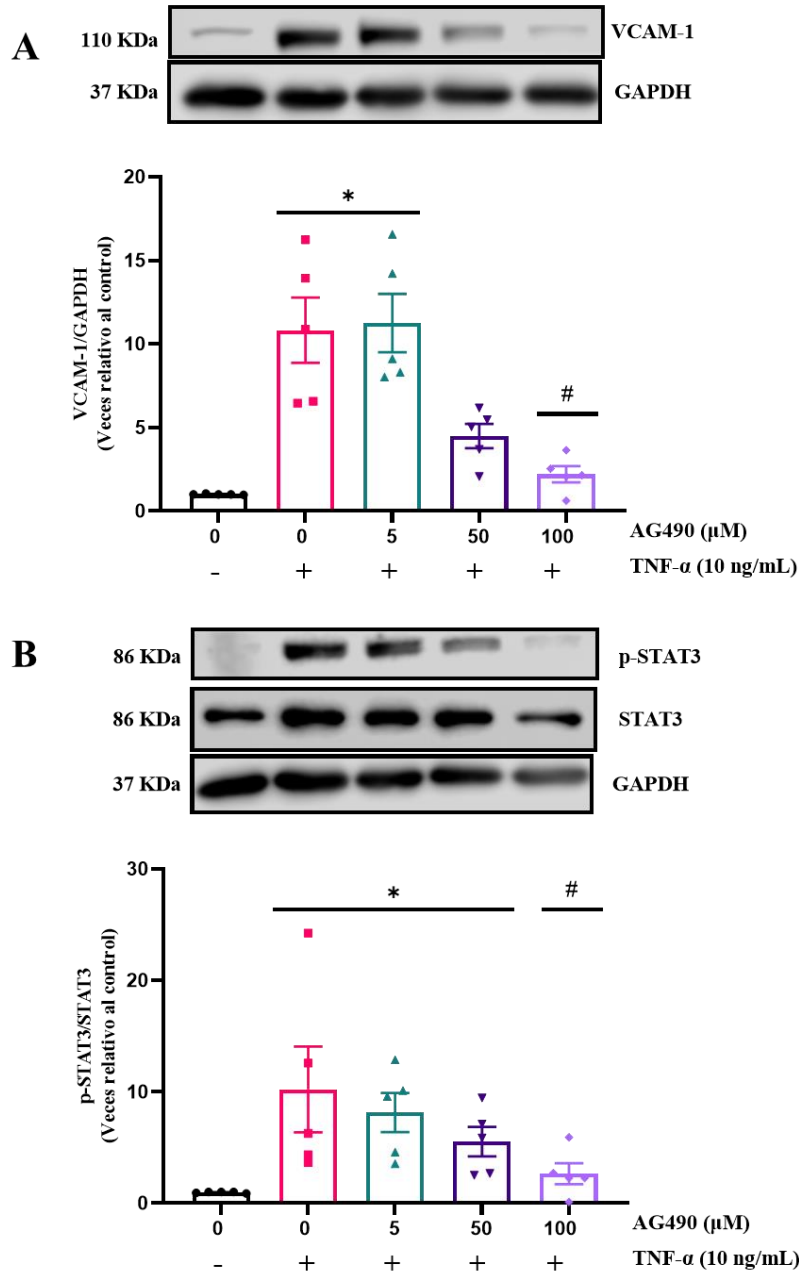


Figura 14. Efecto de la inhibición de STAT3 en la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito. Imagen representativa del Western blot y su respectiva cuantificación de las proteínas: A) VCAM-1, B) Fosforilación de STAT3. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs control sin TNF- α , # $p < 0,05$ vs control con TNF- α , $n \geq 4$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Los resultados de la inhibición con AG490 muestran una disminución gradual en los niveles proteicos de VCAM-1 en los cardiomiocitos, siendo significativa esta diferencia con 100 μ M de AG490 (reducción del 80%, $p=0,008$), en relación con el control con TNF- α (**Figura 14A**). Simultáneamente, se evaluó el estado de fosforilación de STAT3 y se observó una disminución gradual en la fosforilación de este factor transcripcional siendo significativa esta diferencia al utilizar 100 μ M de AG490 (reducción del 74%, $p=0,03$), en relación con el control con TNF- α (**Figura 14B**).

En conclusión, estos resultados muestran que la expresión de VCAM-1 inducida por TNF- α en cultivos primarios de cardiomiocitos es dependiente, al menos en parte, de la vía de señalización JAK2/STAT3. Además, estos resultados evidencian que el factor transcripcional STAT3 es de vital importancia para los cardiomiocitos. Esto debido a que cuando se inhibe específicamente este componente de la vía JAK2/STAT3, la viabilidad de los cardiomiocitos disminuye significativamente.

Objetivo específico 3: Estudiar si la proteína VCAM-1 media el efecto protector frente el daño por isquemia/reperfusión simulada en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata preconditionados con TNF- α .

Efecto del preconditionamiento con TNF- α en la protección del cardiomiocito frente el daño por I/R simulada

Se ha descrito que bajas concentraciones de TNF- α proveen cardioprotección frente cierto tipo de daños como hipoxia o I/R (34, 47). Con estos antecedentes, se evaluó el efecto protector del preconditionamiento (PC) con TNF- α frente el daño por I/R simulada en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

Para esto, los cardiomiocitos se trataron con bajas concentraciones de TNF- α recombinante de rata por diferentes tiempos (3–24 h). En este trabajo de tesis se definió como “baja concentración” a una concentración de 10 ng/mL de TNF- α , por las siguientes razones: 1) A esta concentración no se observó disminución en la viabilidad celular de los cardiomiocitos a 24 h; 2) La concentración de 10 ng/mL fue la concentración más baja que estimuló el aumento significativo de los niveles de mRNA y de los niveles proteicos de VCAM-1 en los cardiomiocitos.

Luego del preconditionamiento, los cardiomiocitos se sometieron a un ensayo de I/R simulada que consistió en 6 h de isquemia y 16 h de reperfusión. Posteriormente se determinó viabilidad celular por reducción de MTT e incorporación de azul de tripán y muerte por necrosis por liberación de LDH. En este experimento se propuso determinar el tiempo mínimo de tratamiento con 10 ng/mL de TNF- α necesario para observar un efecto protector de los cardiomiocitos frente el daño por I/R simulada. Los resultados del ensayo de reducción de MTT indican que I/R simulada disminuye significativamente la viabilidad celular de 100% a 36-50% y que el PC con TNF- α por 6 y 24 h aumenta la viabilidad celular reduciendo el daño generado por

I/R en un 39% ($p=0,016$) y 28% ($p=0,036$), respectivamente (**Figura 15B-C**). El PC con $\text{TNF-}\alpha$ por 3 h no mostró reducción en el daño generado por I/R (**Figura 15A**).

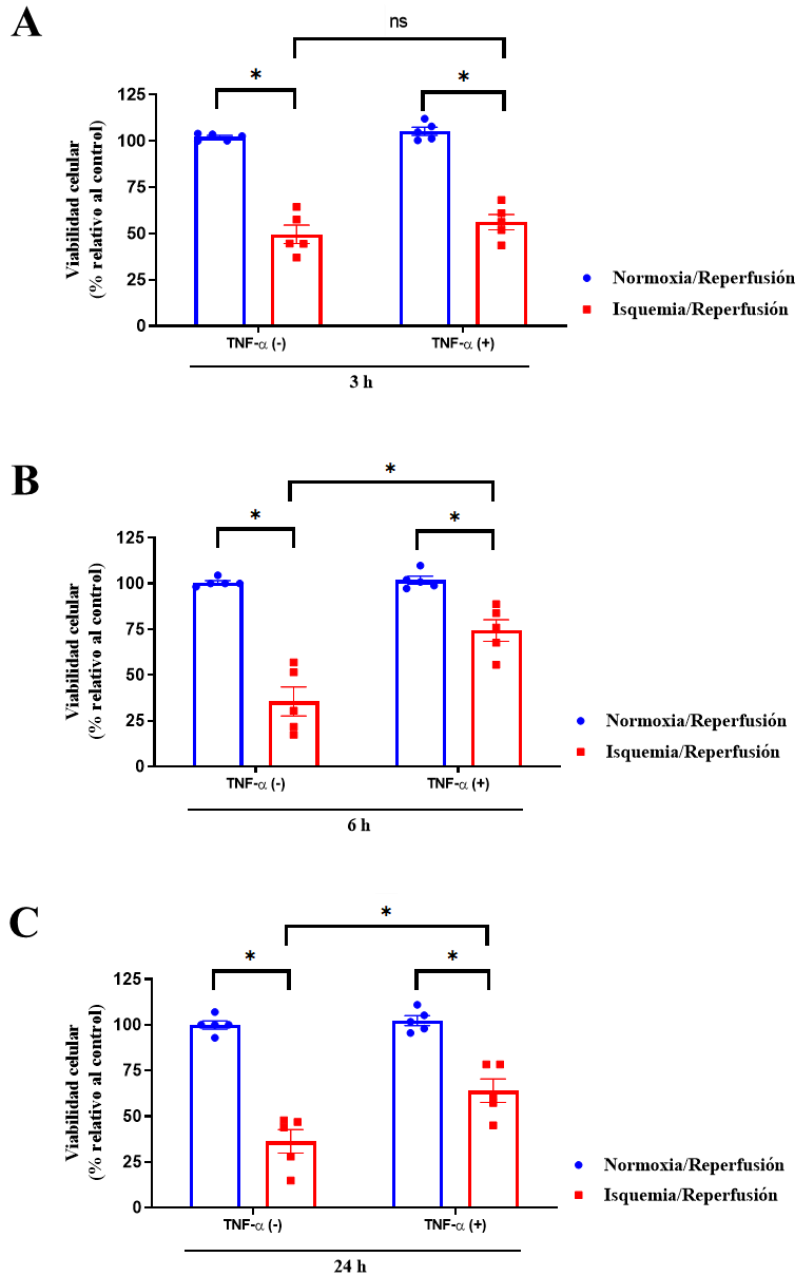


Figura 15. Viabilidad celular por reducción de MTT posterior a I/R simulada en cardiomiocitos preconditionados con $\text{TNF-}\alpha$. A) Precondicionamiento de 3 h. B) Precondicionamiento de 6 h. C) Precondicionamiento de 24 h. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, $*p<0,05$ según se indica, $n=5$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Además, los resultados muestran que no hay diferencias significativas ($p>0.05$) en las condiciones de normoxia/reperfusión entre los cardiomiocitos tratados y no tratados con $\text{TNF-}\alpha$ a los diferentes tiempos (**Figura 15A-C**), confirmando que $\text{TNF-}\alpha$ 10 ng/mL no induce muerte significativa en los cardiomiocitos en relación con las condiciones control.

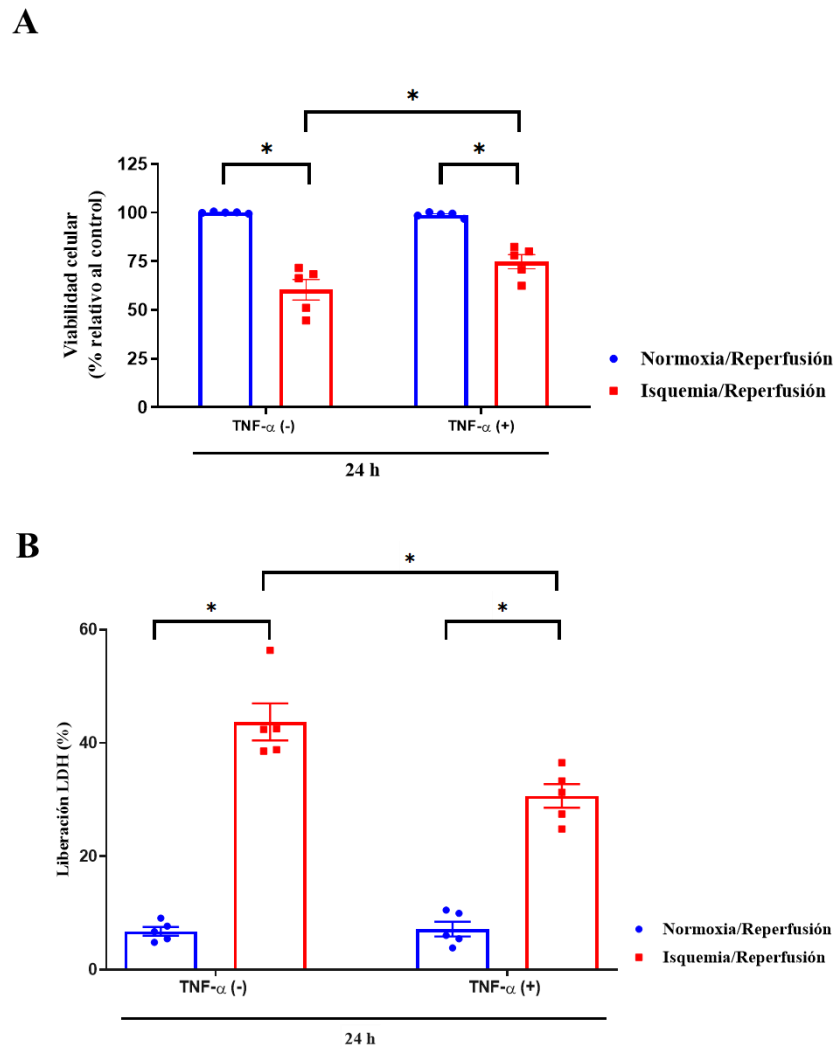


Figura 16. Viabilidad celular de cardiomiocitos posterior al preconditionamiento por 24 h e I/R simulada. A) Exclusión de azul de tripan. B) Liberación de LDH. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, $*p<0,05$ según se indica, $n=5$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Los resultados del ensayo de exclusión de azul de tripán y liberación de LDH para el PC por 24 h con TNF- α mostraron una tendencia similar a los obtenidos en los ensayos de reducción de MTT. Los resultados muestran que la I/R simulada disminuye la viabilidad celular de 100 a 60% y aumenta la liberación de LDH del 7 al 44% en relación con las condiciones control. Además, TNF- α aumenta la viabilidad celular y disminuye la liberación de LDH, reduciendo el daño por I/R en un 14% ($p=0,05$) y 13% ($p=0,01$), respectivamente (**Figura 16A-B**). Estos resultados muestran que el PC con TNF- α 10 ng/mL provee protección frente los daños por I/R simulada en los cardiomiocitos y que se requiere un mínimo de 6 h de PC con TNF- α para evidenciar un efecto protector frente estas condiciones.

Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la cardioprotección frente el daño por I/R simulada inducida por TNF- α

Antecedentes de nuestro Laboratorio mostraron que la proteína VCAM-1 podría tener efectos cardioprotectores al mediar la protección de insulina en cardiomiocitos sometidos a isquemia simulada (Tesis de doctorado de Ariel Diaz, Universidad de Chile) (26). Por lo tanto, una vez demostrado el efecto protector de TNF- α frente el daño por I/R simulada en los cardiomiocitos, se procedió a evaluar si este efecto protector es dependiente de la proteína VCAM-1.

Los resultados de los ensayos de silenciamiento muestran que se logró reducir la expresión de la proteína VCAM-1 en un 72% en presencia de TNF- α (**Figura 17A-B**). Este resultado se confirmó mediante RT-qPCR y se obtuvo un comportamiento similar, un 84% de silenciamiento del gen *VCAM-1* en presencia de TNF- α (**Figura 17C**). Además, el silenciamiento de VCAM-1 parece disminuir la viabilidad de los cardiomiocitos, siendo significativo (15,5%; $p=0,01$) para los cardiomiocitos tratados con TNF- α al medir los niveles intracelulares de ATP (**Figura 17D**).

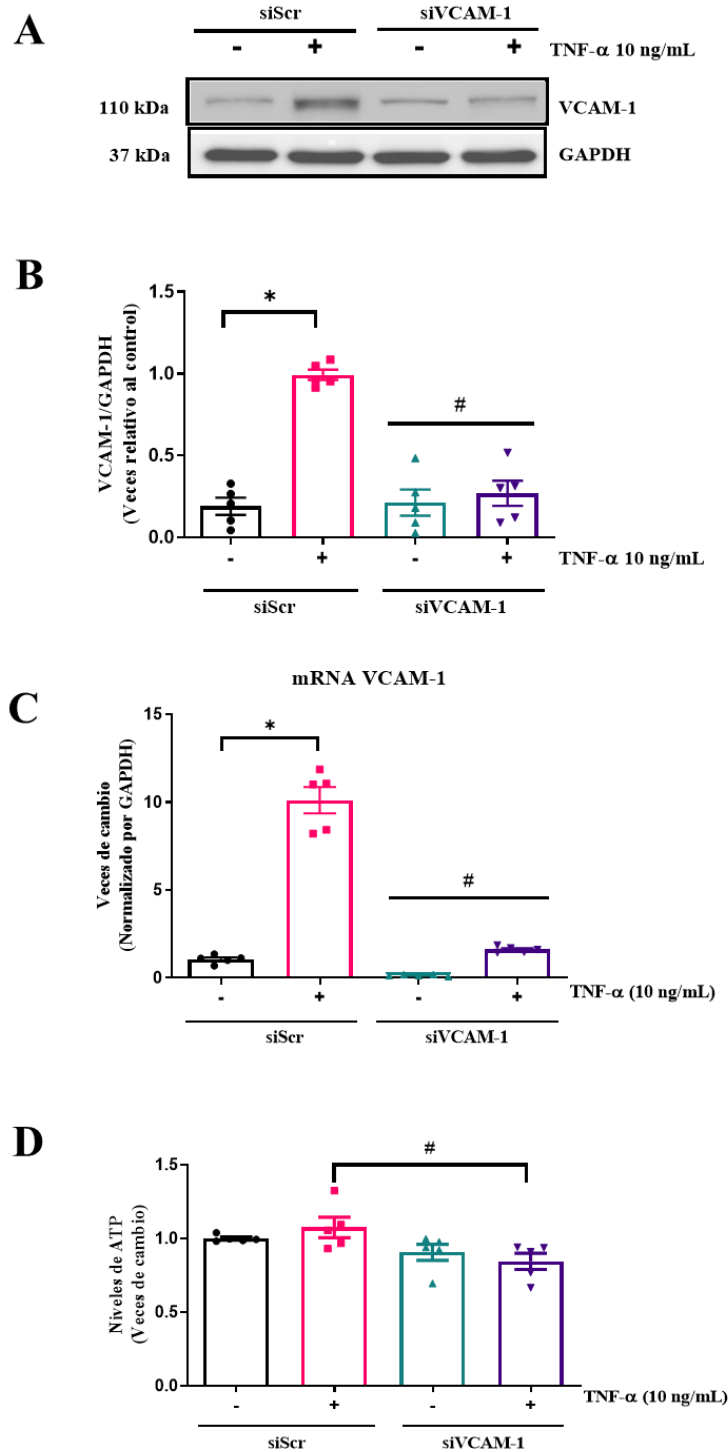


Figura 17. Silenciamiento de VCAM-1 en los cardiomiocitos. A) Western blot proteína VCAM-1, B) Cuantificación proteína VCAM-1, C) Niveles de mRNA de VCAM-1, D) Niveles ATP. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, * $p < 0,05$ vs siScr sin TNF- α , # $p < 0,05$ vs siScr con TNF- α , $n = 5$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Una vez validado el protocolo de transfección, se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento de la proteína VCAM-1 en la cardioprotección frente I/R simulada en cultivos primarios de cardiomiocitos preconditionados con TNF- α . Para este fin, los cardiomiocitos se transfectaron con siVCAM-1 o siScr por 24 h y luego se preconditionaron con TNF- α 10 ng/mL por 24 h. A continuación, los cardiomiocitos se sometieron a 6 h de isquemia simulada y 16 h de reperusión, en ausencia de TNF- α . Posteriormente se determinó viabilidad celular por ensayo de exclusión de azul de tripán y liberación de LDH.

Los resultados de viabilidad celular y liberación de LDH para el control de transfección indican que el PC con TNF- α por 24 h aumenta la viabilidad celular y disminuye la liberación de LDH reduciendo el daño generado por I/R en un 31% ($p=0,05$) y 26% ($p=0,008$), respectivamente (**Figura 18A-B**). Lo anterior concuerda con lo obtenido en los experimentos de cardioprotección en condiciones basales, sin transfectar. Interesantemente, los resultados muestran que en los cardiomiocitos silenciados para la proteína VCAM-1 TNF- α parece disminuir la viabilidad celular y aumentar la liberación de LDH. Sin embargo, estas diferencias no son significativas en las condiciones de I/R simulada entre las células tratadas y no tratadas con TNF- α (**Figura 18A-B**).

En resumen, estos resultados confirman que el PC con TNF- α 10 ng/mL provee protección frente los daños por I/R simulada en los cardiomiocitos y que este efecto protector de TNF- α se pierde cuando se silencia la proteína VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata. Estos resultados sugieren que la proteína de adhesión VCAM-1 estaría mediando el papel cardioprotector de TNF- α frente el daño por I/R simulada.

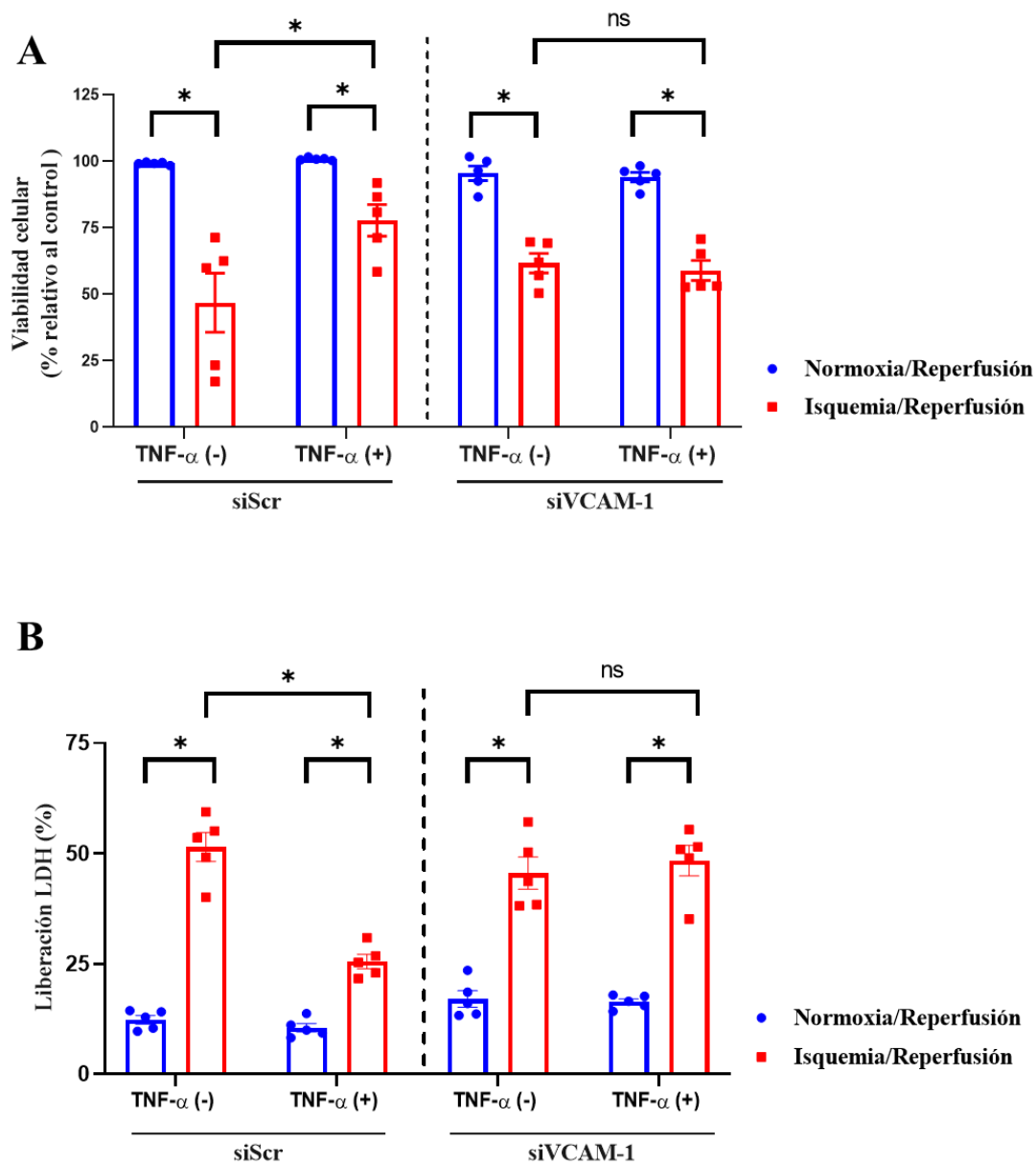


Figura 18. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la cardioprotección frente I/R en cardiomiocitos preconditionados con TNF- α . A) Ensayo exclusión de azul de tripán. B) Ensayo actividad de LDH. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak * $p < 0,05$ según se indica, $n = 5$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes asociados a sobrevida y cardioprotección frente I/R

Se ha descrito ampliamente el daño por I/R en los cardiomiocitos, se sabe que ocasiona diferentes cambios bioquímicos como ser un aumento en la producción de ROS, sobrecarga de calcio, peroxidación de lípidos, daño oxidativo al DNA, lo que conduce finalmente a disfunción y muerte celular (68).

El resultado de que VCAM-1 media el efecto protector del TNF- α frente el daño por I/R en los cardiomiocitos, plantea la interrogante de cuál sería el probable mecanismo que estaría implicado en este efecto cardioprotector de VCAM-1. De forma exploratoria y como parte final de este trabajo de tesis, se evaluó el efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de ciertos genes asociados con sobrevida y cardioprotección frente daños por hipoxia o I/R (34, 47, 69, 70).

Se determinó, mediante RT-qPCR, la expresión de genes proinflamatorios como ser TNF- α , IL-6, TNFR1 y TNFR2 en cardiomiocitos a los que se les había silenciado la proteína VCAM-1. También se midió la expresión de genes asociados con la respuesta antioxidante como ser el factor nuclear eritroide relacionado con el factor 2 (Nrf2), superóxido dismutasa 2 (SOD2), catalasa (CAT) y hemooxigenasa-1 (HO-1).

Los resultados muestran que TNF- α 10 ng/mL aumenta la expresión de su propio mRNA e IL-6 en los cardiomiocitos silenciados para VCAM-1 y el control de transfección. Sin embargo, el silenciamiento de VCAM-1 reduce en un 35% ($p=0,060$) los niveles del mRNA de estas citoquinas proinflamatorias en las células tratadas con TNF- α (**Figura 19A-B**). Por otro lado, los resultados muestran que TNF- α aumenta el mRNA de SOD2 y que el silenciamiento de VCAM-1 reduce en un 26% ($p=0,02$) los niveles n del mRNA de esta enzima antioxidante en los cardiomiocitos silenciados para VCAM-1 y el control de transfección (**Figura 20B**). No se encontraron diferencias

significativas en la expresión del mRNA de TNFR1, TNFR2, Nrf2, CAT y HO-1 en los cardiomiocitos silenciados para VCAM-1 en comparación con los controles de transfección (Figura 19C-D, Figura 20A-D).

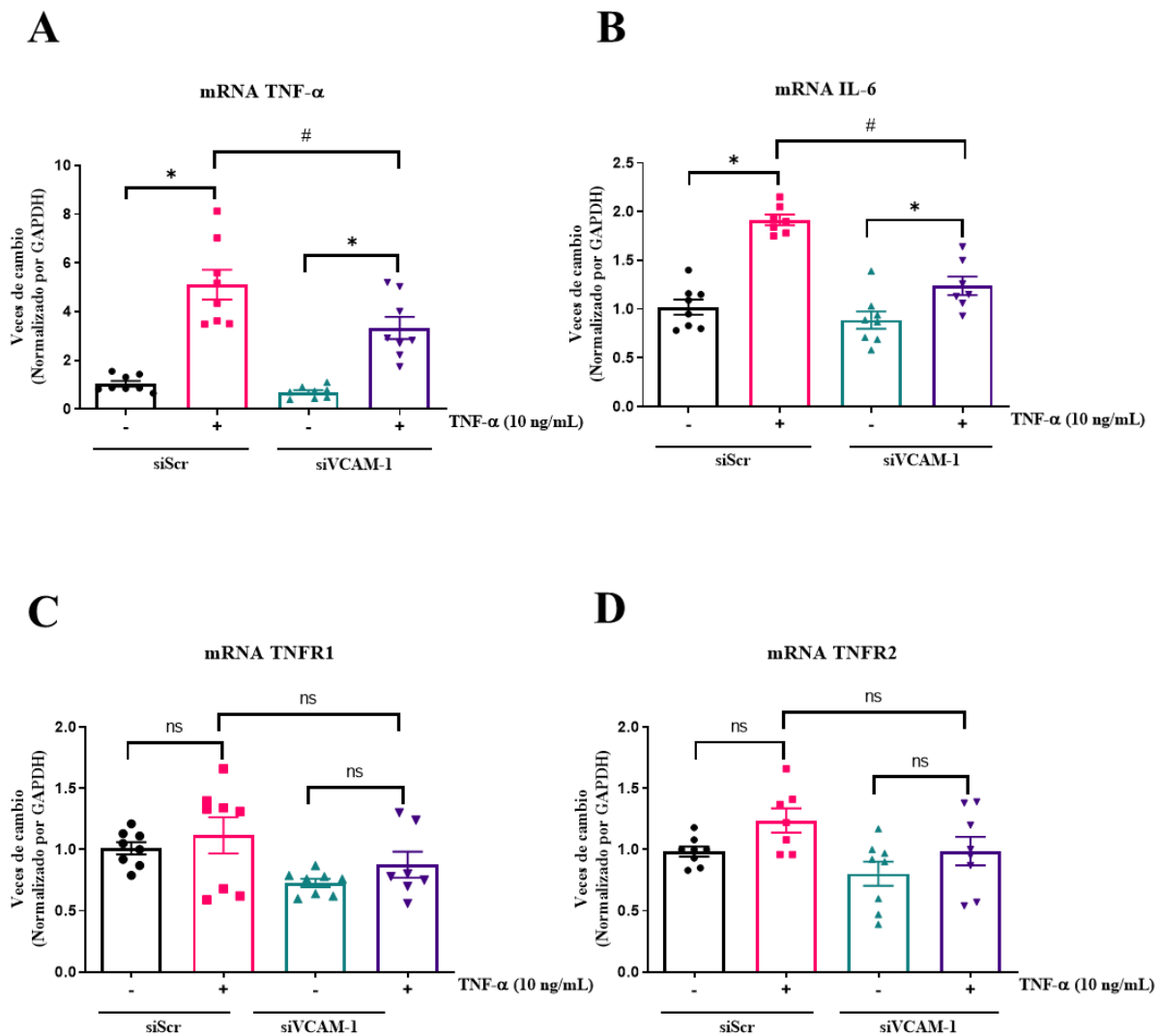


Figura 19. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes proinflamatorios en cardiomiocitos preconditionados con TNF- α . A) Niveles relativos mRNA de TNF- α ; B) Niveles relativos mRNA de IL-6; C) Niveles relativos mRNA de TNFR1; D) Niveles relativos mRNA de TNFR2. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, * $p < 0,05$ vs control respectivo, # $p < 0,05$ vs siScr con TNF- α , $n \geq 7$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

7. Discusión

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria producida en diferentes tipos de células cardíacas, es responsable de funciones biológicas esenciales para estas células y además se asocia con la fisiopatología de diversas ECVs (35, 36) Esta citoquina presenta un comportamiento tipo “*Janus*” de muerte/sobrevida que depende de la concentración, duración del estímulo y tipo de receptor implicado (47). Nuestros resultados muestran que el tratamiento por 24 h con TNF- α a concentraciones entre 1- 100 ng/mL no induce muerte significativa de los cardiomiocitos, mientras que concentraciones de 500 ng/mL reduce significativamente su viabilidad celular. Este resultado se condice con la paradoja muerte/sobrevida de TNF- α descrita anteriormente y coincide con lo reportado por otros autores, quienes han descrito que TNF- α a bajas concentraciones no estimula muerte de los cardiomiocitos si no que más bien ejerce un papel cardioprotector (34, 47, 71).

Sin embargo, al comparar nuestros resultados con lo reportado en la literatura, encontramos diferencias en cuanto a las concentraciones descritas como inocuas. Algunos autores asocian concentraciones de 1 – 5 ng/mL de TNF- α con cardioprotección, concentraciones $>6 – 50$ ng/mL con muerte del cardiomiocito y concentraciones >100 ng/mL con hipertrofia y apoptosis del cardiomiocito (53, 71). Aunque está claro que esta paradoja muerte/sobrevida depende de la concentración de TNF- α , resulta difícil establecer un punto de corte para delimitar lo que correspondería a bajas o altas concentraciones de esta citoquina. La dificultad para establecer este consenso podría explicarse por la utilización de diferentes modelos de estudio para evaluar los efectos de TNF- α . La literatura reporta la utilización de cultivos primarios de cardiomiocitos, línea celular de mioblastos H9C2 y la línea de cardiomiocitos de ratón HL-1. En general, las líneas celulares H9C2 y HL-1 parecen ser más sensibles a los efectos de TNF- α que los cultivos primarios de cardiomiocitos (71). Si bien estas líneas celulares presentan múltiples ventajas y se utilizan para

estudiar aspectos de la fisiología y patología cardíacas, es importante considerar sus diferencias y limitaciones en relación con los cardiomiocitos. Las células H9C2 se consideran mioblastos cardíacos derivados de un tumor cardíaco de rata y que se comportan más bien como una línea de células musculares esqueléticas, mientras que las células HL-1 se consideran miocitos auriculares derivados de la aurícula derecha del corazón de ratón (72). De acuerdo con el origen, fenotipo y fisiología de estas líneas celulares, éstas no son completamente representativas de los cultivos primarios de cardiomiocitos (72, 73).

En este trabajo se utilizaron diferentes métodos para estimar la viabilidad celular de los cardiomiocitos tratados con TNF- α . Si bien nuestros resultados indican que esta citoquina a concentraciones de 1 – 100 ng/mL no induce muerte significativa de estas células, los resultados del ensayo de reducción de MTT parecen ser más drásticos que los obtenidos con el ensayo de exclusión de azul de tripán. Las diferencias observadas entre ambos ensayos de viabilidad pueden explicarse por el fundamento que utiliza cada ensayo, sus ventajas y limitaciones. El azul de tripán es un ensayo en el que las células muertas absorberán el colorante cargado negativamente debido a sus membranas dañadas, mientras que las células vivas lo excluirán. Sin embargo, con este ensayo, las células que todavía están vivas pero que pierden su función no se tiñen; esto podría subestimar la viabilidad celular y también puede haber errores de conteo (74). El MTT es un ensayo en el que las células viables reducen el MTT a un formazán precipitado de color púrpura, que luego se solubiliza antes de medir la absorbancia. Este ensayo estima la actividad metabólica de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. El MTT tiene mayor sensibilidad, pero también puede sobreestimar la viabilidad celular al detectar precozmente las células dañadas (74). La medición de ATP intracelular se basa en la reacción de luciferina/luciferasa produciendo una señal luminiscente, es un ensayo rápido de usar, el más sensible y menos propenso a artefactos que otros ensayos de viabilidad. Aunque en este estudio se utilizó la medición de las concentraciones

intracelulares de ATP para evaluar la viabilidad celular, algunos autores proponen que un aumento en los niveles de ATP podría indicar el inicio de la muerte celular por apoptosis (74, 75). Además, se evaluó la muerte celular por necrosis mediante la liberación de LDH. Este es un ensayo enzimático colorimétrico muy utilizado para evaluar viabilidad celular en los ensayos de I/R simulada, dado que es un marcador soluble fácilmente medible en los sobrenadantes celulares y además da cuenta de la magnitud del daño en las células (56). Es importante hacer notar que no se evaluó apoptosis en nuestro modelo de estudio, esto porque nuestros resultados mostraron que TNF- α a concentraciones <100 ng/mL no induce muerte de los cardiomiocitos. Además, el objetivo de este trabajo no era caracterizar los mecanismos de muerte celular inducidos por TNF- α o I/R sino más bien mostrar el papel de VCAM-1 en la cardioprotección inducida por TNF- α .

Antecedentes de nuestro laboratorio (Tesis de doctorado de Ariel Díaz, Universidad de Chile), plantearon que la proteína VCAM-1 podría estar involucrada en los mecanismos de protección del cardiomiocito isquémico (26). Por tal razón, se indagó el efecto que tiene TNF- α en la expresión de VCAM-1. Se ha descrito que TNF- α induce un aumento en la expresión de esta proteína de adhesión en diferentes tipos celulares, entre ellos: fibroblastos cardíacos (67), células musculares lisas de tráquea humana (76), células endoteliales de aorta de rata (77) y células troncales mesenquimales (78). En cardiomiocitos neonatos hay muy pocos estudios sobre el efecto de TNF- α en la expresión de VCAM-1. Kacimi et al., mediante análisis por Northern blot, mostraron que TNF- α (10 ng/mL por 6 h) incrementa los niveles de mRNA de VCAM-1 de forma tiempo dependiente en cardiomiocitos de ratas neonatas (79). Por otro lado, Chao et al., describieron que TNF- α (50 ng/mL por 2 h) incrementa los niveles de mRNA de VCAM-1 en cardiomiocitos infectados con vectores adenovirales (80). Sin embargo, estos estudios no evaluaron el efecto de TNF- α en los niveles proteicos de VCAM-1; limitando su interpretación sobre la expresión de VCAM-1.

Nuestros resultados muestran que 10 y 100 ng/mL de TNF- α estimula un aumento en los niveles proteicos de VCAM-1 en el cardiomiocito y que este efecto es dependiente tanto de la concentración y el tiempo de tratamiento. Estos resultados son consistentes con lo descrito para otros tipos celulares como células endoteliales (11, 13, 77). Con este resultado, se seleccionó el tratamiento con 10 ng/mL TNF- α durante 24 h para los experimentos subsiguientes debido a que 10 ng/mL es la concentración más baja en la cual no se ve afectada la viabilidad de los cardiomiocitos, pero si hubo un aumento significativo en los niveles proteicos de VCAM-1.

Adicionalmente, se midieron los niveles de mRNA de VCAM-1, observándose un incremento significativo a partir de las 6 h y que se mantuvo hasta las 48 h en relación con el control. Este resultado es similar al descrito por otros autores (79, 80), y se correlaciona con la expresión de proteína de VCAM-1 en los cardiomiocitos. Además, nuestros resultados muestran que los niveles proteicos de VCAM-1 disminuyen significativamente al inhibir la transcripción y la traducción con actinomicina D y cicloheximida, respectivamente. En conjunto, los resultados sugieren que el aumento en la expresión de VCAM-1 inducido por TNF- α ocurría mediante un mecanismo transcripcional, similar a lo reportado por Lin et al., (67). Por otro lado, se ha descrito que TNF- α en los medios de cultivo tiene una vida media que dura entre unos pocos minutos a horas, hasta 8 h en plasma con EDTA (81). La vida media de esta citoquina se puede ver afectada por múltiples factores como el pH del medio, la temperatura de incubación, presencia de inhibidores y concentración del TNF- α utilizada. Además, nuestros resultados muestran que TNF- α induce su propia expresión, lo cual podría contribuir a mantener un efecto sostenido de TNF- α durante el tiempo de estímulo. Sin embargo, al evaluar la estabilidad del mRNA de VCAM-1 los resultados muestran que TNF- α no aumenta la estabilidad del mRNA de VCAM-1 en los cardiomiocitos. A diferencia de IL-4 e IL-13 que se ha reportado que aumentan la estabilidad del mRNA de VCAM-1 en otros tipos celulares (82).

En este trabajo se estudiaron los niveles de mRNA y proteína de VCAM-1. Sin embargo, para los receptores de TNF- α , las citoquinas TNF- α e IL-6 y genes asociados a sobrevida (SOD2, Nrf2, CAT, HO-1) solamente se midieron los niveles de mRNA, asumiendo que se podrían correlacionar con los niveles proteicos correspondientes. En general, la expresión de un gen se refiere al proceso por el cual la información genética contenida en el DNA es utilizada para producir un producto funcional, ya sea una proteína o un RNA no codificante (83). La diferencia principal entre la expresión de un gen y los niveles de mRNA radica en el hecho de que la expresión génica implica tanto la transcripción del DNA en mRNA como la traducción del mRNA en proteínas, mientras que los niveles de mRNA se refieren específicamente a la cantidad de mRNA presente en una célula en un momento dado. Es frecuente que los estudios de expresión diferencial de mRNA asuman implícitamente que cambios en la expresión de mRNA se correlacionan con cambios en los niveles de proteína. Sin embargo, es importante destacar que los niveles de mRNA no siempre reflejan directamente los niveles de proteínas correspondientes. Pueden existir mecanismos de regulación postranscripcional que afecten la estabilidad del mRNA o la eficiencia de la traducción, lo que puede dar lugar a una discrepancia entre los niveles de mRNA y los niveles de proteínas producidas a partir de ese mRNA específico. De todas maneras, la correlación entre niveles de mRNA y expresión de proteínas dependerá de cada gen y de las condiciones experimentales involucradas (83).

En relación con la señalización y efectos de TNF- α , se ha descrito ampliamente que TNF- α es una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel importante en la fase temprana de la inflamación y que participa en los mecanismos fisiopatológicos de las ECVs (84). Sin embargo, evidencias de estudios clínicos con terapias anti-TNF- α como el receptor soluble de TNF- α “Etanercept” o anticuerpos neutralizantes de esta citoquina no resultaron beneficiosos para los pacientes con insuficiencia cardiaca, ambas terapias mostraron resultados desfavorables y en

algunos casos empeoraron la situación clínica de los pacientes (84). Estos hallazgos sugieren que TNF- α ejerce un papel dual en la insuficiencia cardiaca, mostrando efectos patogénicos y cardioprotectores (84, 85). Diversos estudios han mostrado que el corazón es un órgano blanco y productor de TNF- α (84). Esta citoquina se produce en dos formas el TNF- α soluble y el TNF- α de membrana, ambos se ensamblan como homotrímeros para ejercer sus funciones biológicas (86, 87). El TNF- α es un ligando que se une a dos tipos de receptores, TNFR1 y al TNFR2, en la superficie celular para luego desencadenar cascadas de señales hasta regular una variedad de efectos biológicos (36, 41). Si bien ambos receptores se expresan en la membrana celular, al igual que el TNF- α pueden liberarse en formas solubles con la habilidad de unirse y neutralizar la actividad del TNF- α soluble circulante (86).

La mayoría de las células expresan constitutivamente el TNFR1, sin embargo, el TNFR2 puede ser inducido por estímulos proinflamatorios en células inmunes o incluso en la mayoría de las células cardíacas, incluyendo cardiomiocitos (85). La activación de TNFR1 o TNFR2 depende de la biodisponibilidad de la forma soluble y de membrana de TNF- α , la forma soluble presenta mayor afinidad al TNFR1, mientras que la forma de membrana activa principalmente al TNFR2 (86). En general, la mayoría de los mecanismos cardioprotectores de TNF- α son mediados por TNFR2 y la señalización vía TNFR1 es dañina para las células cardíacas (85). En este sentido, diversos estudios han mostrado que altas concentraciones de TNF- α inducen disfunción contráctil e insuficiencia cardiaca, principalmente a través de su receptor TNFR1. Interesantemente, se ha descrito que bajas concentraciones de TNF- α mejoran la función contráctil a través de la activación del TNFR1 y que el TNF- α endógeno contribuye a la cardioprotección por preconditionamiento isquémico a través de ambos receptores (85). Algunos autores han establecido que TNF- α confiere protección mediante sus dos tipos de receptores, TNFR1 y TNFR2, y que el efecto deletéreo o beneficioso de TNF- α depende de su concentración y duración de la exposición (85). Ambos

receptores poseen diferentes estructuras y secuestran diversas proteínas adaptadoras. El TNFR1 contiene un dominio de muerte en su región citoplásmica y posee una diversidad en su señalización. Cuando forma el complejo I a nivel de la membrana celular puede desencadenar la activación de MAPKs y NF- κ B, favoreciendo el desarrollo de inflamación, proliferación celular, sobrevida y defensa contra patógenos (84, 86). No obstante, la formación del complejo II en el citoplasma desencadena la apoptosis o necroptosis (86). En cambio, el TNFR2 recluta a TRAF2 y otras proteínas con lo que activa a vías de señalización como NF- κ B, Akt y MAPKs conduciendo a proliferación celular, regeneración de tejidos y sobrevida (86).

Nuestros resultados muestran que bajas concentraciones de TNF- α soluble aumentan la expresión de VCAM-1 a través del receptor TNFR1 y no del TNFR2. Interesantemente, como se discutirá más adelante esta inducción de VCAM-1 estaría vinculada al mecanismo cardioprotector de TNF- α y no con muerte celular del cardiomiocito. Además, el silenciamiento del receptor TNFR2 parece aumentar la expresión de TNF- α en relación con la condición control. Si bien este aumento no resultó ser estadísticamente significativo, estaría indicando que TNFR2 podría contrarregular a TNFR1 y así evitar el aumento en los niveles de TNF- α . Este mecanismo de contrarregulación y conversación cruzada entre TNFR2 y TNFR1 ha sido planteada por otros autores, sin embargo aún no está bien establecido (84).

Por otro lado, diferentes vías de señalización se han asociado con la inducción de la expresión de VCAM-1. Por ejemplo: a) activación de NF- κ B mediante transactivación mediada por c-Src de la cascada EGFR/PI3K/Akt en fibroblastos cardíacos (67); b) activación de ERK1/2, p38MAPK, JNK, NF- κ B y p300 en células musculares lisas de tráquea (76); c) activación de AP-1 mediante inducción dependiente de PKC α de la cascada Nox/ROS/MAPK en fibroblastos cardíacos (88). Considerando las vías de señalización que intervienen en el preconditionamiento por TNF- α e inducción de VCAM-1, nuestra hipótesis planteó que bajas concentraciones de TNF-

α podría estimular la expresión de VCAM-1 mediante la activación de la vía JAK2/STAT3 a través del receptor TNFR2. Nuestros resultados muestran que TNF- α induce activación de STAT3 y la vía canónica de NF- κ B en el cardiomiocito. Además, promueve activación de Akt y ERK1/2. Lo anterior concuerda de forma parcial con lo descrito por Lecour et al., quienes establecieron que TNF- α induce directamente a STAT3 de forma independiente de la vía RISK y sus proteínas efectoras Akt y ERK1/2 (89). Por otro lado, nuestros hallazgos serían contrarios a lo descrito para células endoteliales de aorta, donde se describió que ERK1/2 y Akt son reguladores negativos de la expresión de VCAM-1, ya que la pérdida o “down regulation” de estas vías incrementan los niveles de VCAM-1 (77, 90).

Además, nuestros resultados sugieren que la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito es dependiente del TNFR1 y que en nuestro modelo esta proteína de adhesión estaría mediando los efectos cardioprotectores de TNF- α . Estos resultados son también contrarios a la literatura que asocian al TNFR1 con muerte celular y al TNFR2 con protección y supervivencia (40, 41). Con estos hallazgos se rechaza la hipótesis planteada, debido que los resultados sugieren que bajas concentraciones de TNF- α estimula la expresión de VCAM-1 a través de la vía TNFR1/JAK2/STAT3.

Se sabe que TNF- α ejerce una acción dual en el corazón, incluyendo tanto efectos inotrópicos negativos como cardioprotectores (40). Este papel dual del TNF- α depende de la activación diferencial de sus receptores, TNFR1 o TNFR2, ambos presentes en cardiomiocitos (87). Además, TNF- α a bajas concentraciones tiene un efecto protector de los cardiomiocitos ante la exposición posterior a cierto tipo de daños como I/R (91). En este estudio evaluamos el efecto protector de bajas concentraciones de TNF- α frente el daño por I/R en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

Es ampliamente descrito que la cardioprotección frente I/R puede ser inducida mediante diversas estrategias como ser: preconditionamiento isquémico o farmacológico, post condicionamiento isquémico y condicionamiento isquémico remoto (28). Dependiendo del momento en que se haga la intervención y el estímulo utilizado para gatillar este efecto cardioprotector. Los mecanismos que subyacen tras cada una de estas estrategias cardioprotectoras son diferentes, aunque hay puntos en los cuales convergen (28). El preconditionamiento farmacológico con TNF- α simula el preconditionamiento isquémico y confiere protección frente I/R (92). Nuestros resultados muestran que el preconditionamiento con TNF- α 10 ng/mL protege a los cultivos primarios de cardiomiocitos frente el daño por I/R, similar a lo que han reportado otros autores utilizando modelos *ex vivo*, *in vivo* y líneas celulares H9C2 (34, 47, 89, 91). Encontramos que se necesita un tiempo mínimo de preconditionamiento de 6 h con TNF- α para observar un efecto protector de los cardiomiocitos. Este resultado estaría relacionado con las fases descritas para el preconditionamiento cardíaco, en el sentido que se necesitan tiempos mínimos para inducir la síntesis de proteínas citoprotectoras (27–30). Interesantemente, esta temporalidad se condice con el tiempo en el cual se observó un aumento significativo de mRNA y proteína de VCAM-1 en los cardiomiocitos. Además, en nuestro modelo de estudio observamos un 20-25% de protección de los cardiomiocitos frente I/R, similar al reportado por otros autores (56). Sin embargo, no se puede establecer un porcentaje específico de cardioprotección *in vitro* que sea relevante biológicamente. Para dilucidar este punto, se requieren estudios adicionales, como modelos preclínicos en animales y ensayos clínicos en humanos. No obstante, cabe destacar que el objetivo de esta tesis no fue evaluar la eficacia del preconditionamiento con TNF- α , sino más bien describir el papel de la proteína VCAM-1 en la cardioprotección inducida por TNF- α frente I/R.

Se han postulado diferentes mecanismos que explican la cardioprotección inducida por TNF- α , entre ellos: a) señalización por esfingolípidos (91); b) activación de PKA y fosfolambán

para prevenir sobrecarga de calcio (54); c) activación del factor transcripcional STAT3 y mantención de la integridad mitocondrial (44). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no se ha descrito la expresión de proteínas de adhesión tipo VCAM-1 como mecanismo de cardioprotección inducido por TNF- α . Interesantemente, los resultados muestran que VCAM-1 media el efecto protector de TNF- α frente el daño por I/R debido a que su silenciamiento en los cardiomiocitos se pierde el efecto protector de TNF- α en comparación con las condiciones control. Este hallazgo sugiere un nuevo mecanismo por el cual TNF- α podría conferir cardioprotección y valida nuestra hipótesis sobre VCAM-1 como mecanismo de protección de los cardiomiocitos frente el daño por I/R simulada. Sin embargo, es necesario estudiar el mecanismo por el que VCAM-1 podría mediar estos efectos cardioprotectores frente I/R. Al revisar la literatura, no encontramos reportes sobre cardioprotección mediada por VCAM-1. A excepción de antecedentes de nuestro laboratorio que asociaron a VCAM-1 con la protección inducida por insulina en cardiomiocitos isquémicos (Tesis de Doctorado de Ariel Díaz , Universidad de Chile) (26). En cambio, se ha reportado que en algunos tipos de cáncer la activación de VCAM-1 se asocia con sobrevida celular (93, 94).

La proteína VCAM-1 es una proteína transmembrana de tipo I que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y su función principal es mediar la adhesión y migración de los leucocitos desde la sangre hacia los tejidos inflamados (5, 10). Sin embargo, en los últimos años se ha reportado que VCAM-1 también podría ser responsable de gatillar procesos de transducción de señales al interior de la célula y de esta manera activar vías asociadas con sobrevida (93, 95). VCAM-1 se une a las integrinas $\alpha 4\beta 1$ (también conocida como *Very Late Antigen-4*, VLA-4) y $\alpha 4\beta 7$ en leucocitos circulantes y ancla estas células a la superficie luminal del endotelio (93). A través de estas interacciones, VCAM-1 media el movimiento de leucocitos desde la sangre hacia los tejidos, un proceso que es activo durante las respuestas inflamatorias (5). Por otra parte, se ha reportado la expresión anormal de VCAM-1 en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer

de mama, cervicouterino, gástrico, carcinoma renal y melanomas. Se ha postulado que VCAM-1 podría tener un papel en la progresión de estos tipos de cáncer (93, 96).

Interesantemente, Chen et al. reportaron que el dominio citoplásmico es el responsable de la función de VCAM-1 en la activación de vías de señalización asociadas con sobrevida. Sus resultados muestran que la interacción integrinas α 4-VCAM-1 promueven la sobrevida de las células cancerosas a través de la activación de la vía PI3K/Akt por el dominio citoplasmático de VCAM-1 (93). Durante la trasmigración leucocitaria, VCAM-1 en las células endoteliales se puede comunicar con las proteínas citoplasmáticas ezrina y moesina, y gatillar la activación de Rac1 (5). Los resultados descritos por Chen et al. indican que el *clustering* de VCAM-1 en células de cáncer de mama median la fosforilación de ezrina, la unión de Akt a ezrina y la fosforilación de Akt en S473 para activar señalización de sobrevida (93). Adicionalmente, VCAM-1 también puede interaccionar con otras moléculas de membrana como CD44 y las tetraspaninas CD9, CD81 y CD151 (5, 94, 95), lo que podría complejizar las vías de señalización activadas por la proteína de adhesión VCAM-1. En su conjunto, estos antecedentes sugieren que VCAM-1 podría mediar los efectos cardioprotectores frente I/R a través de su activación por interacción con moléculas en la membrana como las integrinas α 4, la fosforilación de ezrina y activación de vías de señalización de sobrevida como la vía PI3K/Akt.

Finalmente, nuestros resultados muestran que en los cardiomiocitos TNF- α aumenta significativamente la expresión de su propio mRNA, el de IL-6 y SOD2. Interesantemente, el silenciamiento de la proteína VCAM-1 reduce la expresión del mRNA de estas moléculas en las células tratadas con TNF- α . Como se describió anteriormente, las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 desempeñan múltiples funciones en el organismo, incluido el corazón y los cardiomiocitos (84, 85). No obstante, nos resultó muy interesante la conexión entre VCAM-1 y SOD2. Es ampliamente descrito que la superóxido dismutasa 2 (SOD2) es una enzima que

desempeña un papel importante en la protección de las células frente el estrés oxidativo al convertir el radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (70, 97). La expresión de SOD2 es comúnmente regulada por el factor de transcripción Nrf2 a través de diversas vías de señalización. Una de las más descritas es la vía PI3K/Akt, que puede aumentar la expresión de SOD2 a través de la activación de Nrf2 (70, 97). De igual manera, CD44 puede aumentar la expresión de SOD2 a través de la vía STAT3/cMyc (97). Con todo esto, la evidencia disponible sugiere que VCAM-1 podría regular la respuesta antioxidante al inducir un efecto regulatorio positivo en la expresión de SOD2 y de esta manera explicar, en parte, su papel cardioprotector frente I/R. Sin embargo, nuevos estudios deberán dilucidar el mecanismo por el cual VCAM-1 podría regular la actividad de SOD2, las condiciones bajo las cuales ocurría este mecanismo y su contribución en la protección de los cardiomiocitos frente el daño por I/R.

8. Conclusiones

Como conclusiones de esta tesis podemos plantear:

- El tratamiento con TNF- α , a concentraciones entre 1 – 100 ng/mL por 24 h, no estimula significativamente la muerte del cardiomiocito.
- TNF- α induce la expresión del mRNA y proteína de VCAM-1 en el cardiomiocito a través de un mecanismo transcripcional. Este mecanismo depende del receptor TNFR1 y en parte de la vía de señalización JAK2/STAT3, rechazando la hipótesis de este trabajo.
- TNF- α activa vías de señalización asociadas con sobrevida y protección en los cardiomiocitos, entre ellas las vías de NF- κ B, STAT3, Akt y ERK1/2.
- TNF- α 10 ng/mL provee protección frente los daños por I/R simulada en los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata, requiriéndose de un mínimo de 6 h para evidenciar un efecto protector frente estas condiciones.
- La proteína de adhesión VCAM-1 media el papel cardioprotector de TNF- α frente el daño por isquemia/reperfusión en el cardiomiocito.
- El silenciamiento de VCAM-1 en el cardiomiocito reduce la expresión de *SOD2*, *TNF- α* e *IL-6*, genes asociados a sobrevida y protección frente estrés oxidativo. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis que VCAM-1 desempeña un papel cardioprotector en el cardiomiocito, y al parecer es regulando la respuesta antioxidante a través de SOD2.

Así, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) a concentraciones de 10 ng/mL estimula la expresión de VCAM-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata como mecanismo de protección frente el daño por isquemia/reperfusión, a través de la vía de señalización TNFR1/JAK2/STAT3. Sin embargo, nuestros datos aún son insuficientes para concluir si VCAM-

1 induce cardioprotección frente el daño por isquemia/reperfusión al regular positivamente la respuesta antioxidante a través de la enzima SOD2 (Figura 21).

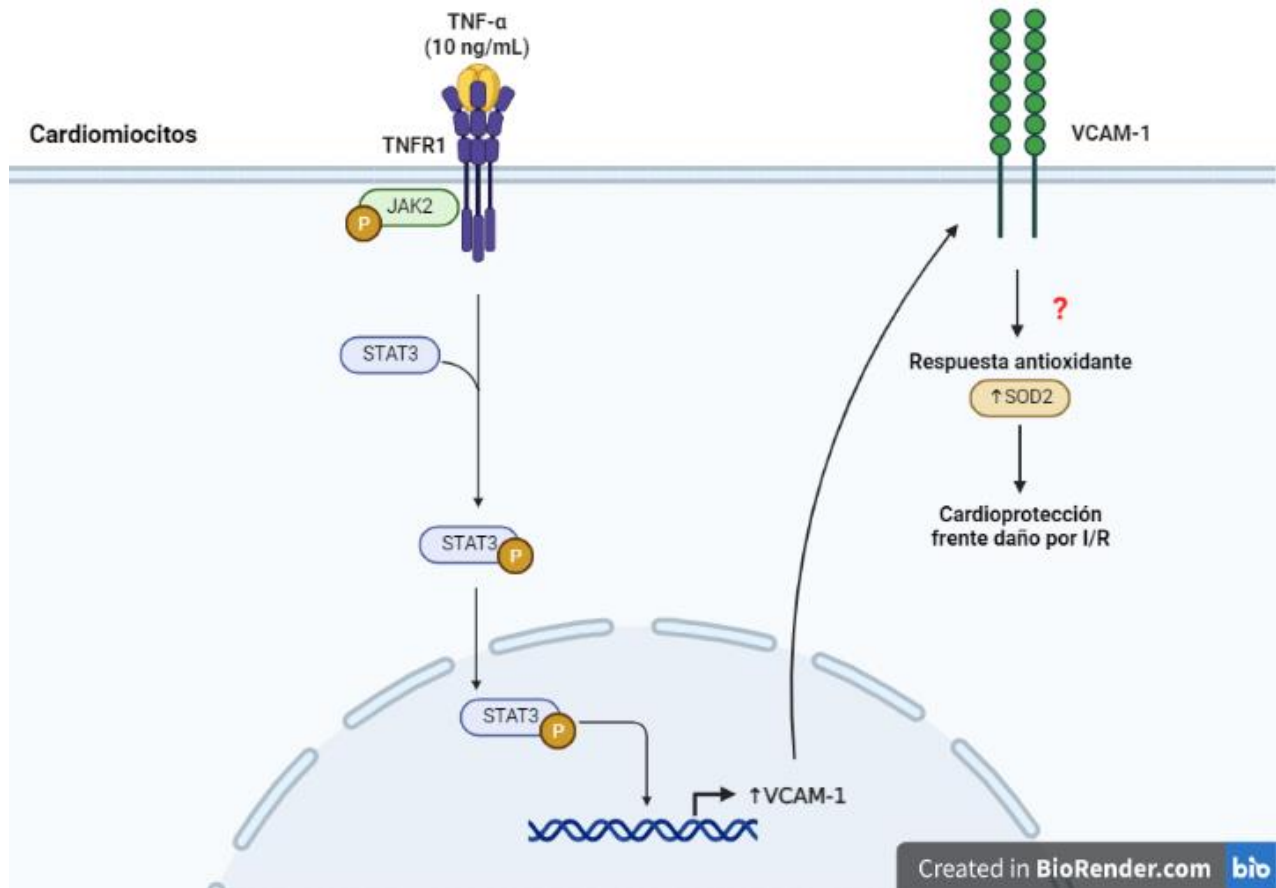


Figura 21. Modelo final. Proteína VCAM-1 en la sobrevida del cardiomiocito preconditionado con TNF- α frente el daño por isquemia/reperfusión.

9. Limitaciones del estudio

- En los experimentos con inhibidores de STAT3, faltó incluir la condición “inhibidor sin TNF- α ” para descartar un posible efecto sinérgico entre TNF- α y los inhibidores.
- En los experimentos de expresión génica, se evaluó únicamente cambios en los niveles de mRNA de TNFR1, TNFR2, TNF- α , IL-6, SOD2, Nrf2, HO-1 y CAT. No se evaluaron los niveles de estas proteínas.
- En los experimentos de isquemia/reperfusión no se investigó muerte por apoptosis. Solamente se evaluó viabilidad celular por reducción de MTT, exclusión de azul de tripán y liberación de LDH.
- El efecto del silenciamiento de VCAM-1 en genes asociados a sobrevida solo se indagó de manera exploratoria. Faltan más estudios para dilucidar las vías de señalización involucradas y el mecanismo por el cual VCAM-1 estaría ejerciendo cardioprotección.
- Todos los resultados corresponden a experimentos *in vitro*, sería importante validar estos hallazgos en modelos *in vivo* en ratones *knockout* cardioespecíficos para VCAM-1.

10. Figuras anexas

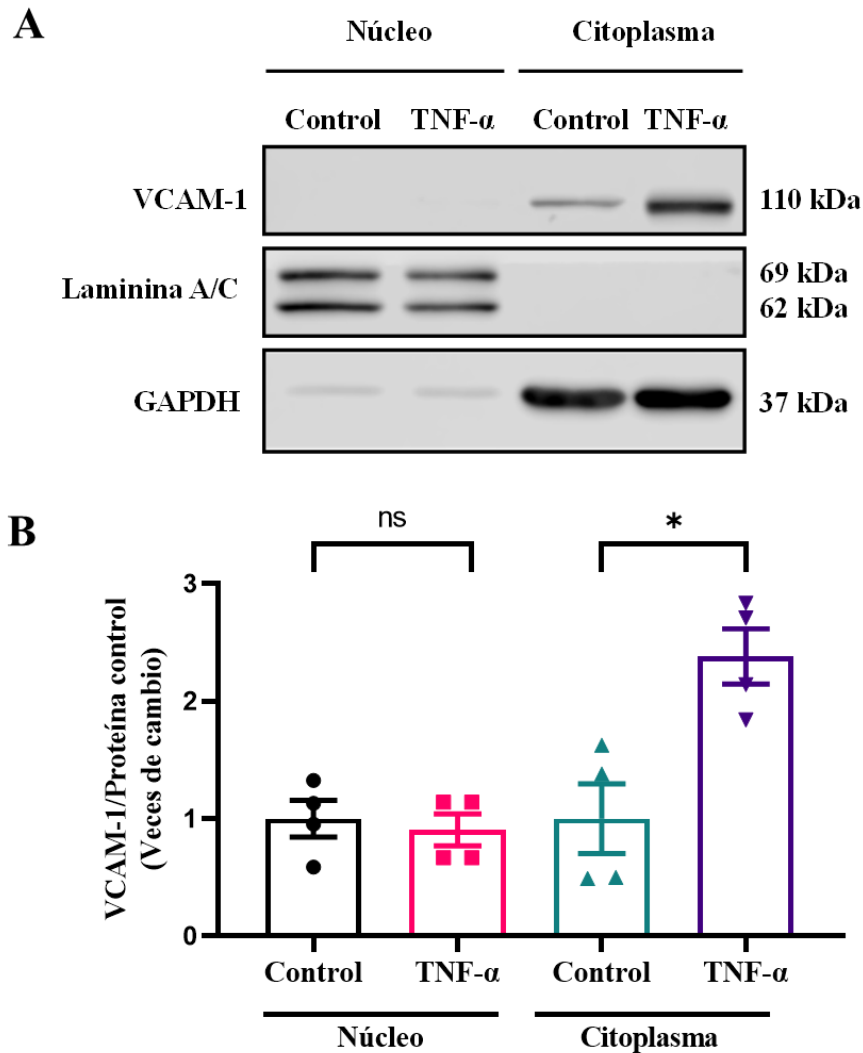


Figura anexa 1. Fraccionamiento subcelular y detección de proteína VCAM-1 en el cardiomiocito.

A) Imagen representativa del Western blot, se utilizaron como control de carga las proteínas laminina A/C y GAPDH para la fracción nuclear y citosólica, respectivamente. B) Cuantificación densitométrica de los niveles de VCAM-1 en las fracciones subcelulares. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn, * $p < 0,05$ vs control respectivo, $n=4$. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

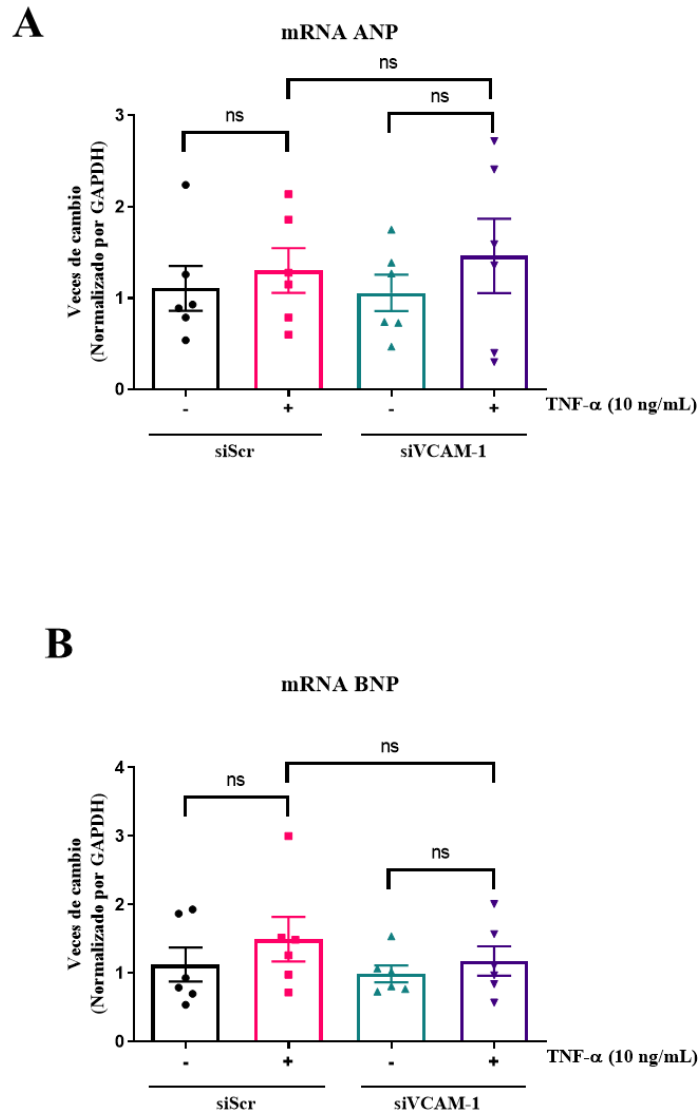


Figura anexa 2. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la expresión de genes relacionados con hipertrofia en cardiomiocitos preconditionados con TNF- α . A) Niveles relativos mRNA de ANP. B) Niveles relativos mRNA de BNP. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, ns=no se encontró diferencia estadísticamente significativa, n=6. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

11. Referencias

1. OMS (2023) *Enfermedades cardiovasculares*. <https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases>. Accessed January 2023.
2. Andersson, C. and Vasan, R. S. (2018) Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nature reviews. Cardiology* **15**, 230–240.
3. OPS (2021) *La carga de las enfermedades cardiovasculares en la Región de las Américas, 2000-2019*. <https://www.paho.org/es/enlace/carga-enfermedades-cardiovasculares>. Accessed January 2023.
4. Troncoso-Pantoja, C., Martínez-Sanguinetti, M. A., Ulloa, N., and Celis-Morales, C. (2020) La mayoría de las enfermedades cardiovasculares se atribuyen a factores de riesgo que podrían ser modificados con cambios de los estilos de vida. *Revista medica de Chile* **148**, 126–128.
5. Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E., and Abdala-Valencia, H. (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling* **15**, 1607–1638.
6. Choo, H.-J., Canner, J. P., Vest, K. E., Thompson, Z., and Pavlath, G. K. (2017) A tale of two niches: differential functions for VCAM-1 in satellite cells under basal and injured conditions. *American journal of physiology. Cell physiology* **313**, C392–C404.
7. Mu, W., Chen, M., Gong, Z., Zheng, F., and Xing, Q. (2015) Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in the aortic tissues of atherosclerotic patients and the associated clinical implications. *Experimental and therapeutic medicine* **10**, 423–428.
8. Ehrlich, J. R., Kaluzny, M., Baumann, S., Lehmann, R., and Hohnloser, S. H. (2011) Biomarkers of structural remodelling and endothelial dysfunction for prediction of cardiovascular events or death in patients with atrial fibrillation. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* **100**, 1029–1036.
9. Cai, H., Yao, Z., and Li, W. (2017) IRF-5 accelerates leukocyte adhesion to endothelial cells in ischemia-reperfusion injury through regulating the transcription of VCAM-1. *Biochemical and biophysical research communications* **492**, 192–198.
10. Schlesinger, M. and Bendas, G. (2015) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *International journal of cancer* **136**, 2504–2514.
11. Yan, R., van Meurs, M., Popa, E. R., Jongman, R. M., Zwiers, P. J., Niemarkt, A. E., Kuiper, T., Kamps, J. A., Heeringa, P., Zijlstra, J. G., Molema, G., and Moser, J. (2017) Endothelial Interferon Regulatory Factor 1 Regulates Lipopolysaccharide-Induced VCAM-1 Expression Independent of NFκB. *Journal of innate immunity* **9**, 546–560.
12. Agassandian, M., Tedrow, J. R., Sembrat, J., Kass, D. J., Zhang, Y., Goncharova, E. A., Kaminski, N., Mallampalli, R. K., and Vuga, L. J. (2015) VCAM-1 is a TGF-β1 inducible gene upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cellular signalling* **27**, 2467–2473.
13. Bertin, F. R., Lemarié, C. A., Robins, R. S., and Blosein, M. D. (2015) Growth arrest-specific 6 regulates thrombin-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 through forkhead box O1 in endothelial cells. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **13**, 2260–2272.
14. Lee, J.-W., Chen, H., Pullikotil, P., and Quon, M. J. (2011) Protein kinase A-alpha directly phosphorylates FoxO1 in vascular endothelial cells to regulate expression of vascular cellular adhesion molecule-1 mRNA. *The Journal of biological chemistry* **286**, 6423–6432.
15. Garton, K. J., Gough, P. J., Philalay, J., Wille, P. T., Blobel, C. P., Whitehead, R. H., Dempsey, P. J., and Raines, E. W. (2003) Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *The Journal of biological chemistry* **278**, 37459–37464.

16. Garton, K. J., Gough, P. J., and Raines, E. W. (2006) Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *Journal of leukocyte biology* **79**, 1105–1116.
17. Zonneveld, R., Martinelli, R., Shapiro, N. I., Kuijpers, T. W., Plötz, F. B., and Carman, C. V. (2014) Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Critical care (London, England)* **18**, 204.
18. Verdejo, H., Roldan, J., Garcia, L., Del Campo, A., Becerra, E., Chiong, M., Mellado, R., Garcia, A., Zalaquett, R., Braun, S., Garayar, B., Gonzalez, S., Lavandero, S., and Corbalan, R. (2011) Systemic vascular cell adhesion molecule-1 predicts the occurrence of post-operative atrial fibrillation. *International journal of cardiology* **150**, 270–276.
19. Troncoso, M. F., Ortiz-Quintero, J., Garrido-Moreno, V., Sanhueza-Olivares, F., Guerrero-Moncayo, A., Chiong, M., Castro, P. F., García, L., Gabrielli, L., Corbalán, R., Garrido-Olivares, L., and Lavandero, S. (2021) VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* **1867**, 166170.
20. Kwee, L., Baldwin, H. S., Shen, H. M., Stewart, C. L., Buck, C., Buck, C. A., and Labow, M. A. (1995) Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development (Cambridge, England)* **121**, 489–503.
21. Yang, J. T., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1995) Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development (Cambridge, England)* **121**, 549–560.
22. Rosen, G. D., Sanes, J. R., LaChance, R., Cunningham, J. M., Roman, J., and Dean, D. C. (1992) Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* **69**, 1107–1119.
23. Song, K., Zhu, F., Zhang, H., and Shang, Z. (2012) Tumor necrosis factor- α enhanced fusions between oral squamous cell carcinoma cells and endothelial cells via VCAM-1/VLA-4 pathway. *Experimental cell research* **318**, 1707–1715.
24. Wingerd, K. L., Goodman, N. L., Tresser, J. W., Smail, M. M., Leu, S. T., Rohan, S. J., Pring, J. L., Jackson, D. Y., and Clegg, D. O. (2002) Alpha 4 integrins and vascular cell adhesion molecule-1 play a role in sympathetic innervation of the heart. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 10772–10780.
25. Uosaki, H., Fukushima, H., Takeuchi, A., Matsuoka, S., Nakatsuji, N., Yamanaka, S., and Yamashita, J. K. (2011) Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PloS one* **6**, e23657.
26. Diaz Montecinos, A. (2016) *Estudio de la vía insulina/NF-kB/VCAM-1 en la protección del cardiomiocito isquémico*, Santiago, Chile.
27. Murry, C. E., Jennings, R. B., and Reimer, K. A. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124–1136.
28. Lefer, D. J. and Bolli, R. (2014) Cardioprotection. *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease* **1-2**, 369–388.
29. Marber, M. S., Latchman, D. S., Walker, J. M., and Yellon, D. M. (1993) Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* **88**, 1264–1272.
30. Rosenberg, J. H., Werner, J. H., Moulton, M. J., and Agrawal, D. K. (2018) Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning. *Journal of cardiovascular translational research* **11**, 292–307.
31. Bolli, R., Li, Q.-H., Tang, X.-L., Guo, Y., Xuan, Y.-T., Rokosh, G., and Dawn, B. (2007) The late phase of preconditioning and its natural clinical application--gene therapy. *Heart failure reviews* **12**, 189–199.
32. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2007) Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart failure reviews* **12**, 217–234.

33. Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H., Heusch, G., and Schulz, R. (2008) The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacology & therapeutics* **120**, 172–185.
34. Chytilová, A., Borchert, G. H., Mandíková-Alánová, P., Hlaváčková, M., Kopkan, L., Khan, M. A. H., Imig, J. D., Kolář, F., and Neckář, J. (2015) Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta physiologica (Oxford, England)* **214**, 97–108.
35. Hayashi, K., Piras, V., Tabata, S., Tomita, M., and Selvarajoo, K. (2013) A systems biology approach to suppress TNF-induced proinflammatory gene expressions. *Cell communication and signaling : CCS* **11**, 84.
36. Tian, M., Yuan, Y.-C., Li, J.-Y., Gionfriddo, M. R., and Huang, R.-C. (2015) Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic diseases and translational medicine* **1**, 18–26.
37. Cabal-Hierro, L. and Lazo, P. S. (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular signalling* **24**, 1297–1305.
38. Kleinbongard, P., Schulz, R., and Heusch, G. (2011) TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart failure reviews* **16**, 49–69.
39. Jarrah, A. A., Schwarskopf, M., Wang, E. R., LaRocca, T., Dhume, A., Zhang, S., Hadri, L., Hajjar, R. J., Schechter, A. D., and Tarzami, S. T. (2018) SDF-1 induces TNF-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **23**, 79–91.
40. Monden, Y., Kubota, T., Inoue, T., Tsutsumi, T., Kawano, S., Ide, T., Tsutsui, H., and Sunagawa, K. (2007) Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **293**, H743-53.
41. Medler, J. and Wajant, H. (2019) Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert opinion on therapeutic targets* **23**, 295–307.
42. Kishore, R., Tkebuchava, T., Sasi, S. P., Silver, M., Gilbert, H.-Y., Yoon, Y.-S., Park, H.-Y., Thorne, T., Losordo, D. W., and Goukassian, D. A. (2011) Tumor necrosis factor- α signaling via TNFR1/p55 is deleterious whereas TNFR2/p75 signaling is protective in adult infarct myocardium. *Advances in experimental medicine and biology* **691**, 433–448.
43. Lee, J.-C., Park, C. W., Shin, M. C., Cho, J. H., Lee, H.-A., Kim, Y.-M., Park, J. H., Ahn, J. H., Cho, J. H., Tae, H.-J., Hwang, I. K., Lee, T.-K., Won, M.-H., and Kang, I. J. (2018) Tumor necrosis factor receptor 2 is required for ischemic preconditioning-mediated neuroprotection in the hippocampus following a subsequent longer transient cerebral ischemia. *Neurochemistry international* **118**, 292–303.
44. Nan, J., Hu, H., Sun, Y., Zhu, L., Wang, Y., Zhong, Z., Zhao, J., Zhang, N., Wang, Y., Wang, Y., Ye, J., Zhang, L., Hu, X., Zhu, W., and Wang, J. (2017) TNFR2 Stimulation Promotes Mitochondrial Fusion via Stat3- and NF- κ B-Dependent Activation of OPA1 Expression. *Circulation research* **121**, 392–410.
45. Dostert, C., Grusdat, M., Letellier, E., and Brenner, D. (2019) The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiological reviews* **99**, 115–160.
46. Kong, D.-H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H., and Lee, S. (2018) Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International journal of molecular sciences* **19**.
47. Cacciapaglia, F., Salvatorelli, E., Minotti, G., Afeltra, A., and Menna, P. (2014) Low level tumor necrosis factor-alpha protects cardiomyocytes against high level tumor necrosis factor-alpha: brief insight into a beneficial paradox. *Cardiovascular toxicology* **14**, 387–392.

48. Feldman, A. M., Combes, A., Wagner, D., Kadakomi, T., Kubota, T., Li, Y. Y., and McTiernan, C. (2000) The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 537–544.
49. Meldrum, D. R. (1998) Tumor necrosis factor in the heart. *The American journal of physiology* **274**, R577-95.
50. Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Demetris, A. J., and Feldman, A. M. (1997) Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *Journal of cardiac failure* **3**, 117–124.
51. Herrera Garza, E. H., Herrera Garza, J. L., Rodríguez González, H., Treviño Treviño, A., Ibarra Flores, M., and Torre Amione, G. (2002) Importancia del factor de necrosis tumoral alfa en la patogenia de la insuficiencia cardíaca. *Revista española de cardiología* **55**, 61–66.
52. Torre-Amione, G., Kapadia, S., Lee, J., Durand, J. B., Bies, R. D., Young, J. B., and Mann, D. L. (1996) Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* **93**, 704–711. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8640999/>.
53. Wang, G.-J., Wang, H.-X., Yao, Y.-S., Guo, L.-Y., and Liu, P. (2012) The role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and calcineurin in TNF- α -induced myocardial hypertrophy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **45**, 1045–1051.
54. El-Ani, D., Philipchik, I., Stav, H., Levi, M., Zerbib, J., and Shainberg, A. (2014) Tumor necrosis factor alpha protects heart cultures against hypoxic damage via activation of PKA and phospholamban to prevent calcium overload. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **92**, 917–925.
55. Foncea, R., Andersson, M., Ketterman, A., Blakesley, V., Sapag-Hagar, M., Sugden, P. H., LeRoith, D., and Lavandero, S. (1997) Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **272**, 19115–19124.
56. Mendoza-Torres, E., Riquelme, J. A., Vielma, A., Sagredo, A. R., Gabrielli, L., Bravo-Sagua, R., Jalil, J. E., Rothermel, B. A., Sanchez, G., Ocaranza, M. P., and Lavandero, S. (2018) Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1-9) through an AT2R and Akt-dependent mechanism. *Pharmacological research* **135**, 112–121.
57. Chidawanyika, T. and Supattapone, S. (2021) Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in Mammalian Cells. *Journal of cellular signaling* **2**, 206–211.
58. Villena, J., Henriquez, M., Torres, V., Moraga, F., Díaz-Elizondo, J., Arredondo, C., Chiong, M., Olea-Azar, C., Stutzin, A., Lavandero, S., and Quest, A. F. G. (2008) Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free radical biology & medicine* **44**, 1146–1160.
59. Ramírez-Sagredo, A., Quiroga, C., Garrido-Moreno, V., López-Crisosto, C., Leiva-Navarrete, S., Norambuena-Soto, I., Ortiz-Quintero, J., Díaz-Vesga, M. C., Perez, W., Hendrickson, T., Parra, V., Pedrozo, Z., Altamirano, F., Chiong, M., and Lavandero, S. (2021) Polycystin-1 regulates cardiomyocyte mitophagy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **35**, e21796.
60. Symersky, J., Osowski, D., Walters, D. E., and Mueller, D. M. (2012) Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 13961–13965.
61. Chan, F. K.-M., Moriwaki, K., and Rosa, M. J. de (2013) Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **979**, 65–70.
62. Chen, Z., Tang, Y., Yang, Z., Liu, S., Liu, Y., Li, Y., and He, W. (2013) Endothelin-1 downregulates Mas receptor expression in human cardiomyocytes. *Molecular medicine reports* **8**, 871–876.

63. Wilson, C., Contreras-Ferrat, A., Venegas, N., Osorio-Fuentealba, C., Pávez, M., Montoya, K., Durán, J., Maass, R., Lavandero, S., and Estrada, M. (2013) Testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes. *Journal of cellular physiology* **228**, 2399–2407.
64. Diaz, R. J. and Wilson, G. J. (2006) Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models. *Cardiovascular research* **70**, 286–296.
65. Mascareno, E., Beckles, D. L., and Siddiqui, M. A. Q. (2005) Janus kinase-2 signaling mediates apoptosis in rat cardiomyocytes. *Vascular pharmacology* **43**, 327–335.
66. Wang, Y., Wang, D., Zhang, L., Ye, F., Li, M., and Wen, K. (2016) Role of JAK-STAT pathway in reducing cardiomyocytes hypoxia/reoxygenation injury induced by S1P postconditioning. *European journal of pharmacology* **784**, 129–136.
67. Lin, C.-C., Pan, C.-S., Wang, C.-Y., Liu, S.-W., Hsiao, L.-D., and Yang, C.-M. (2015) Tumor necrosis factor-alpha induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblasts. *Journal of biomedical science* **22**, 53.
68. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation* **123**, 92–100.
69. Chen, Q. M. and Maltagliati, A. J. (2018) Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiological genomics* **50**, 77–97.
70. Wang, Z., Chen, K., Han, Y., Zhu, H., Zhou, X., Tan, T., Zeng, J., Zhang, J., Liu, Y., Li, Y., Yao, Y., Yi, J., He, D., Zhou, J., Ma, J., and Zeng, C. (2018) Irisin Protects Heart Against Ischemia-Reperfusion Injury Through a SOD2-Dependent Mitochondria Mechanism. *Journal of cardiovascular pharmacology* **72**, 259–269.
71. Shanmugam, G., Narasimhan, M., Sakthivel, R., Kumar R, R., Davidson, C., Palaniappan, S., Claycomb, W. W., Hoidal, J. R., Darley-Usmar, V. M., and Rajasekaran, N. S. (2016) A biphasic effect of TNF- α in regulation of the Keap1/Nrf2 pathway in cardiomyocytes. *Redox biology* **9**, 77–89.
72. Peter, A. K., Bjerke, M. A., and Leinwand, L. A. (2016) Biology of the cardiac myocyte in heart disease. *Molecular biology of the cell* **27**, 2149–2160.
73. Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., and Grimm, M. (2015) H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et biophysica acta* **1853**, 276–284.
74. Aslantürk, Ö. S. (2018) In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages.
75. Zamaraeva, M. V., Sabirov, R. Z., Maeno, E., Ando-Akatsuka, Y., Bessonova, S. V., and Okada, Y. (2005) Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell death and differentiation* **12**, 1390–1397.
76. Lee, C.-W., Lin, W.-N., Lin, C.-C., Luo, S.-F., Wang, J.-S., Pouyssegur, J., and Yang, C.-M. (2006) Transcriptional regulation of VCAM-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in human tracheal smooth muscle cells: involvement of MAPKs, NF-kappaB, p300, and histone acetylation. *Journal of cellular physiology* **207**, 174–186.
77. Pott, G. B., Tsurudome, M., Bamfo, N., and Goalstone, M. L. (2016) ERK2 and Akt are negative regulators of insulin and Tumor Necrosis Factor- α stimulated VCAM-1 expression in rat aorta endothelial cells. *Journal of inflammation (London, England)* **13**, 6.
78. Wang, C.-M., Guo, Z., Xie, Y.-J., Hao, Y.-Y., Sun, J.-M., Gu, J., and Wang, A.-L. (2014) Co-treating mesenchymal stem cells with IL-1 β and TNF- α increases VCAM-1 expression and improves post-ischemic myocardial function. *Molecular medicine reports* **10**, 792–798.
79. Kacimi, R., Karliner, J. S., Koudssi, F., and Long, C. S. (1998) Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines: response to acute hypoxia. *Circulation research* **82**, 576–586.

80. Chao, W., Shen, Y., Li, L., Zhao, H., Meiler, S. E., Cook, S. A., and Rosenzweig, A. (2005) Fas-associated death-domain protein inhibits TNF-alpha mediated NF-kappaB activation in cardiomyocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**, H2073-80.
81. Friebe, A. and Volk, H.-D. (2008) Stability of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, and interleukin 8 in blood samples of patients with systemic immune activation. *Archives of pathology & laboratory medicine* **132**, 1802–1806.
82. Croft, D., McIntyre, P., Wibulswas, A., and Kramer, I. (1999) Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. *The American journal of pathology* **154**, 1149–1158.
83. Buccitelli, C. and Selbach, M. (2020) mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature reviews. Genetics* **21**, 630–644.
84. Rolski, F. and Błyszczuk, P. (2020) Complexity of TNF- α Signaling in Heart Disease. *Journal of clinical medicine* **9**.
85. Schulz, R. and Heusch, G. (2009) Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? *Circulation* **119**, 1355–1357.
86. Galeone, A., Grano, M., and Brunetti, G. (2023) Tumor Necrosis Factor Family Members and Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: State of the Art and Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences* **24**.
87. Defer, N., Azroyan, A., Pecker, F., and Pavoine, C. (2007) TNFR1 and TNFR2 signaling interplay in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **282**, 35564–35573.
88. Lin, C.-C., Yang, C.-C., Wang, C.-Y., Tseng, H.-C., Pan, C.-S., Hsiao, L.-D., and Yang, C.-M. (2015) NADPH Oxidase/ROS-Dependent VCAM-1 Induction on TNF- α -Challenged Human Cardiac Fibroblasts Enhances Monocyte Adhesion. *Frontiers in pharmacology* **6**, 310.
89. Lecour, S., Suleman, N., Deuchar, G. A., Somers, S., Lacerda, L., Huisamen, B., and Opie, L. H. (2005) Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* **112**, 3911–3918.
90. Fitau, J., Boulday, G., Coulon, F., Quillard, T., and Charreau, B. (2006) The adaptor molecule Lnk negatively regulates tumor necrosis factor-alpha-dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and -2 pathways. *The Journal of biological chemistry* **281**, 20148–20159.
91. Lecour, S., Smith, R. M., Woodward, B., Opie, L. H., Rochette, L., and Sack, M. N. (2002) Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology* **34**, 509–518.
92. Deuchar, G. A., Opie, L. H., and Lecour, S. (2007) TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning. *Life sciences* **80**, 1686–1691.
93. Chen, Q., Zhang, X. H.-F., and Massagué, J. (2011) Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer cell* **20**, 538–549.
94. Wang, P.-C., Weng, C.-C., Hou, Y.-S., Jian, S.-F., Fang, K.-T., Hou, M.-F., and Cheng, K.-H. (2014) Activation of VCAM-1 and its associated molecule CD44 leads to increased malignant potential of breast cancer cells. *International journal of molecular sciences* **15**, 3560–3579.
95. Thayse, K., Kindt, N., Laurent, S., and Carlier, S. (2020) VCAM-1 Target in Non-Invasive Imaging for the Detection of Atherosclerotic Plaques. *Biology* **9**.
96. VanHeyst, K. A., Choi, S. H., Kingsley, D. T., and Huang, A. Y. (2022) Ectopic Tumor VCAM-1 Expression in Cancer Metastasis and Therapy Resistance. *Cells* **11**.
97. Alateyah, N., Gupta, I., Rusyniak, R. S., and Ouhtit, A. (2022) SOD2, a Potential Transcriptional Target Underpinning CD44-Promoted Breast Cancer Progression. *Molecules (Basel, Switzerland)* **27**.