



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FENOFIBRATO EN CULTIVOS DE
CARDIOMIOCITOS SOMETIDOS A HIPOXIA-REPERFUSIÓN, ALTA
GLUCOSA Y AMBAS CONDICIONES EXPERIMENTALES”**

Tesis que presenta:

M. C. y P. Fabiola Cortés López

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directores de la Tesis: Dr. David Centurión Pacheco

Dra. María de la Luz Ibarra Lara

Ciudad de México, México.

Agosto, 2019

*Agradezco al CONACYT por el apoyo recibido
durante mis estudios
de maestría
Becario No. 635477*

Agradezco infinitamente a la Dra. María de la Luz Ibarra Lara, al Dr. David Centurión Pacheco, a la Dra. Araceli Sánchez López y a la Dra. María Alicia Sánchez Mendoza por el apoyo y confianza que me brindaron durante esta etapa de mi formación.

Dedico este trabajo:

A DIOS.

*A mis padres, Sara y José, gracias
por todo el apoyo brindado, los amo mucho.*

*A mis hermanos Silvia, Sara y José,
mis sobrinos Fernanda y Santiago
Gracias por su apoyo, consejos y amistad.*

*A mis compañeros de laboratorio 6 del
CINVESTAV: Hernán, Diana, Ashline, Saúl,
Carolina, Grecia y Adrián.*

*A mis compañeros de laboratorio del Departamento
de Farmacología del INCICH: Dra. María,
Sr. Saúl, Dr. Leo, M. V. Z. Gabriela,
Dra. Julieta, M en C. Juan Carlos,
Dra. Natalia, Dra. Luz Graciela,
M en C. Lorena Rosas, Luis y Rocío.*

*Este trabajo fue desarrollado bajo la dirección del
Dr. David Centurión Pacheco en el laboratorio 6
Del CINVESTAV sede sur y la Dra. María
de la Luz Ibarra Lara en el laboratorio de Reactividad Vascular
del Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de
Cardiología “Ignacio Chávez”.*

Contenido

Resumen.....	7
Abstract.....	9
I.- INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.- Epidemiología.....	11
1.2.- Isquemia-Reperfusión Miocárdica.....	13
1.3.- Diabetes Mellitus.....	13
1.4.- Hipoxia-Reperfusión y Alta Glucosa en un Modelo de Cultivo de Cardiomiocitos.....	14
1.5.- Estrés Oxidante.....	14
1.5.1.- Radicales Libres.....	14
1.5.2.- Fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno.....	16
1.5.2.1.- NADPH Oxidasa.....	17
1.5.2.2.- Xantina Oxidasa.....	19
1.5.2.3.- Desacople de la Sintasa del Óxido Nítrico.....	19
1.5.3.- Factor Inducible por Hipoxia (HIF).....	20
1.6.1.- Superóxido Dismutasa (SOD).....	23
1.6.2.- Catalasa.....	25
1.6.3.- Nrf2.....	26
1.6.4.- Papel del Estrés Oxidante en la Hipoxia-Reperfusión.....	28
1.6.5.- Papel del Estrés Oxidante en la Alta Glucosa.....	28
1.7.- Daño Ocasionado por las Especies Reactivas de Oxígeno.....	29
1.7.1.- ADN.....	30
1.7.3.- Lípidos.....	33
1.9.- Óxido Nítrico.....	39
1.9.1.- Síntesis de Óxido Nítrico.....	39
1.9.2.- Estructura de la NOS.....	40
1.9.3.- Función del Óxido Nítrico en el Corazón.....	41
1.10.- Receptores que Activan la Proliferación Peroxisomal (PPARs).....	42
1.10.1.- Definición.....	42
1.10.2.- Estructura de los PPARs.....	42
1.10.3.- RXR y Heterodimerización.....	43
1.10.4.- Mecanismo de Acción.....	43

1.10.5.- PPREs.....	44
1.10.6.- Coactivadores y Correpresores.....	44
1.10.7.- Ligandos.....	45
1.10.8.- PPAR α	46
1.10.9.- PPAR α en la Hipoxia-Reperfusión.....	48
1.10.10.- Fenofibrato.....	48
II.- JUSTIFICACIÓN.....	50
III. HIPÓTESIS.....	51
IV. OBJETIVO GENERAL.....	52
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	52
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
6.1.- Material.....	54
6.2.- Métodos.....	55
6.2.1.- Animales.....	55
6.2.2.- Cultivo de Miocitos.....	55
6.2.3.- Alta Glucosa.....	56
6.2.4.- Hipoxia-Reperfusión.....	56
6.2.5.- Viabilidad Celular.....	56
6.2.6.- Microscopía Electrónica.....	57
6.2.7.- Malondialdehído (MDA).....	57
6.2.8.- 8-Hidroxi-2-Deoxiguanosina (8-OH-2-dG).....	58
6.2.9.- Expresión de eNOS, eNOS-p, SOD-Cu ²⁺ /Zn ²⁺ , SOD-Mn ²⁺ , Catalasa, NOX-4, p47 ^{phox}	58
6.2.10.- HIF-1 α : Aislamiento de RNA y Cuantificación por PCR en Tiempo Real.....	60
VII.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
VIII.- RESULTADOS.....	63
8.1.- Evaluación de HIF1 α	63
8.3.- Evaluación de la Ultraestructura de los Cardiomiocitos.....	66
8.4.- Evaluación del Efecto Antioxidante.....	69
8.5.- Evaluación de la Expresión de las Subunidades de la Enzima NADPH oxidasa.....	72
8.6.- Evaluación de Indicadores de Estrés Oxidante.....	74
8.7.- Evaluación de la Expresión de eNOS y eNOS Ser ¹¹⁷⁷	77
8.8.- Evaluación de la Expresión de PPAR α	78

IX.- DISCUSIÓN	80
X.- CONCLUSIÓN.....	86
XI.- PERSPECTIVAS A FUTURO	87
XII.- REFERENCIAS.....	88
XIII.-APÉNDICE	91

Resumen

Las lesiones ocasionadas por la alta glucosa (AG) y la hipoxia-reperfusión (HR) son las patologías más comunes a nivel mundial con una alta mortalidad. Este daño causado por AG y HR está vinculado a una producción exagerada de especies reactivas de oxígeno (EROs). En este sentido, es bien sabido que las oxidasas NADPH de la familia NOX son las principales fuentes de EROs en los cardiomiocitos. Estudios recientes han demostrado que los receptores activados proliferadores peroxisomales (PPARs) se pueden considerar como posibles dianas terapéuticas en procesos que involucran HR y AG. Los PPARs son miembros de la superfamilia de receptores nucleares cuya activación promueve la expresión de genes codificados en secuencias de ADN específicas. El PPAR α se encuentra predominantemente en el corazón, donde participan en el metabolismo de los lípidos actuando como un sensor de los niveles de ácidos grasos libres. Cada uno de los PPARs puede ser activado por ligandos específicos. El fenofibrato y otros agentes hipolipemiantes se consideran específicos para activar el receptor PPAR α . Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar si la estimulación de PPAR α , por fenofibrato: (1) disminuye la producción de estrés oxidante, (2) aumenta la expresión de enzimas involucradas en la regulación del estado redox y (3) mejora la viabilidad y ultraestructura de los cardiomiocitos en un modelo de cardiomiocitos sometidos a HR (2 horas hipoxia / 1 hora de perfusión) y AG. Para ese propósito, los cultivos de cardiomiocitos se dividieron en 4 grupos principales: (1) control; (2) AG (25 mM); (3) HR (realizada a través de un coverslip); y (4) AG/HR. Los grupos se subdividieron en los siguientes subgrupos: (1) sham; (2) DMSO (dimetilsulfóxido); (3) fenofibrato (10 μ M). Nuestros resultados indican que la viabilidad celular disminuye en los grupos de cardiomiocitos sometidos a AG, HR y

en ambas condiciones, mientras que el tratamiento con fenofibrato mejora la viabilidad celular. Al evaluar a la NADPH oxidasa principal (fuente de EROs), observamos que en AG, HR y ambas condiciones experimentales, la expresión de las subunidades de esta enzima aumenta, mientras que el tratamiento con fenofibrato disminuye su expresión. Las enzimas antioxidantes $SODCu^{2+}/Zn^{2+}$ y $SODMn^{2+}$ y la capacidad antioxidante se incrementan en los cardiomiocitos tratados con el activador de $PPAR\alpha$, mientras que en la AG, HR y en ambas condiciones disminuye su expresión. Debido al alto estrés oxidante, las macromoléculas importantes en el cardiomiocito como el ADN y las membranas celulares se dañan; el tratamiento con fenofibrato protege de su degradación a estas macromoléculas. Al realizar microscopia electrónica observamos que en la AG, HR y la combinación se altera la ultraestructura del cardiomiocito principalmente la mitocondria y el núcleo; el fenofibrato atenúa los daños ocasionados a la ultraestructura del cardiomiocito. Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que el tratamiento con fenofibrato protege al cardiomiocito del estrés oxidativo producido por AG, HR y la combinación de ambas condiciones, mejorando con ello la viabilidad y la ultraestructura.

Abstract

High glucose (HG) and hypoxia- reperfusion (HR) injury are the most common pathologies worldwide. The damage caused by HG and HR injury is linked to an exaggerated production of reactive oxygen species (ROS). In this respect, it is well known that the NADPH oxidases of the NOX family are the major sources of ROS in cardiomyocytes. Recent studies have shown that peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) can be considered as potential therapeutic targets in processes that involve HR and HG. PPARs are members of the nuclear receptor superfamily, whose activation promotes the expression of genes encoded in specific DNA sequences. The PPAR α is found predominantly in heart, where they participate in lipid metabolism acting as a sensor of the levels of free fatty acids. Each of the PPARs can be activated by specific ligands. Fenofibrate and other lipid-lowering agents are considered specific for activating the alpha subtype. Therefore, the objective of this work was to study whether the stimulation of alpha PPARs, by fenofibrate: (1) decreases the production of oxidative stress, (2) increases expression of enzymes involved in the regulation of the redox state, and (3) improves the viability and ultrastructure of cardiomyocytes in a model of cardiomyocytes subjected to HR (2 hours hypoxia- 1 hour reperfusion) and HG. For that purpose, cardiomyocyte cultures were divided into 4 main groups: (1) control; (2) HG (25 mM); (3) HR (performed through a coverslip); and (4) HG/HR. The groups were subdivided into the following subgroups: (1) sham; (2) DMSO (dimethylsulfoxide); (3) fenofibrate (10 μ M). Our results indicate that cell viability decreases in the groups of cardiomyocytes subjected to HG, HR and both conditions while treatment with fenofibrate restores the viability. When evaluating the main

source of ROS we observed that in HG or HR the cytosolic as well as the membrane subunits of the NADPH oxidase are increased while fenofibrate decreases them. The expression of the antioxidant enzymes SOD $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ and SOD Mn^{2+} and the antioxidant capacity are increased in the cardiomyocytes treated with fenofibrate while in the HG, HR or both the expression is diminished. Due to the high oxidative stress, important macromolecules in the cardiomyocyte such as DNA and cell membranes are damaged; Fenofibrate treatment protects these macromolecules from degradation. When performing electron microscopy, we observe that in the HG, HR and the combination the ultrastructure of the cardiomyocyte is mainly altered the mitochondria and the nucleus; fenofibrate attenuates damage to the ultrastructure of the cardiomyocyte. These results, taken together, suggest that fenofibrate treatment protects the cardiomyocyte from oxidative stress caused by HG, HR and the combination of both conditions, thereby improving viability and ultrastructure.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Epidemiología

Desde principios del siglo XX, en México se han manifestado cambios trascendentales en el comportamiento epidemiológico de las enfermedades, derivado de los cambios ambientales, demográficos, económicos, sociales, culturales y los avances en el campo de la atención a la salud, por lo que pasamos de las enfermedades infectocontagiosas como principales causas de morbilidad a enfermedades crónico degenerativas como son la diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades cardiovasculares (**Tabla 1**) [1].

Orden	Principales causas	Defunciones	Porcentaje (%)
	Total	623,600	100.0
1	Enfermedades del corazón ^a	116,002	18.6
2	Enfermedades isquémicas del corazón	79,301	12.7
3	Diabetes mellitus	89,420	14.3
4	Tumores malignos	75,229	12.1
5	Accidentes	36,293	5.8
6	De tráfico en vehículos de motor	15,847	2.5
7	Enfermedades del hígado	34,765	5.6
8	Enfermedad alcohólica del hígado	12,760	2.0
9	Enfermedades cerebrovasculares	32,675	5.2
10	Agresiones	23,063	3.7
11	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	20,481	3.3
12	Influenza y neumonía	17,417	2.8
13	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal ^b	12,948	2.1
14	Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal	5,874	0.9
15	Insuficiencia renal	11,983	1.9
16	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	9,375	1.5
17	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	8,303	1.3
18	Lesiones autoinfligidas intencionalmente	5,909	0.9
19	Bronquitis crónica y no especificada, enfisema y asma	5,470	0.9
20	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana	4,997	0.8
	Las demás causas	119,270	19.1

Tabla I: Principales causas de muerte en México 2013 (Tomado de Soto E. G. et al. 2016)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que a escala mundial, 422 millones de personas mayores de 18 años padecían diabetes en el año 2014. Las estimaciones más altas del número de estos pacientes correspondieron a las regiones del Asia Sudoriental y del Pacífico Occidental, donde se encuentran alrededor de la mitad de los casos de diabetes en el mundo. El número de personas con diabetes ha aumentado progresivamente en los últimos decenios debido al crecimiento de la población, al aumento de la edad promedio de los habitantes y al aumento de la prevalencia de diabetes en cada grupo de edad [2].

Por otro lado, de acuerdo con la OMS, las enfermedades cardiovasculares son responsables de 17 millones de muertes en el mundo y representan un 29.82% del total. Se estima que para el año 2020, las muertes por enfermedades cardiovasculares aumentarán en 15 a 20%; en el año 2030, morirán cerca de 23.6 millones de personas y se pronostica que seguirá siendo la principal causa de muerte a nivel global. En México, el Sistema Nacional de Salud, afirma que la cardiopatía isquémica y la diabetes mellitus, son dos de los más grandes problemas de la salud pública. La cardiopatía afecta sobre todo a los hombres de

mediana y avanzada edad y su mortalidad es 20% más alta en los hombres que en las mujeres [3].

1.2.- Isquemia-Reperusión Miocárdica

Definición: La palabra isquemia proviene de la unión de dos palabras griegas: *ischo*, que significa retirar, y *haima*, que significa sangre, lo que se refiere entonces a que existe un aporte sanguíneo inadecuado al miocardio y por ende al resto del cuerpo. La isquemia ocurre cuando la demanda de oxígeno del músculo cardíaco supera el aporte. Cuando se presentan obstrucciones u oclusiones en las arterias pericárdicas se reduce el flujo coronario generando isquemia lo que ocasiona un cambio del metabolismo en el miocardio de aerobio hacia anaerobio, acumulando lactatos y otros productos metabólicos que producen acidosis celular [4]. Generalmente cuando se produce isquemia miocárdica y después de un tiempo se reperfunde el miocardio, paradójicamente ocasiona un daño más que un beneficio.

Estudios recientes han demostrado que la reperusión tiene el potencial de inducir una lesión posterior en el tejido isquémico, un fenómeno denominado lesión por isquemia-reperusión. La lesión por isquemia reperusión es una condición crítica en la que se debe controlar el daño celular y preservar la función del órgano.

1.3.- Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico que se caracteriza por hiperglucemia crónica, que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. El origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, pero conllevan inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, en la sensibilidad a la acción de la hormona o bien en ambas en algún momento de su historia natural [5].

1.4.- Hipoxia-Reperfusión y Alta Glucosa en un Modelo de Cultivo de Cardiomiocitos

La isquemia-reperfusión y la diabetes mellitus en modelos de cultivos de cardiomiocitos se denominan respectivamente como hipoxia-reperfusión y alta glucosa. La hipoxia se define en cultivos de cardiomiocitos como una situación en la cual hay una disminución del aporte de nutrientes y oxígeno hasta alcanzar un nivel crítico donde el consumo se hace dependiente de dicho aporte creándose a nivel celular un estado conocido como deuda de oxígeno, anunciando el inicio del metabolismo anaeróbico, este presenta compromiso de la función de los cardiomiocitos. La reperfusión en el cultivo se define como es el restablecimiento del oxígeno y se instaura para evitar o disminuir el daño celular [6]. Por otro lado, la alta glucosa en cultivos se define como concentraciones elevadas de glucosa (de 20 a 40 mM) y debido a ello existen cambios bioquímicos en la célula que incluyen: aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), apoptosis entre otros. Este modelo de alta glucosa representa la diabetes mellitus presente en el ser humano.

1.5.- Estrés Oxidante

El estrés oxidante (EOx) es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas de oxígeno con respecto a los antioxidantes a favor de los primeros, con implicaciones en la homeostasis del organismo por el daño ocasionado por éstas a nivel celular, tisular y sistémico. El EOx ha sido asociado con el mecanismo fisiopatológico de más de 100 enfermedades crónico-degenerativas [7].

1.5.1.- Radicales Libres

Químicamente, un radical libre (RL) se define como un átomo o molécula que en su último orbital presenta un electrón no apareado dentro de su estructura, por lo que es una especie altamente inestable y reactiva que precisa de obtener el electrón que le falta de las moléculas vecinas, y dependiendo de dónde y cuánto se genere puede estabilizarse tomando el electrón que requiere de las biomoléculas próximas a él. Si esto sucede, se puede afectar la fisiología de las células al oxidar a los lípidos de membrana, a los carbohidratos, a las proteínas e incluso al ADN [7].

Los RL tienen una vida media corta (menor de 1 μ seg), por lo que actúan cerca del sitio en que se forman; desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuas y difusibles [8]. Formalmente, los radicales libres son especies neutras, lo cual significa que en su estructura electrónica se encuentra el mismo número de electrones y de protones. Esta característica le da a los radicales libres una serie de propiedades químicas únicas [9].

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), que es el estado triplete. Así, el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja. Sin embargo, por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir sustancias prooxidantes que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo que llegan a producir daño celular [8].

Las principales especies reactivas del oxígeno (EROs) o sustancias prooxidantes son: radical hidroxilo (OH^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singulete (1O_2), óxido nítrico (NO) y el radical peróxido (ROO^\cdot) (**Figura 1**) [8].

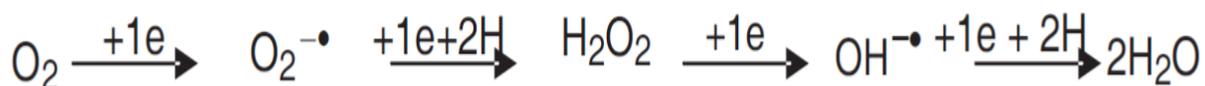


Figura 1: Reducción secuencial del oxígeno con la generación de radicales libres de oxígeno, los cuales pueden ser convertidos hasta agua, sin daño para el organismo (modificado de: Rosado, et al. 2007).

El superóxido: Cuando el O_2 capta un electrón éste se aparea con uno de los dos electrones libres de los orbitales π^* y forma así el $O_2^{\cdot-}$, que es a la vez un anión y un radical. Aproximadamente el 0.1% del O_2 que se consume en la respiración forma $O_2^{\cdot-}$ [9].

Otra fuente importante de $O_2^{\cdot-}$ es la actividad de las NADPH oxidasas, que tienen la función específica de sintetizarlo. También la xantina oxidasa, la lipooxigenasa y algunas peroxidasas inespecíficas forman $O_2^{\cdot-}$. La concentración del $O_2^{\cdot-}$ en la célula está en el intervalo de pico a nanomolar [9].

El $O_2^{\cdot-}$ es tóxico para la célula en parte porque a partir de él se puede originar el 1O_2 y el OH^\cdot . El 1O_2 se forma con la dismutación espontánea del $O_2^{\cdot-}$. Al reaccionar el $O_2^{\cdot-}$ con los centros [4Fe-4S] de algunas deshidratasas se libera Fe(II) que puede producir OH^\cdot con el

H₂O₂. El O₂⁻ sólo puede atravesar las membranas celulares como radical hidroperoxilo (OHO₂•) o a través de los poros aniónicos [9].

El peróxido de hidrógeno: Se forma cuando cada uno de los dos electrones libres del O₂ se han apareado con un electrón de giro contrario. Como estos electrones entraron en los orbitales antiunión, en el H₂O₂ las dos ligaduras del O₂ se han reducido a una. La reacción de las SOD produce la mayor parte del H₂O₂ en las células. La concentración intracelular del H₂O₂ va desde pico a micromolar, dependiendo del organismo y del tejido. El H₂O₂ se puede difundir a través de los compartimentos celulares, aunque también puede formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. No obstante, el H₂O₂ es tóxico a concentraciones intracelulares por arriba de 1 µM debido, en parte, a que puede formar ¹O₂ y OH⁻. La toxicidad del H₂O₂ se debe principalmente a la reacción con algunos metales de transición con los que se produce el radical OH⁻[9].

Radical hidroxilo: Cuando el H₂O₂ acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe(II) o el Cu(I) entonces se fragmenta y forma el OH⁻ (reacción de Fenton). El OH⁻ es uno de los compuestos más reactivos que existen. El OH⁻ no se puede difundir porque interacciona rápidamente (10⁹ M⁻¹ seg⁻¹) casi con cualquier compuesto celular, puede oxidar tanto las purinas como las pirimidinas y también la desoxiribosa. Además puede producir rupturas en el ADN. La mayoría de los daños irreversibles en las proteínas son causados por el OH⁻. El OH⁻ reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se origina, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición [9].

1.5.2.- Fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno se generan a nivel intracelular y extracelular y provienen de fuentes enzimáticas y no enzimáticas. Las enzimáticas involucran: (1) transferencia de electrones en la mitocondria, lo cual constituye la fuente orgánica principal de RL; (2) enzimas oxidantes como la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa entre otras; (3) sistemas transportadores de electrones en el retículo endoplásmico y las membranas nucleares; (4) y peroxisomas, organelos del citosol muy ricos en oxidasas, que constituyen una importante

fuentes de H_2O_2 . Las fuentes no enzimáticas son la autooxidación de flavinas reducidas, tioles y pequeñas moléculas como hidroxiquinonas, catecolaminas y tetrahidropterinas [10].

En el corazón son importantes fuentes de especies reactivas: la NADPH oxidasa, xantina oxidasa, desacople de la sintasa óxido nítrico entre otros.

1.5.2.1.- NADPH Oxidasa

La enzima NADPH oxidasa (NOX), es una importante fuente enzimática de ROS y de reguladores cruciales de la señalización redox. La familia NOX de mamíferos comprende siete miembros conocidos que son: NOX1-NOX5 y oxidasas duales DUOX1 y DUOX2 (recientemente también denominadas NOX6 y NOX7), los cuales son complejos multiproteicos expresados diferencialmente entre tejidos. La función principal de las enzimas NOX es la producción de EROs. Catalizan el transporte de electrones de NADPH al oxígeno molecular, produciendo el anión superóxido. NOX1, NOX3 y NOX5 producen anión superóxido, mientras que DUOX1 y DUOX2 y NOX4 parecen generar en gran parte peróxido de hidrógeno. Las isoformas NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5 se expresan en el sistema cardiovascular y, entre ellas, NOX1, NOX2 y NOX4 se expresan en cardiomiocitos. NOX1 está localizado en la membrana, NOX2 se localiza principalmente en las vesículas intracelulares, pero también se detecta en las membranas plasmáticas. NOX4, la isoforma expresada más abundantemente, se encuentra no solo en la membrana plasmática sino también en las membranas del retículo endoplásmico, el núcleo y posiblemente en las mitocondrias, lo que la convierte en una fuente potencial de EROs mitocondriales [11].

NOX2 está compuesta por dos subunidades de membrana (gp91phox (denominado NOX2) y gp22phox) y cuatro subunidades citosólicas (p47phox, gp67phox, gp40phox y Rac) [12]. La NOX se encuentra desensamblada dentro de las células, y es necesario que se acoplen todos sus componentes para que pueda funcionar. La NOX activa es un multicomponente enzimático localizado en las membranas plasmáticas de las células activadas [9].

El corazón de la enzima, es decir, el complejo que está anclado a la membrana, está compuesto de una subunidad proteínica glucosilada con un peso de 91 kDa (gp91phox) y

una subunidad proteínica no glicosilada de 22 kDa (p22phox), formando un complejo en una relación 1:1. Este complejo contiene dentro de su estructura proteínica a dos grupos hemo y a un grupo flavín-adenín dinucleótido (FAD), que son los encargados directos del flujo de los electrones dentro de la NOX. Los componentes citosólicos de la NOX son las subunidades proteínicas p47phox, p67phox, p40phox (nombradas así por sus respectivos pesos moleculares en kDa), junto con una pequeña proteína G que actúa como GTPasa y que puede ser rac1 o rac2. En las células en reposo o no activadas, las subunidades p47phox, p67phox y p40phox, interactúan entre sí formando un complejo citosólico. Durante la activación, aproximadamente 10% de estas proteínas migran hacia la membrana plasmática [9].

Las proteínas cinasas fosforilan a algunos de los componentes citosólicos de la NOX, en particular a p47phox, que tiene varios sitios de fosforilación. La fosforilación hace que la proteína cambie de una conformación autoinhibitoria (en donde las regiones de unión se encontraban escondidas) a una conformación extendida que es capaz de unirse a la parte membranal de la enzima. Los tres componentes citosólicos que forman el heterotrímero, p47phox, p67phox y p40phox, junto con rac, se translocan a la membrana plasmática o membrana del fagosoma, y se ensamblan con el flavocitocromo b558. El NADPH se asocia al complejo [9].

Una vez que la NOX está ensamblada, el control sobre la actividad de la enzima y su velocidad catalítica puede llevarse a cabo en diversos puntos. El mecanismo para que comience a funcionar para producir O_2^- se explica de la siguiente forma: el NADPH debe ligarse a su sitio de unión en la subunidad gp91phox, en donde se oxida perdiendo dos electrones, y se libera de la enzima en forma de $NADP^+$, los electrones se transfieren de uno en uno hacia el FAD, posteriormente al hemo más interno y de ahí al más externo. Cada e^- pasa del último hemo al O_2 , y por último, el oxígeno recibe un e^- , se convierte entonces en el O_2^- , como se muestra en la siguiente reacción [9]:



La desfosforilación de una o más serinas en la subunidad p47phox se ha propuesto como uno de los mecanismos para la inactivación, implicando en ello a las fosfatasas PP1 y PP2A. Se sugiere que la desfosforilación desensambla a la NOX, y eso hace que se inactive. Sin embargo, se han sugerido algunos otros mecanismos, e incluso se propone que existan vías alternativas, dependiendo del estímulo y del agonista que hubiera activado la enzima [9].

1.5.2.2.- Xantina Oxidasa

La xantina oxido-reductasa (XOR) es parte de un grupo de enzimas conocidas como molibdeno hierro-azufre flavina hidroxilasas. En mamíferos, los mayores niveles de XOR se encuentran en el hígado y en el intestino delgado.

En el miocardio la XOR se localiza en las células endoteliales capilares. Existe en dos formas inter-convertibles conocidas como xantina oxidasa (XO) y xantina deshidrogenasa (XDH). La XOR de mamíferos está presente *in vivo* como la forma deshidrogenasa pero se convierte fácilmente en XO por oxidación de los residuos sulfhidrilo o por proteólisis. Aunque XDH tiene una afinidad mucho mayor por NAD⁺ en comparación con el oxígeno (y, por lo tanto, es prácticamente incapaz de producir EROs directamente), tanto XO como XDH pueden oxidar NADH, lo que da como resultado la formación de EROs. Fisiológicamente, XOR está involucrado en la hidroxilación de purinas, pterinas y aldehídos, pero su función principal es de ser la enzima limitante de la velocidad en la conversión de hipoxantina en xantina y xantina en urato [13].

Ambas formas participan en el catabolismo de los compuestos nitrogenados, particularmente en la degradación de las purinas (adenina y guanina). La XOR cataliza las reacciones terminales de esta vía, transformando a la hipoxantina en xantina y a la xantina en ácido úrico, que es el producto final de purinas en humanos [9].

1.5.2.3.- Desacople de la Sintasa del Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) se sintetiza por la familia de NO sintasas (NOS). Todas las isoformas de la NOS, utilizan para la síntesis de NO, L-Arginina, NADPH y oxígeno como sustratos.

Para que se produzca el NO, también se necesita tetrahidrobiopterina (BH4), flavin adenina dinucleotido (FAD) y Flavinmononucleotido (FMN), el grupo hemo y Ca^{2+} /calmodulina como cofactores de la reacción [14].

El NO una vez sintetizado, difunde pasivamente a las células subyacentes donde produce un aumento intracelular del guanosin-monofosfato-cíclico (GMPc) mediador de sus efectos fisiológicos, produciendo la relajación del músculo y la dilatación del vaso [14].

Sin embargo, bajo condiciones patológicas tales como aterosclerosis, hipertensión, diabetes, lesión por isquemia reperusión, isquemia y tabaquismo, la eNOS se vuelve inestable y se desacopla lo que lleva a la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en lugar de óxido nítrico (NO). Los mecanismos moleculares de desacoplamiento de eNOS incluyen la deficiencia de tetrahidrobiopterina (BH4) o la oxidación de BH4, la ingesta reducida de L-arginina, así como la modificación postraduccional de eNOS, especialmente la fosforilación del residuo de eNOS Thr495. Bajas concentraciones o ausencia de L-arginina catalizan la reducción del oxígeno en superóxido $O_2^{\cdot-}$ y niveles disminuidos de BH4 llevan a la producción simultánea de NO y $O_2^{\cdot-}$, productos que reaccionan entre si formando peroxinitrito ($ONOO^-$) [15].

1.5.3.- Factor Inducible por Hipoxia (HIF)

La adaptación hipóxica está en gran parte mediada por una familia de reguladores transcripcionales llamados factores inducibles por hipoxia (HIFs), los cuales inducen un panel de genes diana específicos. Los HIFs actúan como heterodímeros y se componen de una subunidad α regulada por oxígeno y una subunidad β independiente de oxígeno (también llamada translocador nuclear del receptor de hidrocarburo arilo) [16]. El gen *HIF-1 α* , que codifica el HIF-1 α , se localiza en el *locus* 14q21-q24, que contiene 15 exones y consta de 826 residuos de aminoácidos (aa) [17].

En condiciones normales de oxígeno, las subunidades de HIF- α están estrechamente reguladas por un conjunto de enzimas llamadas prolin hidroxilasas de HIF (PHDs). Las

PHDs son dioxigenasas que hidroxilan las subunidades HIF- α en residuos de prolina específicos. Las subunidades de HIF- α hidroxiladas son reconocidas por la ligasa E3 del supresor tumoral de von Hippel Lindau (VHL) para su degradación a través de la ruta del proteasoma [16].

Además, el factor inhibidor de HIF (FIH) hidroxila los HIFs en Asn803, lo que lleva a su actividad transcripcional disminuida. La disminución de la actividad de PHD y FIH durante los períodos de hipoxia estabiliza HIF- α y da como resultado su translocación al núcleo donde HIF- α heterodimeriza con HIF- β . El complejo HIF α/β se une a las regiones promotoras de los genes blanco que contienen elementos de respuesta a la hipoxia (HREs; 5'-RCGTG-3', donde R=A o G) y transactiva la expresión de genes involucrados en diversas vías de señalización [16].

La hipoxia crónica provoca un aumento en los niveles de EROs intracelular a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Las condiciones hipóxicas también aumentan los niveles de EROs a través de la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y eNOS. El aumento de EROs estabiliza el factor sensible a redox HIF-1 α y, por lo tanto, activa sus vías [16].

Se sabe que la expresión del gen HIF1 α puede regularse por otras vías, principalmente las vías de señalización intracelular, tales como la proteína cinasa B (Akt) y la 3- fosfatilinositol-cinasa (PI3K), aunque todavía no está claro su papel en estas vías de regulación. También están descritas otras moléculas reguladoras del HIF1A, tales como las especies reactivas de oxígeno (EROs) participantes en la carcinogénesis o citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la angiotensina [17].

El factor inducible por hipoxia es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del oxígeno. El factor de transcripción activa genes que codifican las proteínas que aumentan la disponibilidad del oxígeno y permiten la adaptación metabólica en ausencia de oxígeno, controlando la expresión de decenas de productos de los genes y proteínas implicados en la angiogénesis, la eritropoyesis, la glucólisis, la invasión, la apoptosis, el tono vascular, la regulación del

pH, la homeostasis epitelial y la resistencia a los fármacos. Se han identificado más de 60 genes diana inducidos por HIF, mientras que otros son suprimidos. En la **tabla 2** se muestra una lista de los genes que son transcripcionalmente activados por HIF [17].

Moléculas reguladas por HIF 1	
Molécula	Función
Ciclina G2 -IGF2 (factor de crecimiento insulínico tipo 2) -IGF-BP1 (factor de crecimiento insulínico- proteína de unión 1) -IGF-BP2 (factor de crecimiento insulínico- proteína de unión 2) -IGF-BP3 (factor de crecimiento insulínico- proteína de unión 3) -NOS2 (sintasa del óxido nítrico 2) -TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa) -VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)	Proliferación celular
-ADM (adrenomedulina)	Supervivencia Celular
-EPO (eritropoyetina)	Eritropoyesis
-Receptor adrenérgico α_{1B} -ADM (adrenomedulina) -ET1 (endotelina 1) -Hemo oxigenasa- 1 -NOS2 (sintasa del óxido nítrico 2)	Tono vascular
-HK1 (hexocinasa 1) -HK2 (hexocinasa 2) -AMF/GPI (factor de motilidad autocrino). -ENO1 (enolasa 1) -GLUT1 -GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa) -LDHA (lactato deshidrogenasa A) -PFKBF3 (6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa-3) -PFKL (fosfofructocinasa L) -PGK1 (fosfoglicerato cinasa 1)	Metabolismo de glucosa

-PKM (piruvato cinasa M) -TPI (triosefosfato isomerasa)	
-NIP3 -NIX -RTP801	Apoptosis
-MDR1 (resistencia a multifármacos)	Resistencia a fármacos
-Anhidrasa carbónica 9	Regulación de pH

Tabla 2: Genes que son transcripcionalmente activados por HIF-1. (Modificado de Fraga A. et al. 2009).

1.6.- Sistema de Defensa Antioxidante

Se considera como antioxidante a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL. El antioxidante al colisionar con él, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico [18].

1.6.1.- Superóxido Dismutasa (SOD)

Entre las enzimas antioxidantes conocidas, las superóxido dismutasas (SOD) actúan como una primera línea de defensa contra el estrés oxidativo en condiciones fisiológicas y patológicas. Se han identificado tres tipos de isoenzimas SOD en células humanas, las cuales son: SOD cobre zinc citosólica (SOD $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$; SOD1), SOD manganeso mitocondrial (*SOD-Mn*²⁺; SOD2) y SOD extracelular (ECSOD; SOD3) que contienen cobre y zinc [19]. Estas enzimas catalizan la reacción de dismutación, en la cual un elemento es oxidado y reducido al mismo tiempo. En este caso en particular el oxígeno es oxidado y reducido para formar O_2 y H_2O_2 , respectivamente.

SOD1 o SOD-Cu²⁺/Zn²⁺, se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas, y en la membrana externa mitocondrial. La enzima es un homodímero de 32 kDa con un Cu²⁺ y un Zn²⁺ por cada subunidad de 153 aminoácidos. Sólo el cobre tiene importancia catalítica, mientras que el Zn²⁺ confiere estabilidad a la estructura proteínica; sin embargo, ambos metales están muy conectados por un imidazolato que provee la histidina 63. Cuando se aisló SOD Cu²⁺/Zn²⁺ por primera vez, se pensó que era una proteína de almacenamiento de cobre; la función catalítica de SOD Cu²⁺/Zn²⁺ se descubrió en 1969 y se demostró que SOD Cu²⁺/Zn²⁺ actúa como un eliminador de superóxido. El radical anión superóxido (O₂^{•-}) es la principal ERO generada a partir del estrés oxidante en una célula, las SOD dismutan al O₂^{•-} a O₂ molecular y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a través de un mecanismo de transferencia electrónica de oxidación-reducción por ion metálico central (Cu²⁺) [19].



La enzima SOD Cu²⁺/Zn²⁺ contribuye a aproximadamente el 90% de la actividad de SOD celular en una célula eucariota. Está principalmente presente intracelularmente, en el citosol a una alta concentración (en el rango μM). Su expresión es inducida por estímulos mecánicos, químicos y biológicos como el choque térmico, radiaciones ultravioleta (UV), metales pesados y por supuesto, el estrés oxidante [19].

La mitocondria es, sin duda alguna, el organelo celular sometido a mayor estrés oxidativo, puesto que se estima que alrededor de 4 a 5% de los electrones transportados por la cadena respiratoria son desviados para producir O₂^{•-}. Por ello, resulta vital la presencia de la SOD Mn²⁺ dentro de la mitocondria. La SOD Mn²⁺, aunque se localiza en la mitocondria, está codificada en el núcleo, por lo que su expresión está regulada, en gran parte, por el estado redox de la mitocondria, también por diversas citosinas y factores de crecimiento tipo proinflamatorios como el TNF-α, IL-1, IL-6, entre otras, así como por inductores de estrés como el lipopolisacárido (LPS) o los metales pesados.

Esta enzima es un homotetrámero con un peso de 22 kDa por subunidad; tiene 4 sitios activos, cada uno contiene un átomo de manganeso que constituye el centro catalítico de la proteína. La SOD Mn^{2+} se encuentra en la matriz mitocondrial entre las crestas. El superóxido se genera en la mitocondria a partir de la reducción monoelectrónica de oxígeno molecular. La SOD Mn^{2+} reduce el estrés oxidante en la mitocondria catalizando la dismutación del superóxido formado por la cadena de electrones durante la respiración. Así, la acción de la SOD- Mn^{2+} protege la maquinaria respiratoria y el ADN mitocondrial, asegurando así la integridad mitocondrial [20].

La Superóxido Dismutasa Extracelular (ECSOD), o SOD3 (de 135 kDa) recientemente descubierta, es un homotetrámero similar a la SOD Cu^{2+}/Zn^{2+} que usa cobre para su función catalítica y zinc para mantener la estructura proteica. Sin embargo, a diferencia de la SOD Cu^{2+}/Zn^{2+} , esta se encuentra predominantemente en el espacio extracelular. Se ha demostrado que la ECSOD participa en la regulación de la concentración del superóxido disponible en la pared vascular, el cual interacciona con el radical óxido nítrico ($NO\cdot$) [20].

La SOD3 posee 60% de homología con la SOD Cu^{2+}/Zn^{2+} ; sin embargo, tiene muy poca homología con la SOD Mn^{2+} . El promotor del gen contiene varios elementos reguladores, incluyendo al elemento de respuesta antioxidante, a los sitios de unión a los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B, y a los elementos de respuesta xenobiótica [9].

1.6.2.- Catalasa

Las peroxidasas son las enzimas responsables de eliminar a los hidroperóxidos. Esta descomposición ocurre por medio de una reacción de oxidorreducción que emplea una molécula específica como agente reductor. Las peroxidasas pueden utilizar agentes reductores diferentes para llevar a cabo esta reacción, y pueden tener mecanismos catalíticos distintos. Las peroxidasas en general se agrupan en catalasas y peroxidasas [9].

La catalasa es una hemoproteína que se concentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias. Se han identificado tres grupos de catalasas: i) las catalasas monofuncionales, que contienen hemo y están presentes tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas, ii) las catalasas-Mn²⁺, que son enzimas hexaméricas que no tienen hemo, tienen Mn²⁺ en el sitio activo y sólo están presentes en algunos organismos procariotas anaerobios y iii) las catalasas-peroxidasas, que tienen actividad de catalasa y de peroxidasa, contienen hemo y sólo están presentes en las bacterias y los hongos [21].

Las catalasas son las enzimas que descomponen al H₂O₂ directamente en O₂ y agua (reacción 1). Para ello, emplean dos moléculas iguales de H₂O₂, una como agente reductor y otra como oxidante. Por su parte, las peroxidasas utilizan una molécula distinta del H₂O₂ como agente reductor (reacción 2). Es común también que las peroxidasas puedan reducir a hidroperóxidos distintos del H₂O₂, como los peróxidos orgánicos (reacción 3) [9].



Las catalasas catalizan la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno evitando así que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, especies de oxígeno que son muy reactivas. En el hombre, la catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos [21].

La catalasa es una de las enzimas más rápidas que existen. Una molécula de la enzima es capaz de catalizar la transformación de alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo [9].

1.6.3.- Nrf2

El Nrf2 es un factor de transcripción el cual se expresa de manera ubicua, que se activa en respuesta a cambios en el estado redox celular, el cual contiene 6 dominios altamente

conservados Neh1-6. El dominio Neh1 contiene un zipper de leucina básico de tipo CNC que es necesaria para la unión al ADN y la dimerización con otros factores de transcripción. Adicionalmente, se ha identificado un NLS (secuencia de localización nuclear) funcional en este dominio. El dominio Neh2 se une al dominio Kelch de Keap1, un regulador negativo de Nrf2, y tiene siete residuos de lisina que son responsables de la conjugación de ubiquitina, lo que conduce a la degradación proteasomal de Nrf2. Neh3 es necesario para la activación transcripcional reclutando un coactivador, CHD6. Neh4 y Neh5, ricos en residuos ácidos, son dos dominios de transactivación independientes que actúan de forma sinérgica e interactúan con la proteína de unión-CREB (CBP). Por último, el dominio Neh6 es muy concentrado en residuos de serina, pero no se sabe mucho sobre el papel y/o el significado del dominio Neh6 [22].

Tras la exposición de las células al estrés oxidativo o a los compuestos químicos, Nrf2 se transloca al núcleo, forma un heterodímero junto con Maf, y se une a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE) para activar la transcripción de varios tipos diferentes de genes. Los genes que regulados río abajo por Nrf2 identificados hasta ahora se pueden agrupar en varias categorías, que incluyen (i) proteínas de balance redox intracelulares: glutamato cisteína ligasa (GCL), glutatión peroxidasa (GPx), tioredoxina (Trx), tioredoxina reductasa (TrxR), hemo oxigenasa-1 (HMOX-1), (ii) Enzimas desintoxicantes fase II: glutatión S-transferasa (GST), NAD (P) H quinona oxidoreductasa-1 (NQO1) y UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), y (iii) transportadores: proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP). La función primaria de proteínas de equilibrio redox intracelular es mantener el glutatión celular y los niveles de Trx y reducir los niveles de EROs [22].

Basándose en la función de los genes diana Nrf2, se puede concluir fácilmente que la activación de Nrf2 puede proteger a las células del estrés generado por múltiples factores impuestos por la exposición tóxica. De hecho, la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 es uno de los principales mecanismos de defensa celular que facilitan la supervivencia celular bajo ataques tóxicos [22].

La actividad de Nrf2 está regulada negativamente por la proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch (Keap1). Keap1 contiene dos dominios principales, un dominio BTB y un dominio Kelch. Se ha demostrado que Keap1 es una proteína transportadora. Se ha propuesto que Keap1 actúa como un interruptor molecular que puede activar o desactivar la vía de señalización Nrf2 según las condiciones redox intracelulares. Al funcionar como un interruptor molecular, Keap1 posee funciones duales: es capaz de (i) "detectar" una perturbación en la homeostasis redox y (ii) activar o desactivar la respuesta mediada por Nrf2 [22].

1.6.4.- Papel del Estrés Oxidante en la Hipoxia-Reperfusión

Durante la hipoxia-reperfusión (HR) hay una generación excesiva de EROs por lo que se produce un desequilibrio redox el cual desempeña un papel clave en la patogénesis de la lesión por IR. Para demostrar la importancia del estrés oxidante y antioxidantes Wang & cols. (2017) [23] cultivaron células H9c2 con medio normal y una vez que las células alcanzaron $60 \pm 70\%$ de confluencia, se cultivaron con $500 \mu\text{mol/L}$ de H_2O_2 en DMEM que contenía FBS al 2% durante 18 horas para imitar el procedimiento de HR. Las células se pretrataron con metformina ($50 \mu\text{M}$), Compuesto C (un inhibidor de AMPK, $10 \mu\text{M}$), AICAR (un activador de AMPK, $100 \mu\text{M}$) durante 24 horas. Las ROS fueron medidas con 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA); ellos obtuvieron un mayor incremento en la fluorescencia en el grupo HR comparado con el resto de los grupos; también evaluaron SOD Mn^{2+} para determinar cómo se encontraba las enzimas antioxidantes y el grupo que presentó menor expresión de SOD Mn^{2+} fue el de los cardiomiocitos sometidos a HR sin ningún tipo de tratamiento. Estos resultados sugieren que la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes favorece el estrés oxidativo por la disminución que existe de estas durante el proceso de hipoxia-reperfusión [23].

1.6.5.- Papel del Estrés Oxidante en la Alta Glucosa

Aunque existe una fuerte evidencia experimental que indica que el estrés oxidativo puede determinar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías de la diabetes mellitus, aún hay controversia acerca de si el incremento de este fenómeno es meramente asociativo

más que causal en el caso de esta enfermedad metabólica; no obstante, se ha demostrado que existe un aumento de la producción de ROS y una disminución de las defensas antioxidantes en los sujetos que tienen alta glucosa [10].

Existen varios mecanismos implicados en el incremento del estrés oxidativo en la alta glucosa, entre los cuales se encuentran: la autooxidación de la glucosa, la glicación de proteínas, la activación de la vía de los polioles y la disminución de las defensas antioxidantes. La glucosa, al igual que otros alfa-hidroxialdehídos, es capaz de autooxidarse a enediones (enolizarse) en solución acuosa y en presencia de metales de transición, como el Fe^{3+} , reacción en la cual se producen citoaldehídos intermediarios oxidados y RL con un alto poder oxidante como el anión superóxido. La glicación de las proteínas antioxidantes puede disminuir la actividad de éstas y la hemoglobina glucosilada puede constituir una fuente donadora de radical O_2^- en la pared vascular en los diabéticos [10].

Zhou & Lu (2013) [24] realizaron cultivos de cardiomiocitos a partir de ratas Sprague-Dawley, los cuales se dividieron en tres grupos: células cultivadas en medio normal (grupo de control); células expuestas a AG (30 mmol/L); células tratadas con AG y glutatión antioxidante (GSH, 250 mmol/L); realizaron medición de las EROs a través de 2,7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y obtuvieron una mayor generación de EROs en el grupo expuesto a AG comparado con los grupos anteriormente mencionados, también midieron el malondialdehído (MDA) y SOD, en donde en el grupo tratado con AG el MDA se encontró elevado y la SOD disminuida comparado con el resto de los grupos. Estos datos sugieren que este aumento de las EROs en la AG trae consigo daño a moléculas como los lípidos y que los sistemas antioxidantes se encuentran disminuidos [24].

1.7.- Daño Ocasionado por las Especies Reactivas de Oxígeno

El incremento del estrés oxidativo puede resultar de un aumento en la producción de precursores de radicales libres, de un aumento de las EROs, de un incremento de las

catálisis pro-oxidantes, de una reducción de los sistemas antioxidantes o de una combinación de todos ellos. Las EROs presentan una alta reactividad, tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares, conociéndose que sus blancos fundamentales son los ácidos grasos insaturados de las membranas fosfolipídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos (ADN) [25].

1.7.1.- ADN

Se sabe que tanto las EROs como las especies reactivas de nitrógeno, así como otros agentes endógenos o exógenos, pueden modificar al ADN celular. El daño al ADN tiene consecuencias biológicas serias como mutaciones y transformaciones carcinogénicas, e incluso puede llevar a la muerte celular. También afectan la transducción de señales, la proliferación celular y la comunicación intercelular [9].

El radical hidroxilo es muy reactivo y tiene la capacidad no sólo de abstraer átomos de hidrógeno de la molécula de ADN, sino también de unirse a las bases formando aductos, lo cual produce una gran diversidad de daños. Otra molécula oxidante que puede propiciar daño en el ADN es el peroxinitrito [9].

La molécula de ADN es uno de los principales blancos del ataque por radicales libres en la célula y las modificaciones que sufre como consecuencia de esos ataques son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular, pérdida que puede prolongarse como consecuencia de las funciones del ADN como reservorio activo de información. Se ha reportado un daño oxidativo a diferentes niveles del ADN como lo es en las bases nitrogenadas, en el azúcar (desoxirribosa) y en la formación de uniones cruzadas (*cross-links*) ADN-ADN ó ADN-proteína [26].

Cuando el ataque oxidante es a nivel de las bases púricas (cabe mencionar que la guanina es la base nitrogenada que presenta el potencial de ionización más bajo entre los componentes de los ácidos nucleicos, por tanto, es la base más susceptible de ser oxidada), las dos modificaciones más frecuentes ocurren por la adición del radical hidroxilo a la posición C8 del anillo de la guanina. Esta modificación produce un radical que puede ser oxidado a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) o reducido a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-

formamidopirimidina (Fapy G). Si la interacción del radical OH es con bases pirimidínicas, la modificación más común es 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina o también llamada timidín glicol (**Figura 2**) [26].

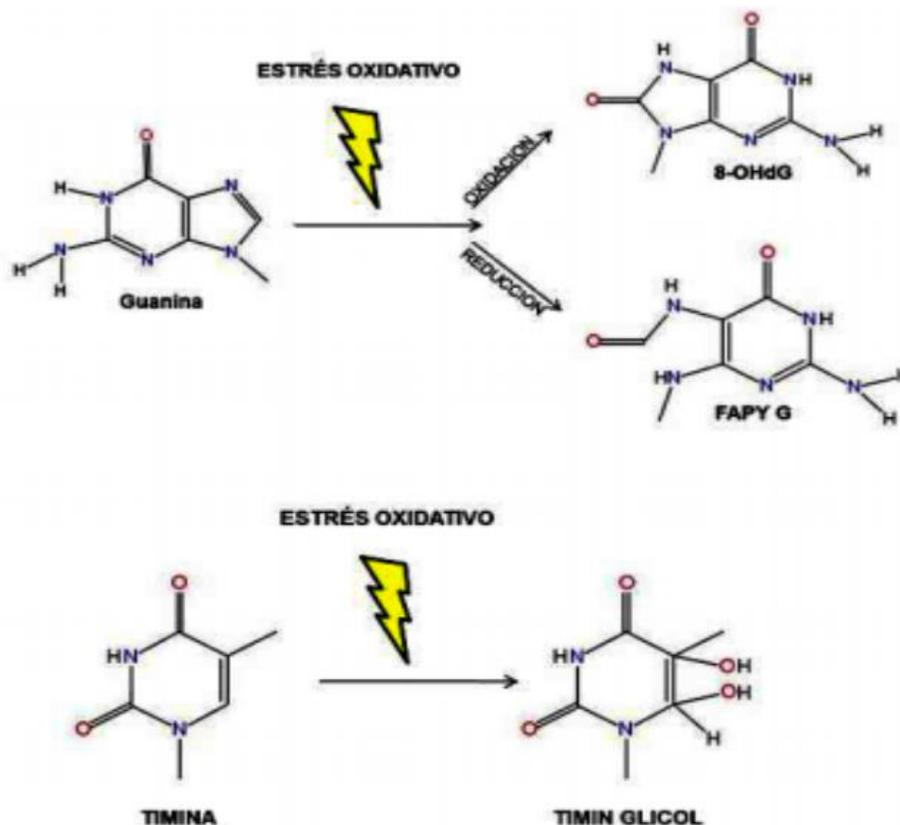


Figura 2: Cambios oxidoreductivos sobre bases nitrogenadas. a) cambios en la guanina, b) cambios en la timina (Tomado de: García, U, et al. 2015).

Los daños asociados con la desoxirribosa producen una pérdida de la base nitrógenada generando así sitios AP (apurínicos o apirimidínicos). Estos sitios se forman a través de la hidrólisis del enlace N-glicosídico de los nucleótidos del ADN (mayormente espontánea). De esta manera, la base es removida pero el esqueleto fosfodiéster permanece intacto creando un sitio AP. Aunque los sitios AP no son considerados letales, cuando están presentes en altos niveles pueden interferir con las enzimas ADN polimerasa y ADN ligasa y por ende ser altamente mutagénicos. La interacción de radical $\cdot\text{OH}$ con el ADN puede generar en presencia de oxígeno, radicales peróxido, los cuales pueden extraer átomos de hidrógeno de las fracciones de azúcares llevando a ruptura de las hebras de ADN [26].

La relación de concentraciones entre 8-OHdG/dG se considera un marcador por excelencia del daño oxidativo causado por los RL sobre el ADN [27].

1.7.2.- Proteínas

El estrés oxidativo puede dañar a las proteínas de manera similar a como ocurre en otras macromoléculas. Sin embargo, para el caso de las proteínas, la situación es más compleja por dos razones. Por un lado, la oxidación parcial y selectiva en algunos casos produce proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasia celular. En este caso, la oxidación de proteínas tendría un papel totalmente fisiológico. Por otro lado la oxidación de las proteínas puede resultar en una alteración de estas y llevar a cabo acciones distintas a la que les competen a las proteínas, haciendo que la célula sea disfuncional [9].

En proteínas y carbohidratos, los radicales libres pueden inducir fragmentación con la pérdida de la función de estas moléculas. Los aminoácidos aromáticos, la cisteína, los enlaces disulfuro y los enlaces peptídicos son fragmentados por los radicales libres alterándose su estructura y su función [28].

El radical hidroxilo es muy reactivo con las proteínas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos. En particular, el radical hidroxilo ataca a la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína, forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas. Las proteínas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas debido a la formación de grupos carbonilo, a la creación de nuevos grupos N-terminales o a cambios conformacionales de la molécula. Datos experimentales muestran que el radical peroxinitrito (ONOO-) oxida a las proteínas membranales y citoplásmicas, afectando su naturaleza física y química [28].

Diversas reacciones de oxidación pueden convertir algunos residuos de aminoácidos, como la prolina, la arginina y la lisina, a derivados de tipo carbonilo. La presencia de este grupo químico se ha utilizado como un parámetro para evaluar el daño oxidativo en las proteínas.

De esta manera, se ha estimado que 2 nmol de grupos carbonilo por miligramo de proteína, cantidad observada en personas jóvenes, representan un daño del 10% del total de las proteínas celulares, mientras que en los ancianos este porcentaje se incrementa a 20 y 30% del total de las proteínas celulares [28].

En otro proceso, el peroxinitrito puede hidroxilar la fenilalanina y nitrar la tirosina. Con respecto a esto se desconocen las consecuencias biológicas de la nitración de las proteínas *in vivo*. Sin embargo, se ha observado una abundante nitración de las proteínas en pacientes con aterosclerosis, lo que tal vez podría tener alguna relación con el padecimiento [28].

Con respecto a la concentración de proteasas, cabe mencionar que algunas formas de proteínas oxidadas (proteínas con entrecruzamientos modificados por glicación, o por productos de la lipoperoxidación) no sólo son resistentes a la proteólisis, sino que pueden inhibir la habilidad de las proteasas para degradar las formas oxidadas de las proteínas. La acumulación de proteínas oxidadas es la base de un conjunto de posibles problemas para las células y los individuos, y en parte depende de la eficacia de los sistemas responsables para la eliminación de las proteínas modificadas por la oxidación [9].

En el citosol y en el núcleo existen proteosomas, y en la mitocondria son las proteasas las encargadas de degradar las proteínas oxidadas. Las células cuentan con enzimas específicas para la reparación. La tioredoxina reductasa es capaz de revertir los productos de oxidación de la cisteína a cistina [9].

Las proteínas son los blancos más abundantes en las células y tejidos para los numerosos agentes químicos y físicos que llegan a producir estrés oxidativo.

1.7.3.- Lípidos

Los ácidos grasos participantes de las membranas de las células animales generalmente tienen de 14 a 24 átomos de carbono. Los lípidos de la membrana son moléculas anfipáticas (poseen una parte polar o hidrofílica y una no polar e hidrofóbica), contienen regiones hidrocarbonadas con poca afinidad por el agua y al estar en presencia de ella tienden a agregarse en forma de bicapa exhibiendo su región hidrofílica. La fluidez de la membrana

se debe a la presencia de las dobles ligaduras de los ácidos grasos poliinsaturados, cuando hay daño en estos ácidos grasos o cuando disminuye la cantidad de ligaduras dobles, la membrana se vuelve rígida [9].

La interacción de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) con los lípidos de las membranas biológicas ocasiona la producción de diversos compuestos tóxicos, altera su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las proteínas, las enzimas, los receptores o canales iónicos asociados a ellas, situación que compromete la estructura y función celular. Los ácidos grasos saturados o los monoinsaturados que forman parte de la membrana son poco susceptibles al ataque de las EROs, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados linoléico, linolénico y araquidónico, son rápidamente atacados debido a la presencia de sus enlaces dobles conjugados, los que debilitan la energía de unión del átomo de hidrógeno presente en el carbono adyacente a los enlaces. Es precisamente esta alta reactividad lo que hace que la peroxidación de los lípidos en los sistemas biológicos sea un proceso autocatalítico y de propagación [9].

La peroxidación de los lípidos de las membranas puede ocurrir tanto por la vía no enzimática como por la enzimática. Durante la peroxidación no enzimática, las EROs inician el daño oxidativo en los lípidos de la membrana y los radicales libres de los lípidos resultantes propagan el proceso de la peroxidación. Lo anterior permite la acumulación de hidroperóxidos que finalmente se descomponen en una gran variedad de productos terminales en donde los principales son el malondialdehído (MDA), el hexanal y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Por otro lado, en la lipoperoxidación enzimática los ácidos grasos oxidados son liberados de los lípidos de las membranas por fosfolipasas y otras lipasas [9].

La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la de los orgánulos celulares. Las alteraciones de la permeabilidad afecta tanto el transporte pasivo como el activo al alterarse las interrelaciones de fluidez de los lípidos que forman las membranas biológicas [28].

Los ácidos grasos poli-insaturados que predominantemente se ubican en las membranas celulares son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres. Cuando los

radicales hidroxilo se forman cerca de la membrana son capaces de extraer átomos de hidrógeno de los fosfolípidos que la componen. Después de esta reacción, aunque el hidroxilo original se ha inactivado, se forma un radical lipídico que después de un rearrreglo molecular (dieno conjugado), puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo ($R-OO\cdot$) [28].

El radical peroxilo ($R-OO\cdot$) puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se transforma en hidroperóxido ($R-OOH$). El hidroperóxido, en presencia de varios complejos metálicos, puede descomponerse en más radicales, incluyendo entre ellos al radical hidroxilo, lo que provoca un fenómeno de expansión del daño, en el que se considera que la peroxidación se ha propagado [28].

En ausencia de iones metálicos, los hidroperóxidos pueden acumularse en la membrana y alterar su función. Pueden transformarse en aldehídos, dentro de los que el más estudiado es el malondialdehído y puede provocar daño a otras moléculas como el ADN. Alternativamente, el radical peroxilo puede dar origen a peróxidos cíclicos, los que pueden descomponerse para formar radicales lipídicos. A este fenómeno globalmente se le denomina lipoperoxidación y en ausencia de algún proceso que la inhiba puede provocar la rápida destrucción de la fase lipídica de las membranas [28].

Como se ha mencionado anteriormente, cuando los radicales libres de ácidos grasos poliinsaturados reaccionan entre sí se pueden formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclarse, creando aglomerados que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana. La alteración en la permeabilidad de la membrana implica que ésta permite la entrada de diversos solutos a la células sin ningún control, pero principalmente permite la entrada de agua por osmosis, lo cual hincha a la célula hasta el extremo de hacerla reventar y con ello causar su muerte [9].

En cuanto a la pérdida de la fluidez, se ha asociado a otro tipo de alteraciones como disminución en la actividad de algunos receptores. Por ejemplo, la unión de las hormonas proteínicas a sus receptores membranales y alteraciones en los complejos de la cadena

respiratoria mitocondrial, entre otras. De modo que la peroxidación de los lípidos puede dañar tanto la estructura como la función de las células y los tejidos, lo que está asociada con diferentes enfermedades entre las que destaca la aterosclerosis (por la peroxidación de LDL) y el daño tisular causado por infarto de miocardio [9].

Por otro lado y de manera indirecta, los principales productos de la peroxidación de lípidos también pueden reaccionar con otras moléculas y dañar de esta manera a las células. Entre estos productos se incluyen los dienos conjugados, alcanos (pentano, etano), etileno y aldehídos, ya que algunos de éstos pueden reaccionar con los grupos amino de la lisina y de otros grupos aminoácidos constituyentes de las proteínas. También hay que tomar en cuenta que los lipoperóxidos pueden inhibir la actividad de algunas enzimas. Además, los radicales ROO• formados durante el proceso de peroxidación de lípidos tienen la capacidad de inhibir la transcripción del ADN [9].

Entre los métodos más frecuentemente empleados para evaluar la lipoperoxidación son los que miden los productos de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, tales como el malondialdehído (MDA) y otros dialdehídos que son sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico razón por la cual se les designa TBARS [9].

1.8.- Implicación de las Especies Reactivas de Oxígeno en la Hipoxia-Reperusión

Dentro del mecanismo del daño por reperusión se encuentra la paradoja del oxígeno, en la cual se propone que en el momento en el que se produce una súbita reintroducción de oxígeno a la célula se produce el daño por reperusión debido a la formación de radicales libres. La reducción de los componentes de la cadena respiratoria como el citocromo C₁ (incremento de C₁- Fe²⁺) crea condiciones favorables para la generación de radicales superóxido por la mitocondria cardiaca. Además, la reducción de glutatión (incremento de GSH) junto con la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa, que son agentes antioxidantes naturales, provocan una elevación de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, que son altamente reactivos y tóxicos para la célula. Otra fuente de radicales libres son los macrófagos que migran hacia el sitio de la isquemia; también se ha documentado la producción de radicales libres por la célula endotelial. Con el incremento

de radicales libres ocurre la peroxidación de las membranas y facilita una sobrecarga de Ca^{2+} [29].

Las reacciones de Fenton que ocurren durante la reperfusión se han implicado en el proceso oxidativo. La reacción de Fenton es la formación de radicales libres de oxígeno como el ión hidroxilo a partir de la interacción del Fe^{3+} con el radical libre superóxido [29].

La presencia de glucosa durante el periodo hipóxico también juega un papel importante en la prevención del daño por reoxigenación. Cuando el músculo papilar cardiaco es privado de glucosa y oxígeno, aparecen arritmias dependientes de Ca^{2+} y cuando la glucosa es añadida durante el periodo hipóxico, previene el desarrollo de arritmias en el periodo de reperfusión. Esto se ha explicado por dos mecanismos: uno es porque la glucosa interviene como un agente antioxidante, manteniendo el flujo a través de la vía de las pentosas y el otro es porque la glucosa mantiene un continuo aporte de energía y con esto se conserva el control de Ca^{2+} citosólico [29].

Cambios fisiológicos y bioquímicos observados en el miocardio con hipoxia-reperfusión: Los cardiomiocitos toleran breves episodios de hipoxia-reperfusión miocárdica transitoria. La hipoxia tisular reversible en primera instancia no provoca muerte celular pero si puede lesionar estas células. Las oclusiones totales hasta por 15 minutos de un segmento proximal de una arteria coronaria causa daño reversible, y después de ese tiempo, puede producir lesión irreversible. Los periodos de isquemia de 15 minutos inducen numerosos cambios en los miocitos que hacen que no se contraigan o que su contracción sea débil, incluyendo la depleción de glucógeno, etc [30].

Cuando hay una oclusión súbita de una arteria epicárdica después de unos segundos, el metabolismo energético pasa de aeróbico a glucólisis anaeróbica con la consiguiente acumulación de ácido láctico y de iones hidrógeno H^+ produciéndose acidosis y un leve edema intracelular que estresa y estira la membrana con lo que se puede llegar a lesionarla. Una vez re-establecida la reperfusión en la normalización del flujo sanguíneo coronario, en el tiempo post-isquémico, los miocitos se recuperan, siempre y cuando la tensión producida por el edema no haya lesionado de forma irreversible la membrana [30].

Durante los primeros minutos de hipoxia miocárdica, se liberan de estos tejidos diversas sustancias, tales como la bradicinina, opiáceos, noradrenalina y angiotensina II, acetilcolina y endotelina hacia el líquido extracelular. El calcio intracelular aumenta, pues el aumento de hidrógeno H^+ intracelular de la hipoxia hace que aumente el sodio intracelular a través del intercambio Na^+/H^+ . El aumento de sodio intracelular debería servir para atraer calcio al interior de las células por intercambio sodio/calcio; esta sobrecarga de calcio activa fosfolipasas y proteasas. En resumen los principales factores que condicionan el daño miocárdico una vez restablecido el flujo coronario después de un episodio de isquemia miocárdica son los siguientes: [30]

A) *radicales libres*: Con la llegada súbita de oxígeno, aparece un gran exceso de radicales libres que alcanzan un pico dentro de los 4-7 minutos del inicio de la reperfusión.

B) *reentrada de calcio*: el aumento de la permeabilidad de la membrana permite el acceso masivo de calcio al interior del cardiomiocito. Se producen alteraciones en la troponina y en el acoplamiento excitación-contracción, ya que en presencia de niveles supranormales de calcio las contracciones son de menor magnitud que la normal por disfunción del retículo sarcoplásmico e insensibilidad de los miofilamentos al calcio.

C) *intercambiadores sodio/hidrógeno y sodio/calcio*: los cuales se activan para reestablecer el pH.

D) *células inflamatorias*: durante la reperfusión se acumulan leucocitos en el área isquémica. Los neutrófilos y monocitos activados se unen a las células miocárdicas a través de las moléculas de adhesión, liberando sustancias tóxicas para las células endoteliales y miocárdicas incluyendo radicales superóxido, proteasas, elastasas lo que altera los mecanismos de vasorelajación y antitrombótico del endotelio.

E) *óxido nítrico*: contribuye a la formación de radicales libres como el peroxinitrito.

1.9.- Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) un radical libre gaseoso, es una molécula lipofílica muy versátil que actúa como un mensajero intracelular y transcelular; de ella se empezó hablar en 1980, gracias a los estudios realizados por Furchgott y Zawadzki quienes inicialmente la denominaron factor relajante del endotelio. Actualmente se sabe que interviene en diferentes procesos fisiológicos y patológicos [31].

El NO se libera de manera pulsátil, es muy lábil, posee un electrón no apareado y tiene una vida media muy corta, aproximadamente seis segundos. Por ser un radical libre, es una molécula inestable que logra estabilizarse al unirse a otras especies paramagnéticas como el oxígeno formando nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) [31].

El NO es el activador endógeno de la guanilato ciclasa soluble que permite la formación de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), que actúa como «segundo mensajero» en muchos tipos de células, incluidas las células nerviosas, las células del músculo liso, los monocitos y las plaquetas. El nitrógeno y el oxígeno son vecinos en la tabla periódica y el NO comparte bastantes propiedades con el O_2 . En concreto, tiene una alta afinidad por el grupo hemo y otros grupos con hierro y azufre. Esto es importante para la activación de la guanilato ciclasa, que contiene un grupo hemo, para la inactivación del NO por la hemoglobina y para la regulación de la difusión del NO desde las células endoteliales (que expresan la cadena α de la hemoglobina) al músculo liso vascular [32].

1.9.1.- Síntesis de Óxido Nítrico

Las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS) son fundamentales para el control de la biosíntesis del NO. Existen tres isoenzimas conocidas de la NOS: una forma *inducible* (iNOS o NOS2; se expresa en macrófagos y células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular y células endoteliales en respuesta a estímulos patológicos, como los microorganismos invasores) y dos formas *constitutivas*, que están presentes en condiciones fisiológicas en el endotelio (*eNOS* o NOS3) y las neuronas (nNOS o NOS1). Las enzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO, mientras que la isoforma iNOS sintetiza

cantidades mucho mayores debido a su actividad más intensa y su abundancia, al menos en los estados patológicos asociados a la liberación de citocinas [32].

1.9.2.- Estructura de la NOS

Las tres isoenzimas NOS son dímeros; estructural y funcionalmente son complejas. Cada isoenzima contiene protoporfirina IX férrica (hemo), dinucleótido de adenina flavina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄) como grupos prostéticos unidos a ellas. También contienen lugares de unión para L-arginina, dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido (NADPH) y el complejo calcio-calmodulina. Estos ligandos y grupos prostéticos controlan el acoplamiento de la enzima en el dímero activo. Las enzimas NOS combinan actividades oxigenasa y reductasa. El dominio oxigenasa contiene hemo, mientras que el dominio reductasa se une al complejo calcio-calmodulina. En estados patológicos, la enzima puede sufrir un cambio estructural que origina la transferencia de electrones entre sustratos, cofactores enzimáticos y productos que se «desacoplan», de modo que los electrones se transfieren al oxígeno molecular para producir anión superóxido en lugar de NO, el anión superóxido reacciona con el NO para generar un producto tóxico el anión peroxinitrito (**Figura 3**) [32].

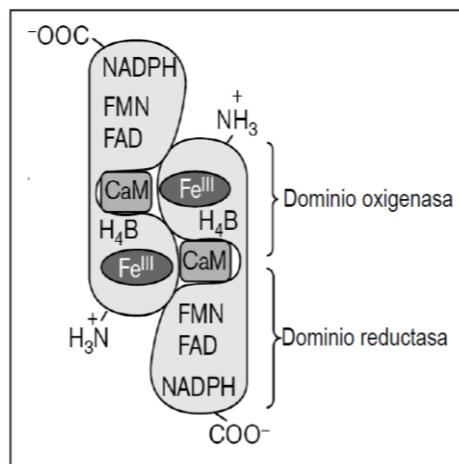


Figura 3: Estructura Esquemática de la NOS (Tomado de: Groves y Wang 2000).

Después de que se generó el NO, este difunde a las células próximas y son dos las principales vías de señalización del NO: (1) la producción de GMPc y (2) la S-nitrosilación

de grupos tioles proteínicos, que están moduladas, respectivamente, por la fosfodiesterasa 5 (PDE5) [33].

El NO se une a la porción hemo de la guanilil ciclasa soluble (GCs), a la que activa y aumenta la producción de GMPc que, a su vez, activa a la proteincinasa G (PKG) y modula la actividad de diversas fosfodiesterasas (PDE). A bajas concentraciones de NO (rango nM), el GMPc inhibe la PDE3, con el consiguiente aumento en los valores de AMPc, que activan la PKA y la corriente de entrada de Ca^{++} a través de los canales L de la membrana ($\text{I}_{\text{Ca}^{++}\text{L}}$). A mayores concentraciones de NO (rango $\mu\text{mol/l}$), la PKG inhibe la $\text{I}_{\text{Ca}^{++}\text{L}}$ y fosforila la troponina I, disminuyendo la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{++} y la formación de enlaces cruzados durante la diástole [33].

1.9.3.- Función del Óxido Nítrico en el Corazón

El óxido nítrico puede ser producido por prácticamente todas las células del corazón, actúa como regulador paracrino, autocrino e intracrino de la función cardíaca a través de acciones directas sobre los cardiomiocitos y de acciones indirectas, consecuencia de sus efectos vasculares [33].

En el miocardio, el NO regula, entre otros procesos, el acoplamiento excitación-contracción, la frecuencia cardíaca, el tono autonómico, la respiración mitocondrial (metabolismo energético), los procesos de hipertrofia y apoptosis, y la fase tardía del preconditionamiento isquémico. A escala vascular, el NO regula el tono vascular, la perfusión coronaria, la permeabilidad capilar y la agregación plaquetaria y, además, desempeña un importante papel en el control de la angiogénesis, la inflamación y la proliferación celular vascular. La regulación de todos estos procesos es sumamente compleja y depende no sólo de las concentraciones de NO, sino también del compartimiento celular donde se esté generando y de la vía de señalización activada, la situación fisiopatológica analizada, el estado redox celular y la presencia de otros mediadores celulares. La eNOS se expresa en el endotelio vascular y endocardio, así como en los cardiomiocitos en donde se localiza en las caveolas del sarcolema y, en particular, de los túbulos T [33].

La principal regulación postranscripcional de eNOS tiene lugar a través de la fosforilación de la Ser1177, que aumenta su actividad. Éste es el punto de acción de las proteincinasas B (Akt), A (PKA), C (PKC) y G (PKG) [33].

El NO disminuye la frecuencia cardíaca en cardiomiocitos aislados; controla la actividad de los canales de Ca⁺⁺ tipo-L y RyR2. La eNOS acelera la relajación, aumenta la longitud de los cardiomiocitos en diástole [33].

1.10.- Receptores que Activan la Proliferación Peroxisomal (PPARs)

1.10.1.- Definición

Los PPARs son proteínas transductoras que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Los receptores nucleares (RNs) son factores de transcripción (FT) activados por ligando que modulan la expresión de diferentes genes [34]. Estos están implicados en la adipogénesis, el metabolismo de lípidos, la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis metabólica. En mamíferos, hasta ahora se han descrito tres isoformas diferentes de PPAR: PPAR- α , PPAR- β/δ y PPAR- γ [35].

1.10.2.- Estructura de los PPARs

La estructura de los RNs está conformada por dominios conservados denominados A/B, C, D y E/F, partiendo del extremo N-terminal al C-terminal. La región A/B comprende el primer dominio de activación transcripcional (AF-1) que varía en secuencia y longitud entre los diferentes miembros y contiene determinantes estructurales para la interacción con la maquinaria de transcripción basal y la regulación de su actividad, posteriormente se encuentra la región C que presenta el dominio de unión al ADN (DBD) la cual consiste en dos dedos de zinc que promueven la unión del PPAR a los elementos de respuesta de los receptores que activan la proliferación peroxisomal (PPRE) en la región del promotor de los genes blanco. La región D además de contener una secuencia de localización nuclear (NLS), actúa como una estructura de “bisagra” entre la región C y E involucrada en los cambios conformacionales de los RNs. La región E contiene el dominio de unión al ligando (LBD) y un segundo dominio de función de activación transcripcional (AF-2).

Algunos RNs presentan una región F relacionada con la modulación de su actividad (Figura 4) [34].

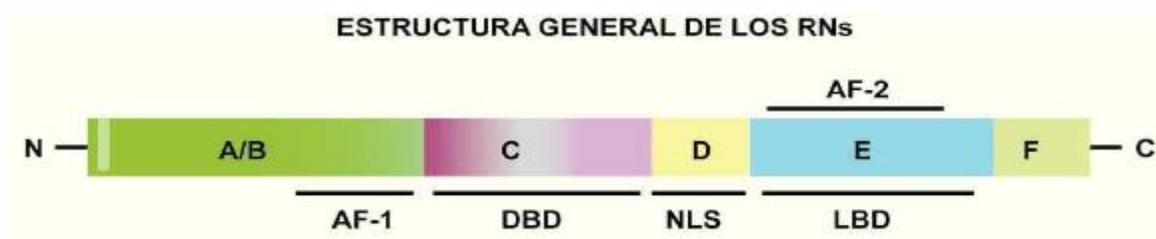


Figura 4: Dominios funcionales de los RNs. (Tomado de: Ortega D. et al. 2015)

Localización de PPARs: PPAR- α se expresa principalmente en tejidos demandantes de energía que muestran altas tasas de β -oxidación (es decir, hígado, riñón, corazón, endotelio, músculo liso y esquelético). Por otro lado, PPAR- β / δ es el más extensamente distribuido, es decir se expresa de forma ubicua en humanos, mientras que en ratones se expresa en mayor grado en el tubo gastrointestinal, específicamente estómago, intestino grueso y delgado. PPAR- γ se expresa en niveles elevados en el tejido adiposo [35].

1.10.3.- RXR y Heterodimerización

A diferencia de los receptores de hormonas esteroides, que funcionan como homodímeros, los PPARs forman heterodímeros con el receptor de retinoide X (RXR). Al igual que los PPARs, el RXR existe como tres isoformas distintas: RXR α , β , y γ , todas las cuales son activadas por el agonista endógeno 9-cis ácido retinoico. Aún no se han elaborado roles específicos para estas diferentes isoformas dentro del complejo PPAR: RXR. Sin embargo, los agonistas de RXR sintéticos ("resinoides") pueden activar el complejo y obtener resultados antidiabéticos similares a los observados con los agonistas de PPAR en modelos de diabetes tipo 2 en ratones [36].

1.10.4.- Mecanismo de Acción

La unión del ligando ya sea endógeno o exógeno hace que los receptores nucleares PPARs formen un heterodímero con el receptor nuclear del ácido 9-cis retinoico (RXR). La formación de este heterodímero es esencial para muchas de las funciones reguladoras de los

PPARs, el cual se une entonces a la región reguladora de varios genes para regular su transcripción. Este complejo activador (PPAR-RXR) se une al ADN y reconoce una secuencia específica de nucleótidos conocida como PPRE (elemento de respuesta a PPAR), constituida por dos semi-dominios repetidos y separados por un solo nucleótido. Cuando al heterodímero se unen sus ligandos respectivos (por ejemplo, ácido graso insaturado de cadena larga al PPAR y ácido cis-retinoico al RXR), se lleva a cabo un reclutamiento proteico activador y se inicia la transcripción del gen. El heterodímero puede también reprimir la transcripción de genes al unirse directamente a las regiones promotoras y ser activados por sus ligandos; en este caso interactúan directamente con represores proteicos de los genes blanco [37].

1.10.5.- PPREs

Los elementos de respuesta del proliferador de peroxisomas (PPREs) son elementos de repetición directa (**DR**) -1 que consisten en dos hexanucleótidos con la secuencia de consenso AGGTCA separados por un único espaciador de nucleótidos. Tal secuencia, o una similar, se ha encontrado en numerosos genes inducibles por PPAR, entre los que se incluyen la acil-CoA oxidasa y la proteína de unión a los ácidos grasos de los adipocitos. Los elementos *Cis* adyacentes al sitio central de PPRE (especialmente 5') parecen jugar un papel en la unión selectiva de estos elementos de respuesta. Curiosamente, PPAR: RXR se une al PPRE con una polaridad inversa en comparación con los receptores de vitamina D (VDR): RXR y receptor de tiroides (TR): RXR en los elementos DR-3 y DR-4, respectivamente [36].

1.10.6.- Coactivadores y Correpresores

Se han identificado varias proteínas cofactores, coactivadores y corepresores que median la capacidad de los receptores nucleares para iniciar (o suprimir) el proceso de transcripción. Los coactivadores interactúan con los receptores nucleares de forma dependiente de agonistas a través de un motivo conservado LXXLL (donde X es cualquier aminoácido) [36].

Varios coactivadores, incluidos CBP/ p300 y coactivador de receptor de esteroides (SRC) - 1, poseen actividad de histona acetilasa que puede remodelar la estructura de la cromatina. Un segundo grupo, representado por los miembros del complejo DRIP/TRAP, como la proteína de unión a PPAR (PBP)/TRAP220, forma un puente entre el receptor nuclear y la maquinaria de inicio de la transcripción [36].

El rol preciso de un tercer grupo, que incluye PGC-1, RIP140 y ARA70, no se conoce bien a nivel molecular. En su forma más simple, una secuencia de eventos en la que coactivadores con complejo de actividad de histona acetilasa con ligando, receptores PPAR/RXR unidos a PPRE, interrumpen nucleosomas y estructura de cromatina "abierta (se abra)" en la vecindad de la región reguladora de un gen. Los complejos tales como DRIP/TRAP se reclutan y proporcionan un enlace directo a la maquinaria de transcripción basal. Como resultado, se induce el inicio de la transcripción [36].

1.10.7.- Ligandos

Todos los ligandos conocidos de los PPARs tienen cierta similitud estructural , al menos en ciertas regiones de la molécula, y la interacción PPAR-ligando se produce principalmente por interacciones cuya estabilidad está determinada por fuerzas del tipo Van der Waals [38].

Ligandos de PPAR- α : se puede activarse mediante una amplia variedad de ácidos grasos saturados e insaturados, que incluyen ácido palmítico, ácido eicosatetraenoico (ETA), el ácido linoleico (AL), el ácido linolénico (ALN), ácido oleico, y ácido araquidónico (derivados del ácido araquidónico por las vías de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa). Se ha encontrado que varios ácidos grasos se unen al receptor directamente con afinidades micromolares. El metabolito 8- hidropéroxido del ácido eicosatetraenoico 8(S)-HETE de la lipoxigenasa se identificó como un ligando submicromolar para PPAR α pero aparentemente no está presente en niveles suficientemente altos en la célula para ser clasificado como un verdadero ligando natural. En lugar de ligandos endógenos de alta afinidad, es plausible que PPAR α funcione principalmente como un sensor de los niveles de ácidos grasos libres en los tejidos donde se expresa [36]. Ligandos sintéticos:

GW501516, GW0742, hipolipemiantes fibratos como: clofibrato, gemfibrozil y fenofibrato [38].

PPAR- β/δ : compuestos sintéticos: bezafibrato [38].

Al igual que otros PPAR, el PPAR δ interactúa con ácidos grasos saturados e insaturados; su selectividad de ligando es intermedia entre la de PPAR γ y PPAR α . En particular, los ácidos grasos poliinsaturados ácido dihomo- γ -linolénico, EPA y ácido araquidónico tenían afinidades micromolares bajas para PPAR δ . El ácido palmítico y su análogo metabólicamente estable, el ácido 2-bromopalmítico, también se identificaron como agonistas de PPAR δ . Se ha demostrado que varios eicosanoides, incluidos PGA1 y PGD2, activan PPAR δ . La carbaprostaciclina, una prostaglandina semisintética, también es un agonista micromolar de PPAR δ . Los niveles fisiológicos de su precursor natural, la prostaciclina, sin embargo, son desconocidos debido a su inestabilidad metabólica [36].

PPAR- γ : ligandos sintéticos: glitazonas, tiazolidinedionas.

Ligandos naturales: ácidos grasos y los derivados de eicosanoides se unen y activan PPAR γ en concentraciones micromolares. PPAR γ claramente prefiere los ácidos grasos poliinsaturados, incluidos los ácidos grasos esenciales como ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico. Sin embargo, sus rangos de concentración intracelular son desconocidos. La conversión de ácido linoleico a 9-HODE y 13-HODE por 15-lipoxigenasa puede proporcionar agonistas micromolares adicionales de PPAR γ [36].

Un derivado de PGD2, 15-deoxi- Δ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), demostró ser un ligando agonista débil (2–5 μ M) de PPAR γ , aunque la relevancia fisiológica de este ligando no está claro porque las concentraciones celulares no se pueden determinar con precisión [36].

1.10.8.- PPAR α

El PPAR α murino fue el primer miembro de esta subclase de receptor nuclear que se clonó. Posteriormente se ha clonado a partir de rana, rata, conejo y humano. El PPAR α humano se

ha mapeado en el cromosoma 22 adyacente a la región 22q12-q13.1 [36]. PPAR- α es también llamado NR1C1, su activación ocurre principalmente en condiciones de privación de energía. Esto conduce a la regulación al alza del metabolismo energético intracelular, induciendo finalmente la producción de ATP a partir de la fosforilación oxidativa. El ARNm de PPAR- α se regula positivamente en el hígado de ratón durante el ayuno, mientras que los ratones knock-out (KO) de PPAR- α muestran una hipoglucemia significativa, hipocetonemia, hipotermia y aumento de los ácidos grasos libres en plasma, sugiriendo una inhibición de la absorción y oxidación de ácidos grasos [35].

Se ha demostrado que PPAR α desempeña un papel fundamental en la regulación de la recaptura, activación y la β -oxidación de los ácidos grasos los cuales, son utilizados como fuentes de energía por otros tejidos, así como cuerpos cetónicos en el cerebro. PPAR α induce la expresión de la proteína de transporte de ácidos grasos (FATP) y FAT, dos proteínas que transportan los ácidos grasos a través de la membrana celular. La activación de PPAR α también regula directamente la transcripción de la acetil-CoA sintasa de ácido graso de cadena larga, así como la acetil CoA oxidasa (ACO), la enzima multifuncional enoil-CoA hidratasa / deshidrogenasa y la ceto-acil-CoA tiolasa enzimas en la vía de la β -oxidación peroxisomal [36]. Así como también regula la transcripción de genes importantes cetogénicos como 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 2 (HMGCS2), 3-hidroximetil-3-metilglutaril-CoA liasa (HMGCL) y acetil-CoA acetiltransferasa 1 (ACAT1) [35].

La carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I) cataliza el paso limitante de la velocidad en la translocación de los ácidos grasos activados a la membrana interna de las mitocondrias, donde ocurre el paso más productivo en su catabolismo. Esta enzima está fuertemente inducida por los ligandos de PPAR α , y se ha identificado un PPRE funcional. También se han informado otros genes que responden a PPAR α en esta vía metabólica mitocondrial, incluidas varias acil-CoA deshidrogenasas [36].

Los fibratos y otros proliferadores de peroxisomas activan la expresión de los CYP4A, y se han encontrado PPREs funcionales en las regiones reguladoras de los genes CYP4A. En resumen, PPAR α es un importante sensor de lípidos y regulador del metabolismo de la energía celular [36].

La inducción de PPAR- α también ejerce una actividad antiinflamatoria en modelos de ratón, aunque se informan datos contrastantes. La primera evidencia de la participación de PPAR- α en la regulación de la inflamación fue proporcionada por el grupo de Wahli hace más de 20 años. Los autores demostraron que el leucotrieno B4 actúa como un ligando para la transcripción de PPAR- α , y la respuesta inflamatoria se prolonga en los ratones KO para PPAR- α . Por el contrario, el tratamiento dietético con agonistas de PPAR- α aumentó los niveles plasmáticos de factor de necrosis tumoral (TNF- α) que en cambio se reduce en ratones deficientes en PPAR- α [35].

1.10.9.- PPAR α en la Hipoxia-Reperfusión

Estudios previos han sugerido que los agonistas de PPAR α , además de sus efectos beneficiosos sobre la homeostasis de los lípidos, podrían reducir la progresión de las lesiones ateroscleróticas mediante una acción anti-aterogénica y antiinflamatoria directa. De hecho, la activación de PPAR α da como resultado la inducción de enzimas antioxidantes y la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios, como la interleucina 6, la ciclooxigenasa 2 y la endotelina dentro de las células vasculares a través de la regulación negativa de las vías de señalización controladas por el factor nuclear κ B (NF κ B) y la proteína activadora-1 (AP-1). Taberero et al. (2002) [39] realizó un estudio para evaluar el efecto de los PPAR α sobre la lesión por isquemia reperfusión en ratones cepa C57BL/6, en donde al grupo control se le administró placebo y a otro grupo se le administró fenofibrato mezclado en la comida (15 mg/día) y dentro de los resultados más relevantes que obtuvieron fue que el tratamiento con fenofibrato redujo significativamente el tamaño del infarto de miocardio inducido por isquemia en más de 3 veces con respecto a los ratones de control después de 30 minutos de isquemia y 1 hora de reperfusión y que después de IR todos los corazones de los ratones tratados con fenofibrato recuperaron tanto la fuerza contráctil como la frecuencia cardíaca [39].

1.10.10.- Fenofibrato

Fenofibrato pertenece al grupo de fibratos, o derivados del ácido fíbrico y está indicado en el tratamiento de pacientes con dislipidemia de diversos tipos. La hidrólisis en plasma de

fenofibrato proporciona la forma activa: el ácido clofíbrico, forma halogenada del ácido fenoxiisobutírico o ácido fíbrico; de ahí que se les denomine fibratos [40].

Hoy día se prescriben fibratos de segunda generación, con estructuras químicas más o menos relacionadas con el ácido fíbrico, como bezafibrato, ciprofibrato, fenofibrato y gemfibrozilo [40].

II.- JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS), las principales causas de mortalidad en el mundo son las enfermedades isquémicas del corazón, las cuales ocasionaron 15,2 millones de defunciones en 2016. En México, las principales causas de morbimortalidad no difieren de las del resto del mundo, pues de acuerdo al INEGI, en 2015, la primera causa de muerte fue la diabetes mellitus y en segundo lugar, las enfermedades isquémicas del corazón, por lo que constituyen un problema social y de salud pública a nivel mundial. Debido a la relevancia que han cobrado estas patologías durante las últimas décadas, es importante que las instituciones educativas, de salud y de investigación lleven a cabo estrategias para disminuir su morbimortalidad. Las destrezas a desarrollar deberán estar enfocadas hacia la prevención, a una mejor comprensión de la fisiopatología con el objetivo de administrar el mejor tratamiento y sin tantos efectos adversos, así como también un diagnóstico temprano; todo esto con el fin de mejorar la calidad de vida de las personas que las padecen.

Tanto las enfermedades isquémicas del corazón como la diabetes mellitus, generan ROS, produciendo el proceso denominado estrés oxidante, haciendo que los tejidos sufran daño y consiguientemente sean menos funcionales. Por lo tanto, al disminuir este mecanismo fisiopatológico se mejorará la funcionalidad del corazón.

Hoy en día se lleva a cabo el escrutinio de fármacos nuevos, usos terapéuticos novedosos de fármacos ya existentes o la combinación de fármacos, para tratar estos padecimientos. Dentro de estos fármacos se encuentran los agonistas de los receptores activadores de la proliferación peroxisomal alfa (PPAR- α) como fenofibrato. Por lo tanto, este estudio evaluó el efecto del fenofibrato sobre cultivos celulares de cardiomiocitos sometidos a alta glucosa e hipoxia-reperfusión para, de esta manera proponer nuevas herramientas farmacológicas para disminuir la incidencia y prevalencia de las enfermedades isquémicas del corazón y la disminución de las lesiones presentadas por el aumento de la glucosa.

III. HIPÓTESIS

La estimulación de los PPAR α por fenofibrato producirán un aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes lo cual modulará de manera efectiva el estrés oxidante generado en los cultivos de cardiomiocitos expuestos a alta glucosa e hipoxia-reperfusión, disminuyéndose de este modo el daño a macromoléculas importantes como lípidos y ADN. El fenofibrato producirá un aumento en la expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial durante los procesos de hipoxia-reperfusión y alta glucosa; además al modularse en forma más efectiva la presencia de especies reactivas de oxígeno se disminuirá la oxidación de BH₄. La modulación del estrés oxidante mejorará la ultraestructura de los cardiomiocitos sometido a hipoxia-reperfusión y alta glucosa.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los efectos del tratamiento con fenofibrato en cardiomiocitos sometidos a hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación de ambas condiciones sobre el estrés oxidante y el daño estructural.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

Objetivo particular I:

Establecer las condiciones óptimas para el cultivo de cardiomiocitos de rata sometidos *in vitro* a hipoxia-reperfusión y alta glucosa.

Objetivo particular II:

Determinar el efecto de fenofibrato sobre la viabilidad celular y la ultraestructura de los cardiomiocitos expuestos a hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación de ambas condiciones.

Objetivo particular III:

Estudiar si la estimulación por fenofibrato disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno y/o aumenta la participación de enzimas antioxidantes (SOD-Cu²⁺/Zn²⁺, SOD-Mn²⁺ y catalasa), en cultivos de cardiomiocitos sometidos a hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la unión de ambas condiciones.

Objetivo particular IV:

Determinar el efecto del fenofibrato sobre el daño a macromoléculas inducido por hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la unión de ambas condiciones.

Objetivo particular V:

Evaluar si el fenofibrato mejora el acople de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) en cardiomiocitos sometidos a hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación de ambas condiciones.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Material

Se obtuvo de BioRad lo siguiente: acrilamida, beta-mercaptoetanol, bis-acrilamida, glicina, leche descremada, glutaraldehído, marcador de peso molecular SDS-PAGE, SDS, TEMED, Tris base; de sigma se obtuvo: albúmina sérica bovnia, fenofibrato, EDTA, etanol absoluto, glicerol, HCl, K_2HPO_4 , $NaHCO_3$, tris-HCl, tritón X-100, tween20, tetraóxido de osmio, cacodilato, EPON 812, acetato de uranilo; de roche daignostics: complete (inhibidor proteasas); de merck: rojo de fenol, éter etílico; de técnica química: KCl; de calbiochem: metanol absoluto; de J.T.baker: Na_2HPO_4 , Na_3VO_4 , NaCl, NaF, manitol, hidróxido de sodio, persulfato de amonio; de delmed: solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%; de gibco: medio F-10 (1X), 0.25% tripsina (1X), anti-anti (100X) antibiótico-antimicótico, HI FBS suero fetal bovino, d- glucose USP (dextrosa); de biopack; ácido tricloroacético; de fischer scientific: azul de tripán, metanol.

6.2.- Métodos

6.2.1.- Animales

Para la realización de este trabajo, se emplearon ratas Wistar, tanto hembras como machos de 1 a 3 días de vida extrauterina, otorgados por el bioterio del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y por el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH). El protocolo se realizó siguiendo los lineamientos del comité institucional de ética, así como los de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio NOM-062-ZOO 1999.

6.2.2.- Cultivo de Miocitos

Para la realización de los cultivos de cardiomiocitos se necesitaron entre 30 a 35 ratas de 1 a 3 días de nacidas. Los animales se sumergieron en alcohol al 70%, se decapitaron con tijeras estériles y se realizó toracotomía comprimiendo el tórax y exponiendo el corazón para posteriormente extraerlo. Este se colocó en 5 ml de una solución estéril de PBS completo. Una vez obtenidos todos los corazones, se limpió la caja petri por fuera con alcohol y se llevó a la campana de flujo laminar. Cada pedazo de corazón se cortó en fracciones muy finas. Se lavaron los pedazos picados de 5 a 6 veces con PBS completo. El tejido lavado se pasó a un matraz erlenmeyer de 20 ml y se le adicionó 10 ml de tripsina, el tejido junto con la tripsina se removió durante 15 minutos con un agitador. Se tripsinizó de 3 a 5 veces. Las dos primeras tripsinizaciones se desecharon. Las siguientes tripsinizaciones se recolectaron en un tubo estéril y frío, que contiene 2 ml de PBS completo y 5 ml de medio de cultivo completo frío. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos; se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de medio completo; se dejó reposar durante 1 hora en la incubadora para posteriormente sembrar las células.

Los cultivos celulares se dividieron en los siguientes grupos experimentales: grupo 1: control (sham), grupo 2: control (sham) tratado con DMSO al 0.1%, grupo 3: control (sham) tratado con fenofibrato (10 μ M), grupo 4: control tratado con manitol (19.5 mM), grupo 5: alta glucosa (25 mM), grupo 6: alta glucosa (25 mM) tratado con DMSO al 0.1%, grupo 7: alta glucosa (25 mM) tratado con fenofibrato (10 μ M), grupo 8: hipoxia

reperfusión, grupo 9: hipoxia reperfusión tratado con DMSO al 1%, grupo 10: hipoxia reperfusión tratado con fenofibrato (10 μ M), grupo 11: alta glucosa e hipoxia reperfusión, grupo 12: alta glucosa e hipoxia reperfusión tratado con DMSO al 0.1%, grupo 13: alta glucosa e hipoxia reperfusión tratado con fenofibrato (10 μ M). El DMSO y el fenofibrato se administró 60 minutos antes de someter el cultivo a hipoxia reperfusión.

6.2.3.- Alta Glucosa

Al inicio los cardiomiocitos se cultivaron con medio con glucosa 5 mM. Cuando se tuvo una confluencia del 80%, el medio de cultivo se sustituyó por medio con alta glucosa (25 mM) y se dejaron 48 horas de exposición a los cardiomiocitos con esta concentración de glucosa, para posteriormente realizar los experimentos [41].

6.2.4.- Hipoxia-Reperfusión

La hipoxia en los cultivos de miocitos se produjo con la colocación de un coverslip durante 2 horas y se reperfundió por 1 hora (retirando el coverslip). La colocación de un cubreobjetos de plástico crea una barrera a la difusión de oxígeno produciendo inmediatamente hipoxia y subproductos metabólicos por lo que representa las condiciones óptimas de isquemia *in vivo*. Inmediatamente después de la generación de la hipoxia reperfusión se realizaron los experimentos respectivos [42].

6.2.5.- Viabilidad Celular

La viabilidad celular se calculó como el número de células viables dividido por el número total de células dentro de las cuadrículas de la cámara de Neubauer. Si las células tomaron el azul tripán, se consideraron inviables. Se agregó 0.1 mL de la solución stock de azul de tripán a 1 ml de células, se cargó la cámara de Neubauer y se examinó inmediatamente bajo un microscopio a un aumento de 10x. Se contó el número de células teñidas de azul y el número total de células. La viabilidad celular debe ser al menos del 95% para considerar un cultivo sano en fase-logarítmica. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la viabilidad celular (expresada como el porcentaje de células que están vivas): número total de células

vivas (blancas) ÷ número total de células vivas y muertas (tanto blancas como azules) × 100.

6.2.6.- Microscopía Electrónica

Para determinar la ultraestructura del cardiomiocito en los diferentes grupos experimentales se siguió el método descrito por González- Morán (43). Los miocitos se fijaron con 2.5% de glutaraldehído por 1 hora; posteriormente se guardaron en buffer de cacodrilato 0.1 M toda la noche. Después de esta post-fijación, la muestras se fijaron en tetraóxido de osmio 0.1 M en buffer de cacodilato. Las muestras se deshidrataron en un gradiente de etanol y se embebieron en EPON 812. Se obtuvieron secciones ultrafinas (aproximadamente de 60 nm de grosor) empleando un micrótomo Leica Ultracut y se montaron posteriormente en rejillas de cobre. Las secciones se contrastaron con acetato de uranilo y se evaluaron con un microscopio tipo JEM-1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) en 60kV. Las imágenes de los miocitos de cada grupo se tomaron al azar y se evaluaron empleando aumentos de 25,000 y 50, 000X [43].

6.2.7.- Malondialdehído (MDA)

El malondialdehído se determinó en una suspensión de miocitos por electroforesis capilar de zona. La muestra se desproteinizó con metanol frío en proporción 1:1; se centrifugó a 16'000xg durante 15 minutos y para filtrar se usaron filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA); se diluyó 1:10 con hidróxido de sodio 0.1 M frío y se analizó directamente. Para tal efecto, se utilizó el sistema P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter, al cual se le preconditionó el capilar haciendo pasar una solución 0.1 M de hidróxido de sodio durante 10 minutos; posteriormente agua destilada por espacio de 10 min y finalmente el amortiguador de corrida (boratos 10 mM + CTAB 0.5 mM a pH 9.0) durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi/10 s. La separación se realizó a -25 kV durante 4 min a 267 nm. El capilar se lavó entre corridas con NaOH 0.1 M durante 2 minutos, agua destilada por espacio de 2 min y amortiguador durante 4 minutos. La concentración de MDA se expresó en µM y se determinó mediante el empleo de una curva estándar [44].

6.2.8.- 8-Hidroxi-2-Deoxiguanosina (8-OH-2-dG)

La 8-OH-2-dG, se determinó por electroforesis capilar de zona y detección UV por arreglo de diodos. La muestra de suspensión de miocitos se desproteinizó con ácido tricloroacético al 20%, en proporción 10:1. Se centrifugó a 16'000xg durante 15 minutos y se filtró con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm ; se diluyó 1:10 con hidróxido de sodio 2 M y se analizó directamente con el sistema P/ACETM MDQ de Beckman Coulter. Este equipo se preconditionó el capilar haciendo pasar una solución 2 M de hidróxido de sodio durante 30 min, posteriormente agua desionizada por espacio de 30 min y finalmente el amortiguador de corrida (boratos 10 mM a pH 9.0) durante 30 min. La muestra se inyectó bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi/10 s. La separación se realizó a 20 kV durante 8 min a 200 nm. El capilar se lavó entre corridas con hidróxido de sodio 2 M durante 2 min y agua destilada por espacio de 2 min. Los resultados se expresaron en pmoles/ml. La concentración de la 8-OH-2dG se determinó mediante el empleo de una curva estándar [45].

6.2.9.- Expresión de eNOS, eNOS-p, SOD-Cu²⁺/Zn²⁺, SOD-Mn²⁺, Catalasa, NOX-4, p47^{phox}.

La separación de proteínas en las muestras se llevó a cabo mediante electroforesis para la cual se empleó el equipo de electroforesis Miniprotein II de BioRad. Se llevó a cabo la preparación del gel concentrador y de corrida con la composición que se muestra a continuación:

Gel de corrida poliacrilamida al 10% para eNOS, eNOS-p: 6250 μL de agua desionizada, 3750 μL de Tris-Cl/SDS pH 8.8, 5000 μL de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%, 50 μL de persulfato de amonio 10%, 10 μL de TEMED.

Gel de corrida poliacrilamida 12.5% para SOD-Cu²⁺/Zn²⁺, SOD- Mn²⁺: 5250 μL agua desionizada, 3750 μL de Tris-Cl/SDS pH 8.8, 6000 μL de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%, 50 μL de persulfato de amonio 10%, 10 μL de TEMED.

Gel concentrador 4%: 3005 μL de agua desionizada, 1250 μL de Tris-Cl/SDS pH 6.8, 650 μL de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%, 25 μL de persulfato de amonio 10%, 5 μL de TEMED.

En ambos casos las cantidades preparadas para llevar a cabo la electroforesis fueron suficientes para preparar 2 geles de 8x11 cm. Se preparó el gel de corrida, se llenó con éste la cámara de electroforesis hasta 1.5 cm antes del borde superior de las placas. Se completó el volumen de la cámara con SDS al 1%, y se niveló la cámara con un nivel de burbuja, de tal manera que se formó una interfase lo más homogénea y lineal posible. Se dejó polimerizar el gel de 30 a 40 minutos. Unos 5 minutos antes de que esté listo el gel, se inició la preparación del gel concentrador. Cuando el gel de corrida se polimerizó, se retiró el SDS (1%) y se enjuagó con agua desionizada, se secó con un papel filtro y cuidando de no tocar demasiado el gel con el papel. Se colocó rápidamente el gel concentrador hasta que se llenó hasta el borde de las placas de vidrio. Se insertó cuidadosamente el peine para formar los pozos. Se esperó de 10 a 15 minutos y se retiró el peine.

Se colocaron volúmenes apropiados de suspensión de miocitos de los distintos grupos en 50 μL de solución buffer de carga con concentración de proteína de 30-50 μg . Las proteínas se desnaturalizaron en un baño a 95°C por 1 minuto y se colocaron inmediatamente en hielo. Una vez cargadas las muestras en el gel, se corrió la electroforesis usando buffer de corrida de Tris-Glicina-SDS pH 8.3, el voltaje aplicado fue de 100 mV durante 2 horas. Se usaron marcadores de peso molecular conocidos que se corrieron conjuntamente para determinar los pesos aproximados de las proteínas separadas (prestained SDS-PAGE Standard, high range, BioRad). Una vez corrida la electroforesis, el gel se utilizó para llevar a cabo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (PVDF). Para este paso se empleó el sistema Trans-Blot SD Semydry Transfer Cell de BioRad.

Se prehumedeció la membrana de PVDF en metanol absoluto por 1 minuto aproximadamente y después en buffer de transferencia por otros 5 minutos. El gel también se mantuvo húmedo en buffer de transferencia. La transferencia se llevó a cabo aplicando corriente (110 mA) por una hora. Al finalizar la transferencia, la membrana se retiró con

cuidado y se dejó con solución bloqueadora de PBS-leche al 5% por 1 hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario según lo muestra la siguiente tabla:

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución</i>
<i>eNOS</i> (anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%
SOD Mn ²⁺ (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:50 en PBS-leche al 1%
SOD-Cu ²⁺ /Zn ²⁺ (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%
NOX-4 (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%
<i>p22phox</i> (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%

La incubación de la membrana con el anticuerpo primario se llevó a cabo por 12 horas a 4°C. Al término de la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (1%) por 15 minutos cada uno. Después, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:3000 en PBS-leche al 1% por 1 hora. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween (0.05%) por 15 minutos cada uno. El revelado se llevó a cabo usando quimioluminiscencia de acuerdo al protocolo del fabricante (Immobilon Western chemiluminescent HPR substrate, Millipore). La membrana se puso en contacto con película kodak MXB durante 1 minuto. Se reveló la película y se llevó a cabo la cuantificación de la proteína existente por densitometría, utilizando el sistema KODAK EDAS 120 system.

6.2.10.- HIF-1 α : Aislamiento de RNA y Cuantificación por PCR en Tiempo Real

Usando el reactivo de Trizol se aisló el RNA del equivalente a 3 pozos de cardiomiocitos (un millón de células por pocillo). La integridad del RNA fue comprobada por medio de un gel de agarosa al 1%. Primero se realizó una reacción con Transcriptasa reversa (RT) con 2.5. microgramos de RNA total en presencia de 200 U de transcriptasa reversa proveniente del virus murino Moloney (Invitrogen). La cantidad de mRNA de HIF-1 α fue cuantificado

por PCR en tiempo real en el ABI Prism 7300 Sequence Detection System (TaqMan, ABI, Foster City, CA) a través de la reacción con SyberGreen. Como control endógeno se usó GADPH y las secuencias de los cebadores para HIF-1 α que se usaron fueron las siguientes: Sentido ATACCAGCAGTAACCAGCCG, Antisentido CTGTGGCTGAGAGTCCTTCG. El método para calcular la cantidad de HIF-1 fue Δ CT (incremento del umbral del ciclo).

VII.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se obtuvieron del efecto fueron presentados como la media \pm error estándar. Se determinó si hay diferencias entre los grupos por medio de una prueba post hoc de Tukey una vez que el análisis de varianza (ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías si el caso lo requirió) reveló diferencias entre las poblaciones. La significancia estadística se aceptó cuando $P < 0.05$. Para la comparación entre dos grupos se utilizó un prueba de t de Student no pareada.

VIII.- RESULTADOS

8.1.- Evaluación de HIF1 α

Para determinar si el método empleado para producir hipoxia era efectivo determinamos la expresión del factor inducible de hipoxia (HIF1 α). Esta se realizó a través de qPCR y de Western Blot. HIF1 activa genes que codifican las proteínas que aumentan la disponibilidad del oxígeno y permiten la adaptación metabólica en ausencia de oxígeno, controlando la expresión de decenas de productos de los genes y proteínas. Nuestros resultados muestran que HIF1 α se encuentra aumentado significativamente en los cultivos sometidos a hipoxia-reperfusión comparado con el control (**Figura 5 y Figura 6**). Estos resultados sugieren que si se generó hipoxia en los cultivos de cardiomiocitos a través del coverslip.

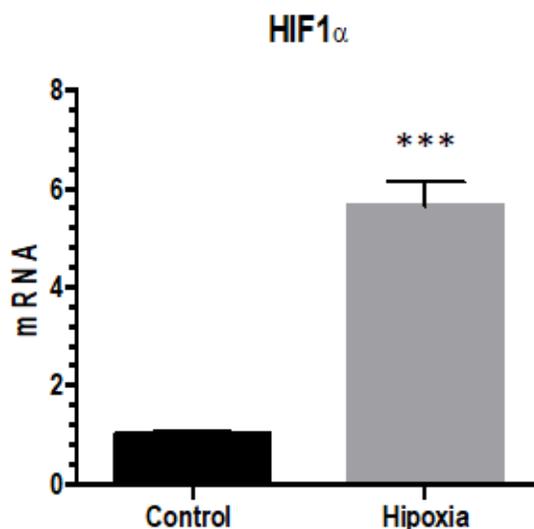


Figura 5: Cuantificación de HIF1 α en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia-reperfusión (HR). La cuantificación se realizó a través de qPCR; HIF1S Sentido: ATACCAGCAGTAACCAGCCG. HIF1A Antisentido: CTGTGGCTGAGAGTCCTTCG. t de Student no pareada, *** $p < 0.001$ control vs hipoxia.

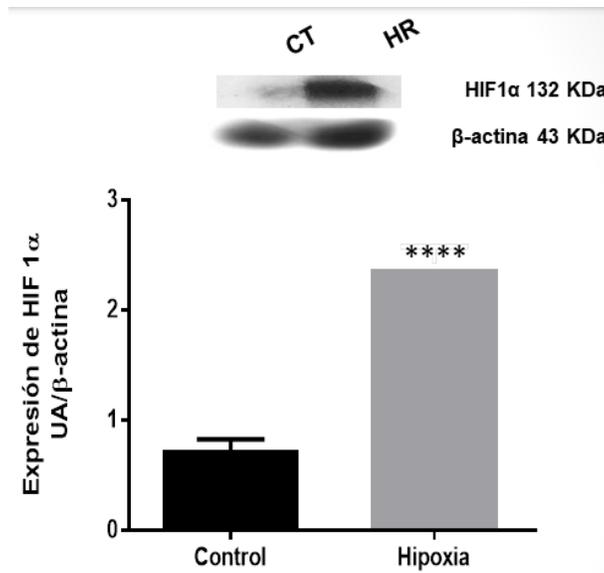


Figura 6: Expresión de HIF1α en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperusión (HR). La detección de los niveles de expresión se realizó a través de Western Blot. Los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 5 experimentos diferentes. *t* de Student no pareada **** $p < 0.0001$ control vs hipoxia reperusión.

8.2.- Evaluación de la Viabilidad Celular

El azul de tripán es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas. Este colorante es uno de los más empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación ya que no puede penetrar y teñir las células vivas con membranas integrales. De acuerdo a esto, nuestros resultados indican que: en nuestros grupos control, control DMSO (vehículo del fenofibrato), control fenofibrato y control manitol la viabilidad celular se mantuvo por arriba del 95% indicando que nuestros cultivos están en condiciones óptimas. Por otro lado en los cultivos expuestos a hipoxia reperusión, alta glucosa y la combinación, se observó una disminución significativa de la viabilidad celular comparada con los grupos controles, mientras que si se trata con fenofibrato atenúa la muerte celular significativamente en los grupos hipoxia-reperusión y alta glucosa más hipoxia reperusión. Además, observamos que el fenofibrato en el grupo alta glucosa no modifica la viabilidad celular (**Figura 7**). Se realizó un grupo adicional en el cual se administró el fenofibrato 4 horas antes de las 48 horas de exposición de alta glucosa y observamos que mantiene la viabilidad a niveles similares a los controles, esto indica que si el fenofibrato se administra antes de la alta glucosa protege a los

cardiomiocitos y cuando se administra posterior al insulto no se observa el efecto protector sobre la viabilidad celular. Cabe mencionar que se realizó un control manitol para determinar que el efecto deletéreo que observamos en los grupos alta glucosa es por el daño que ocasiona la glucosa per se y no por un proceso de hiperosmolaridad.

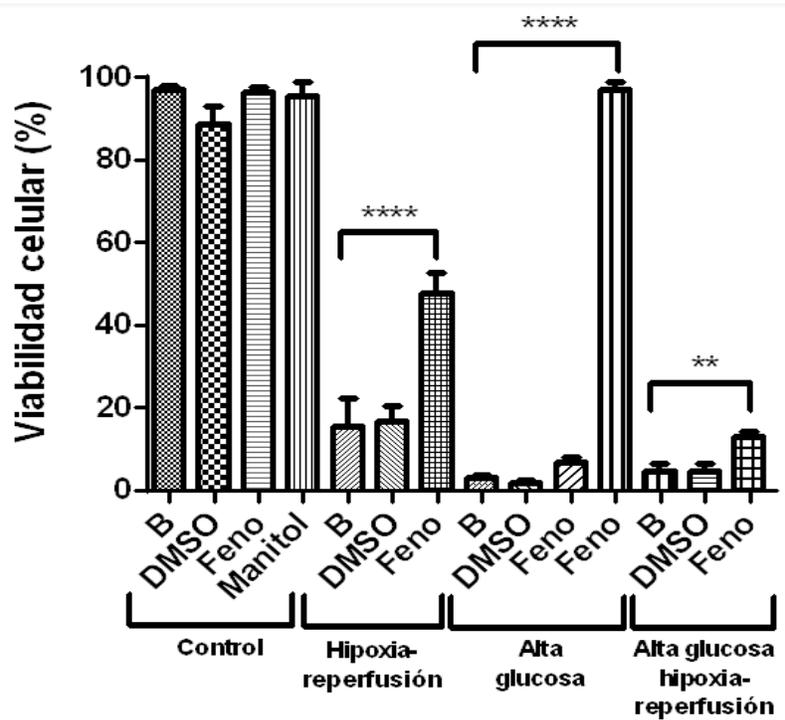


Figura 7: El fenofibrato ($10 \mu\text{M}$) atenúa la muerte celular en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La viabilidad se realizó con azul de tripán; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$.

Se llevó a cabo el bioensayo del MTT, el cual es un método colorimétrico cuantitativo que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El MTT es un compuesto que pertenece a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. Este se reduce por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color violeta e insoluble en agua (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. Los resultados que se obtuvieron con esta técnica son los siguientes: la función mitocondrial se mantiene en los grupos controles casi al 100%, mientras que en los grupos de hipoxia- reperusión, alta

glucosa y la combinación se ve disminuida comparada con los controles y cuando se trata con fenofibrato aumenta la función mitocondrial (**Figura 8**).

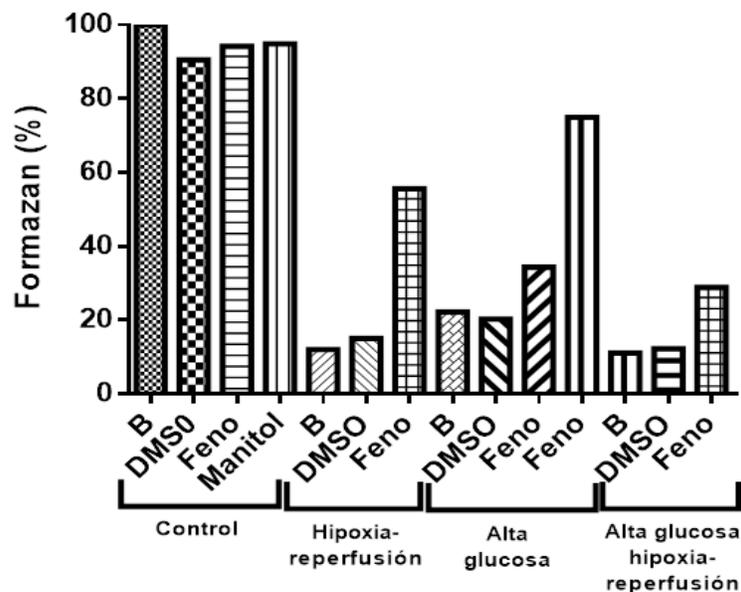


Figura 8: El fenofibrato (10 μ M) aumenta la funcionabilidad mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La funcionabilidad se realizó a través de MTT; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes.

8.3.- Evaluación de la Ultraestructura de los Cardiomiocitos

La ultraestructura de los cardiomiocitos fue evaluada en condiciones de hipoxia-reperfusión, alta glucosa y alta glucosa/ hipoxia-reperfusión con el objetivo de observar el efecto producido por la estimulación de los receptores activadores de la proliferación peroxisomal alfa sobre la ultraestructura del cardiomiocito. Se observó que en los grupos control y control/fenofibrato hay una distribución homogénea de las mitocondrias, se observaron las crestas mitocondriales, así como una continuidad en la membrana. Se pudo distinguir claramente el aparato de Golgi y el núcleo con una membrana íntegra.

Cuando se generó hipoxia-reperfusión las crestas mitocondriales se observaron tubulares y menos densas que las controles; además, de un vaciamiento de su contenido. Al examinar las membranas se observó una disrupción de estas. El núcleo se observó con condensación de la cromatina y ruptura en su membrana. Por otra parte, las células con hipoxia-

reperfusión tratadas con fenofibrato se observaron con una mejora en su ultraestructura, las mitocondrias se observaron densas aunque ligeramente reducido su tamaño y alargadas; hubo integridad en su membrana interna y externa. Estas características nos indican que la mitocondria se encuentra funcional. Asimismo se pudo observar el núcleo con una menor condensación de la cromatina y no hay disrupción de la membrana nuclear. Los resultados anteriores indican que el fenofibrato mejoró la ultraestructura de los cardiomiocitos expuestos a hipoxia-reperfusión.

La exposición a alta glucosa produce que las mitocondrias sufran un proceso de vacuolización, estas son más pequeñas y se encuentran hinchadas, la membrana plasmática se observó fragmentada. En las células con alta glucosa y fenofibrato se observó que las mitocondrias tienen un tamaño normal y se observaron densas, indicando que la mitocondria se encuentra funcional. Cuando se observan los cardiomiocitos con alta glucosa/ hipoxia-reperfusión no se observó el núcleo, y las mitocondrias se encuentran lisadas y pequeñas. Por lo tanto, el alta glucosa/ hipoxia-reperfusión dañó más la ultraestructura de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos expuestos a alta glucosa/hipoxia-reperfusión y tratados con fenofibrato se observaron con mitocondrias pequeñas pero densas, sin disrupción de su membrana. Además, se pudo observar también el núcleo con un poco de condensación de la cromatina, su membrana se observa sin rupturas. Estos resultados indican que el fenofibrato protegió al cardiomiocito sometido a alta glucosa e hipoxia-reperfusión en su ultraestructura.

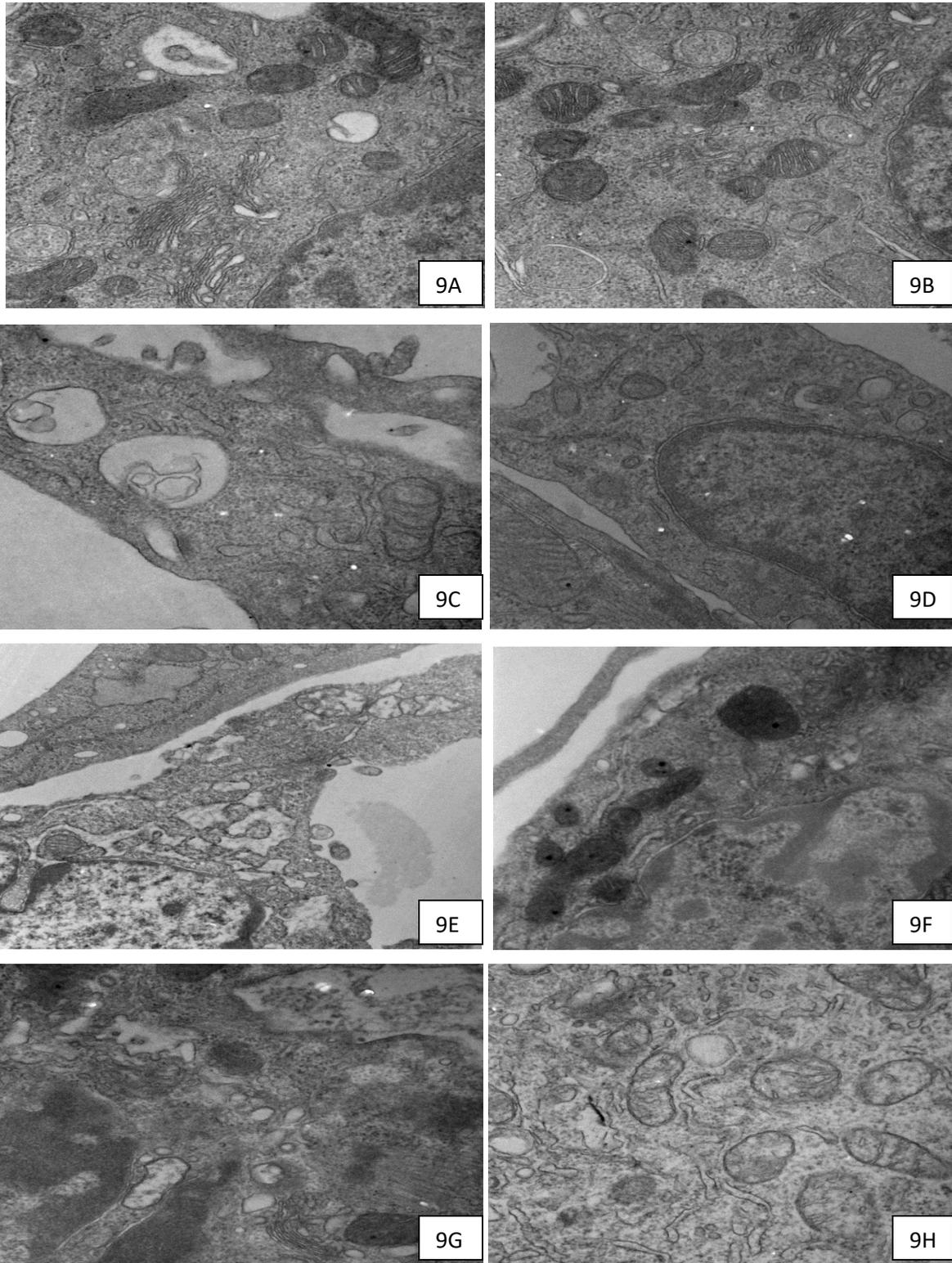


Figura 9: El fenofibrato (10 μ M) atenúa el daño a la ultraestructura en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusión (HR) y/o alta glucosa (AG). Detalles de la ultraestructura por microscopía electrónica: 500 nm, 50,000x. 9A: control, 9B: control fenofibrato, 9C: alta glucosa, 9D: alta glucosa fenofibrato, 9E: hipoxia- reperfusión, 9F: hipoxia- reperfusión fenofibrato, 9G: alta glucosa más hipoxia- reperfusión, 9H: alta glucosa más hipoxia- reperfusión y fenofibrato. Las imágenes son representativas de 6 experimentos por grupo.

8.4.- Evaluación del Efecto Antioxidante

Un antioxidante es una sustancia (ya sea endógena o exógena al organismo) o enzima (endógena) que en concentraciones normales posee una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre (RL). El antioxidante al colisionar con él, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico. Por lo tanto, los antioxidantes están presentes, retardan e inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las EROs. Para explorar el papel de la estimulación de los PPAR α en la defensa antioxidante, se midió la expresión de las enzimas SOD-Cu²⁺/Zn²⁺, SOD-Mn²⁺ y catalasa en hipoxia-reperfusión (HR), alta glucosa (AG) y alta glucosa/hipoxia-reperfusión (AG/HR). Los resultados obtenidos muestran que la SOD Cu²⁺/Zn²⁺ y la SOD-Mn²⁺ disminuyeron su expresión en HR, AG y AG/HR. De manera interesante, el tratamiento con el fármaco aumentó significativamente la expresión de estas enzimas (**Figura 10**).

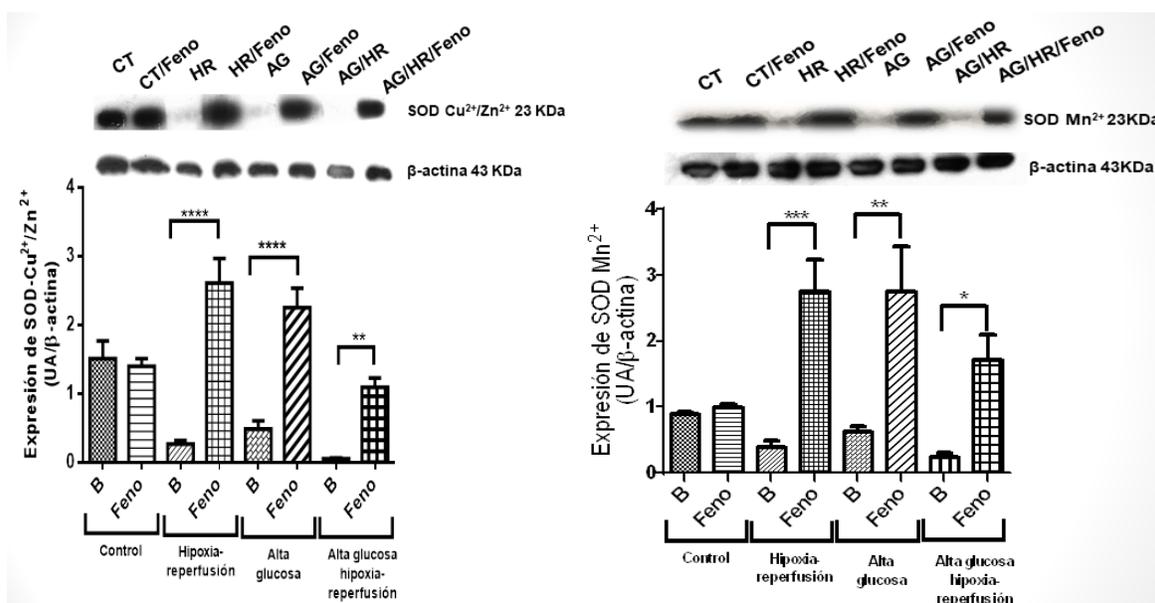


Figura 10: El fenofibrato (10 μ M) aumentó la defensa antioxidante en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia-reperfusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La detección de los niveles de expresión de las enzimas se realizó por Western Blot; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

De manera similar, la expresión de la catalasa disminuyó su expresión. Estos resultados sugieren que la activación de PPAR α inducida por el fenofibrato disminuyó el estrés oxidante por el aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes (**Figura 11**).

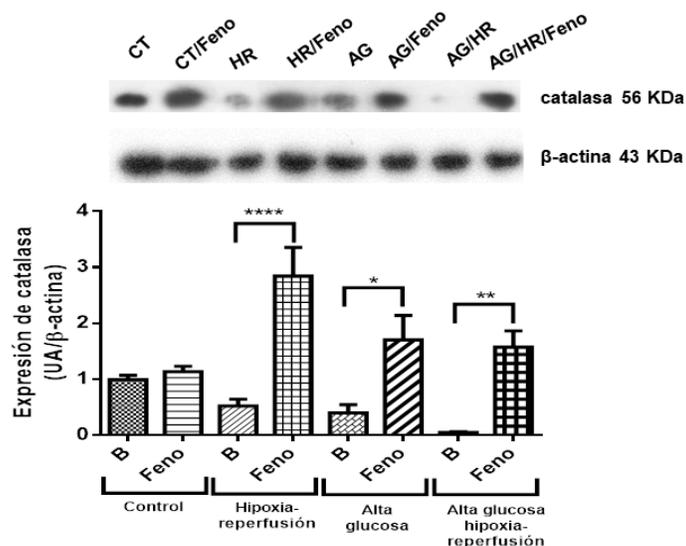


Figura 11: El fenofibrato (10 μ M) aumentó la defensa antioxidante en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La detección de los niveles de expresión de la enzima se realizó por Western Blot; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Con el propósito de investigar con mayor profundidad el mecanismo antioxidante del fenofibrato, se determinó el efecto del fenofibrato sobre la expresión del factor relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Este es un factor de transcripción que se activa en respuesta a cambios en el estado redox celular. La activación y localización nuclear de Nrf2 induce la expresión de genes de respuesta antioxidante, entre ellos, los genes de las enzimas SOD, CAT y GPx, que se encargan de eliminar a las EROs; debido a ello se evaluó la expresión de Nrf2. Nuestros resultados indican que en AG, HR y AG/HR disminuyó la expresión de Nrf2, mientras que con el tratamiento de fenofibrato aumentó significativamente su expresión; por lo tanto se puede sugerir que por esta vía el fenofibrato actúa proporcionando a los cardiomiocitos un ambiente antioxidante (**Figura 12**).

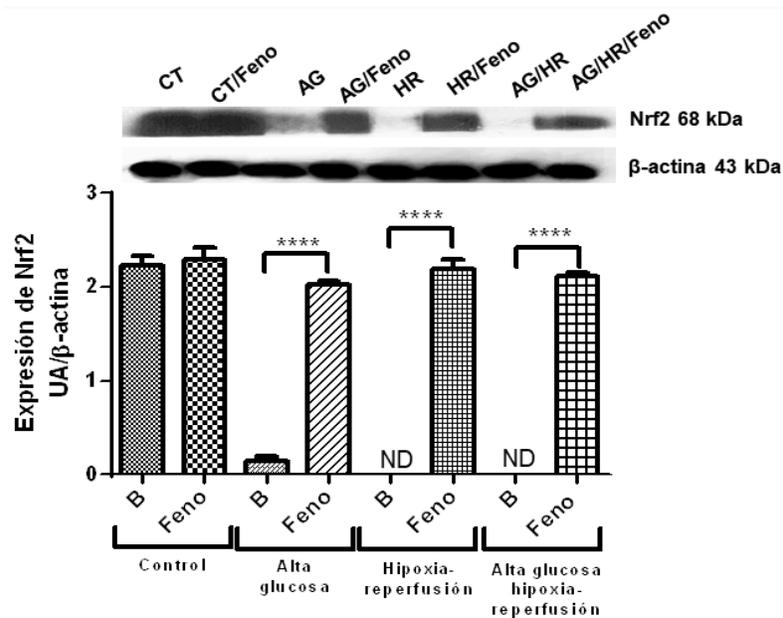


Figura 12: El fenofibrato ($10 \mu\text{M}$) aumentó la expresión de Nrf2 en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusion (HR) y/o alta glucosa (AG). La detección de los niveles de expresión de Nrf2 se realizó por Western Blot; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 5 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey.

Para determinar si la activación de los PPAR α por fenofibrato estaba relacionada con la disminución del estrés oxidante durante procesos como HR, AG y la combinación de estos, se evaluó la capacidad antioxidante total (CAT). Así, se observó que los cultivos control tuvieron valores de 0.2228 ± 0.06462 pmol/ mg de proteína, mientras que los cultivos con AG, HR y AG/HR disminuyen la capacidad antioxidante con relación a el control a 0.0573 ± 0.01033 , 0.0422 ± 0.01313 y 0.0374 ± 0.004396 pmol/ mg de proteína, respectivamente; aunque esta no es significativa. De manera interesante, el tratamiento con fenofibrato aumentó significativamente la capacidad antioxidante en los cultivos AG, HR y AG/HR a valores de 0.2812 ± 0.09333 , 0.2965 ± 0.05878 y 0.1968 ± 0.0261 pmol/ mg de proteína, respectivamente (**Figura 13**).

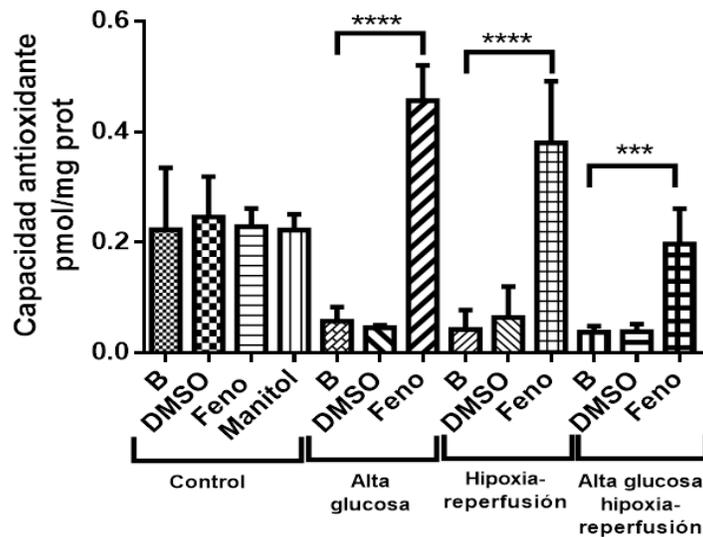


Figura 13: El fenofibrato (10 μ M) sobre la capacidad antioxidante total en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusion (HR) y/o alta glucosa (AG). La concentración de la capacidad antioxidante total, se midió por espectrofotometría visible a 572 nm (pmol/mg proteína); los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$.

8.5.- Evaluación de la Expresión de las Subunidades de la Enzima NADPH oxidasa

Cuando se induce la activación del sistema NADPH oxidasa por diferentes estímulos, inicia la producción de EROs. Este mecanismo comienza con la migración de las proteínas citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}) hacia la membrana citoplasmática. Durante esta activación, p47^{phox} es fosforilada mediante la acción de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y la proteína quinasa C (PKC). La p47^{phox} interactúa con los demás componentes citosólicos del sistema oxidasa. Por otro lado NOX4, es la isoforma expresada más abundantemente, se encuentra no solo en la membrana plasmática sino también en las membranas del retículo endoplásmico, el núcleo y posiblemente en las mitocondrias, lo que la convierte en una fuente potencial de EROs mitocondriales, por lo que en este estudio se llevó a cabo la determinación de la expresión de estas subunidades de la enzima y observamos que tanto p47^{phox} como NOX4 aumentaron su expresión en los grupos HR, AG y AG/HR, mientras que con fenofibrato su expresión disminuyó (**Figura 14**). Con estos resultados se puede

sugerir que la activación de PPAR α por fenofibrato disminuyó la expresión de la subunidad p47^{phox} y NOX4 haciendo que no se active una fuente importante de EROs.

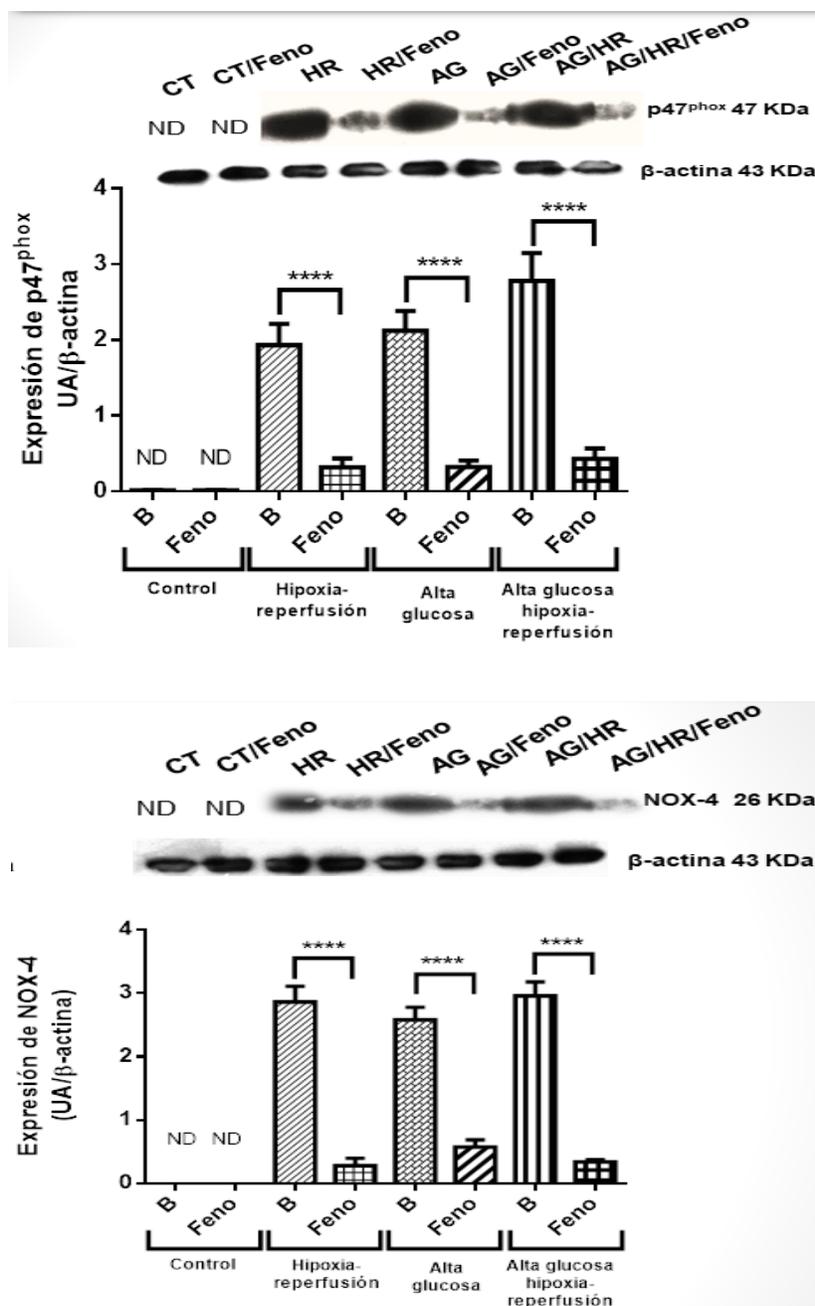


Figura 14: El fenofibrato (10 μ M) disminuyó la expresión de NADPH oxidasa en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfundición (HR) y/o alta glucosa (AG). La detección de los niveles de expresión de las subunidades se realizó por Western Blot; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$.

8.6.- Evaluación de Indicadores de Estrés Oxidante

Los ácidos grasos poli-insaturados que predominantemente se ubican en las membranas celulares son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres. El malondialdehído (MDA) es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo es generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados. Nuestros resultados indican que el MDA se encontró elevado en los grupos AG, HR y AG/HR con los siguientes valores: 0.3063 ± 0.03045 , 0.2194 ± 0.02836 y 0.4639 ± 0.1075 pmol/mg de proteína, respectivamente, comparado con el control (0.08123 ± 0.006852 pmol/mg de proteína). Además, el MDA disminuyó significativamente en los grupos AG, HR y AG/HR tratados con fenofibrato a 0.05668 ± 0.006422 , 0.01543 ± 0.002980 y 0.03640 ± 0.004012 pmol/mg de proteína, respectivamente (**Figura 15**).

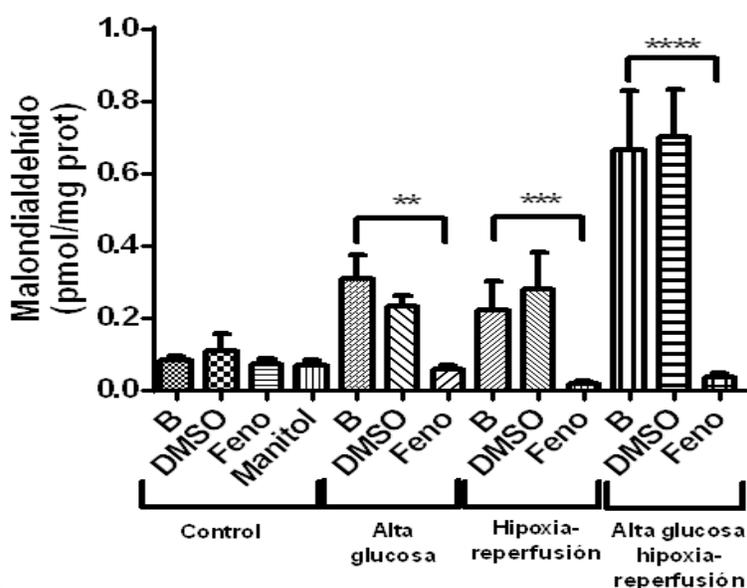


Figura 15: Efecto producido por fenofibrato ($10 \mu\text{M}$) sobre el malondialdehído en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfundición (HR) y/o alta glucosa (AG). La concentración de MDA, se midió por HPLC (pmol/mg proteína) y los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Las EROs generan daño a nivel del ADN. Cuando el ataque oxidante es a nivel de las bases púricas, una de las modificaciones más frecuentes ocurren por la adición del radical hidroxilo a la posición C8 del anillo de la guanina, produciendo un radical que puede ser oxidado a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG). Por lo tanto, la concentración de 8-OH-dG se considera un marcador por excelencia del daño oxidativo causado por los RL sobre el ADN. Nuestros resultados indican que en el grupo control se encuentran valores de 0.2478 ± 0.01009 pmol/mg de proteína. Asimismo, en los grupos AG, HR y AG/HR se encuentran aumentados a 0.8785 ± 0.1320 , 0.8493 ± 0.1310 y 1.0941 ± 0.1253 pmol/mg de proteína, respectivamente. De manera interesante, el tratamiento con el activador de PPAR α disminuyó significativamente los valores de este marcador de daño al ADN a 0.02780 ± 0.003183 , 0.05810 ± 0.008038 y 0.05341 ± 0.007092 pmol/mg de proteína (**Figura 16**).

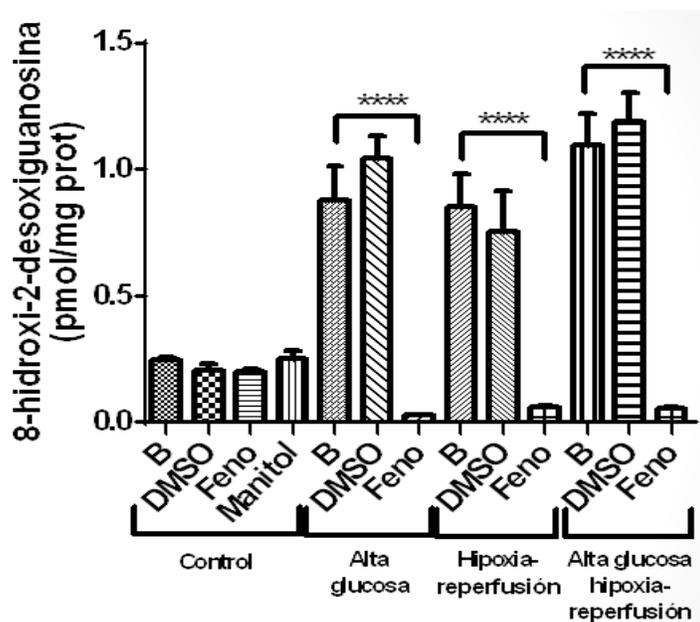
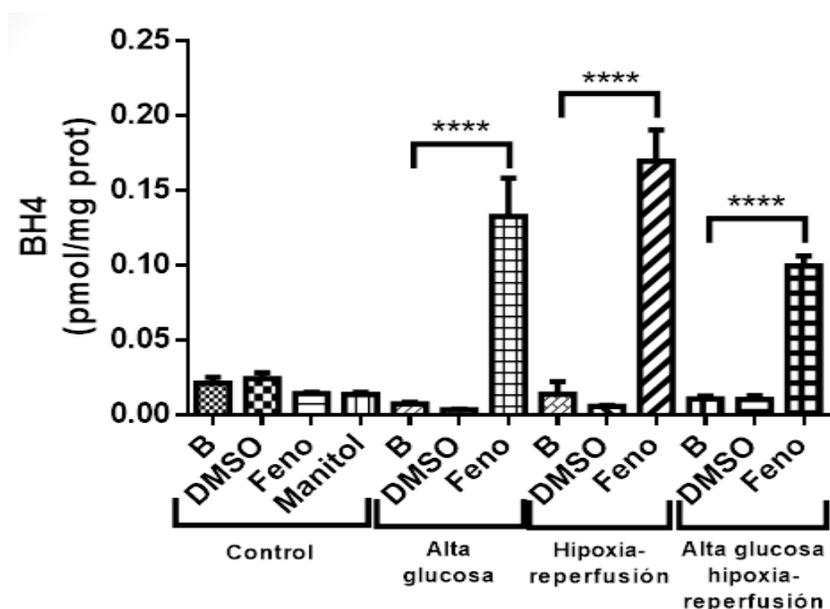


Figura 16: Efecto producido por fenofibrato (10 μ M) sobre 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia-reperfusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La concentración de 8-OH-dG, se midió por electroforesis capilar (pmol/mg proteína) y los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$.

La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) utiliza para la síntesis de NO, cofactores como tetrahidrobiopterina (BH4). Sin embargo cuando este cofactor se encuentra deficiente o cuando las EROs lo oxidan se genera dihidrobiopterina (BH2), esto da por resultado el desacople de la eNOS produciendo anión superóxido en lugar de NO. El estrés oxidante está aumentado en los procesos de alta glucosa, hipoxia reperusión y alta glucosa/ hipoxia reperusión por lo que se produce la oxidación de BH4 a BH2. Por lo tanto, se determinó la concentración de BH4 y BH2 por electroforesis capilar. Los resultados muestran que los niveles de BH4 se encuentran disminuidos en los grupos AG, HR y AG/HR (0.007532 ± 0.001095 , 0.01403 ± 0.008354 , 0.01094 ± 0.001827). Además, el tratamiento con fenofibrato previno la oxidación de BH4 por lo que aumentó de manera significativa la concentración de BH4. Por otro lado, los niveles de BH2 aumentaron en los grupos AG, HR, AG/HR (0.2543 ± 0.01131 , 0.1888 ± 0.03156 , 1.137 ± 0.09304), mientras que el tratamiento con fenofibrato mantuvo este parámetro en niveles similares al grupo control (**Figura 17**). Estos resultados sugieren un mejor acople de la eNOS debido a la disminución de la oxidación de BH4 en los procesos en que está involucrado el estrés oxidante.



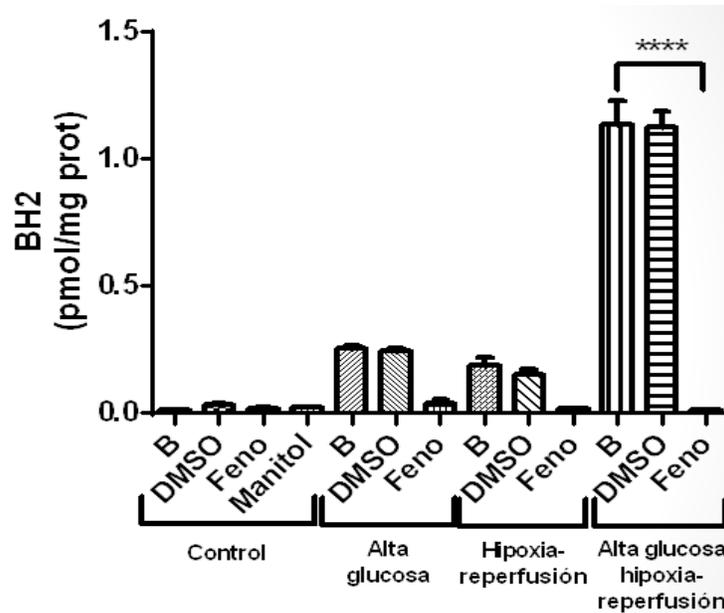


Figura 17: El fenofibrato (10 μM) evitó el desacople de la NOS al impedir la oxidación de BH4 en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia-reperfusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La concentración de BH4 y BH2 se midió por electroforesis capilar (pmol/mg proteína) y los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$.

8.7.- Evaluación de la Expresión de eNOS y eNOS Ser¹¹⁷⁷

Nuestros resultados sugieren que la HR, AG y la combinación de ambas inducen un decremento en la expresión de la eNOS así como su fosforilación debido a la oxidación de BH4. Sin embargo la administración de fenofibrato evita este efecto. Para investigar si la estimulación de los PPAR α por fenofibrato ejerce un efecto a nivel post-transcripcional sobre eNOS evaluamos la expresión de eNOS Ser¹¹⁷⁷ en los cardiomiocitos sometidos a los diferentes eventos. Observamos que el tratamiento con fenofibrato aumentó de manera significativa la expresión en los grupos tratados con este (**Figura 18**). Estos datos sugieren que el fenofibrato pudo aumentar el potencial de producción de óxido nítrico vía la fosforilación de eNOS en la SER1177.

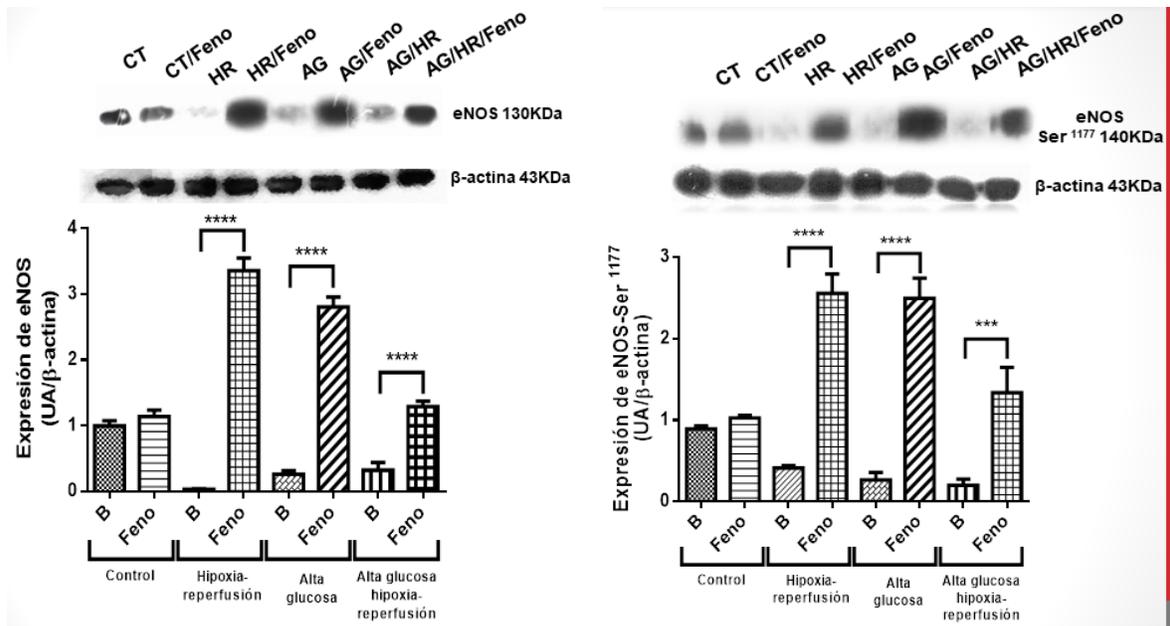


Figura 18: El fenofibrato ($10 \mu\text{M}$) aumenta la expresión de eNOS y eNOS Ser¹¹⁷⁷ en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La detección de los niveles de expresión de eNOS y eNOS Ser¹¹⁷⁷ se realizó por Western Blot; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, *post hoc* de Tukey. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$.

8.8.- Evaluación de la Expresión de PPAR α

Los receptores PPAR α desempeñan un papel fundamental en la regulación de la recaptura, activación y la β oxidación de los ácidos grasos. La inducción de los PPAR α también ejerce una actividad antiinflamatoria, antioxidante entre otras. Nuestros resultados indican que el tratamiento con fenofibrato aumentó significativamente la expresión de los PPAR α en los grupos a los que se les administró el fármaco (**Figura 19**). Esto sugiere de manera indirecta que el fenofibrato interactuó con su receptor y que los cambios que observamos en los resultados anteriormente presentados es derivado de esta interacción.

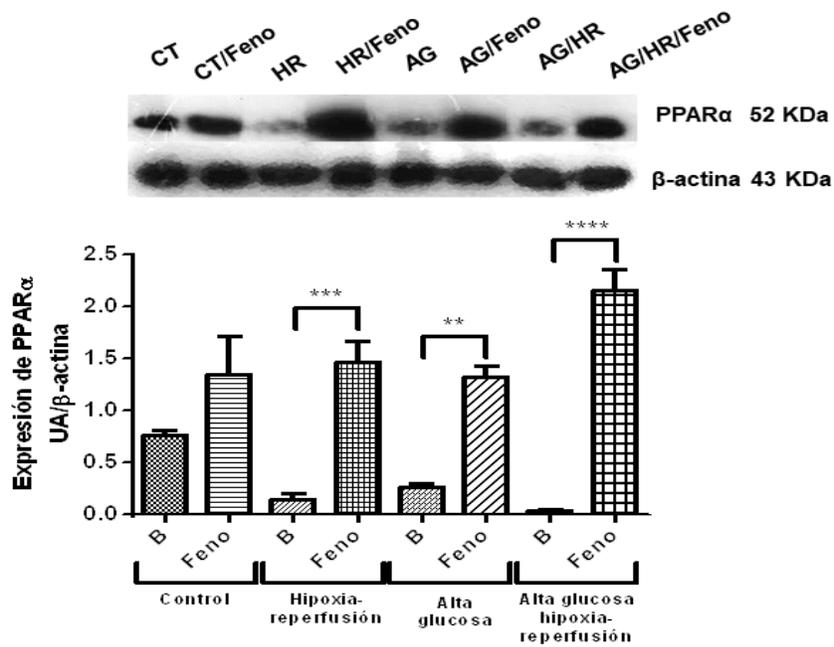


Figura 19: El fenofibrato ($10 \mu\text{M}$) aumenta la expresión de PPAR α en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperusión (HR) y/o alta glucosa (AG). La detección de los niveles de expresión de los PPAR α se realizó por Western Blot; los valores representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

IX.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo demostramos que, la estimulación de PPAR α por fenofibrato (10 μ M) *in vitro* favorece un ambiente antioxidante estimulando la expresión de enzimas antioxidantes disminuyendo el estrés oxidante generado por la hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación de estas condiciones experimentales. Esto en conjunto contribuye a la atenuación del daño ocasionado en la ultraestructura del cardiomiocito y sobre la viabilidad celular.

El término hipoxia-reperfusión es una condición que se presenta cuando la demanda de oxígeno en el cardiomiocito supera el aporte y es insuficiente para mantener la oxidación celular, la perfusión es el restablecimiento de las concentraciones de oxígeno. En nuestro estudio para determinar que efectivamente la técnica empleada producía hipoxia en los cultivos celulares, se empleó la determinación de HIF (Factor Inducible por Hipoxia) por medio de la técnica de la PCR tiempo real y la expresión proteica de este factor. HIF es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del oxígeno. Nuestros resultados indican que el método empleado para producir hipoxia en nuestro estudio (empleo de coverslip sobre los cultivos) aumentaba significativamente su expresión en los cultivos celulares sometidos a hipoxia (Figura 5 y 6). El resultado obtenido coincide con lo reportado por Jia y cols. (2017), [46] en donde en un modelo de rata con isquemia perfusión intestinal, (isquemia realizada por oclusión durante 1 hora de la arteria mesentérica superior a través de laparotomía y perfusión por 2 horas) se evaluó la expresión de HIF1 α y se encontró que estaba aumentada en aquellas ratas con isquemia perfusión intestinal comparadas con las control.

Dentro de las alteraciones que ocurren durante la hipoxia-reperfusión hay una súbita reintroducción de oxígeno a la célula por lo que se facilita la formación de radicales libres y con ello se produce daño a los cardiomiocitos [29]. Wang y cols. [23] realizaron hipoxia perfusión en células H9c2 (cardiomiocitos) agregando 500 μ mol/L de H₂O₂ en DMEM con suero fetal bovino (FBS) al 2% durante 18 horas y observaron que la producción de las especies reactivas de oxígeno se encontraban aumentadas en estos cultivos celulares. En

este mismo estudio se evaluó la expresión de la enzima superóxido dismutasa manganeso (SOD Mn^{2+}) y se observó que esta se encontraba disminuida resultando en un daño oxidativo para el cardiomiocito. La presente investigación demostró esta condición ya que al exponer a los cultivos de cardiomiocitos a hipoxia- reperusión la expresión de las enzimas antioxidantes (SOD- Cu^{2+}/Zn^{2+} , SOD- Mn^{2+} y catalasa) se encontraban disminuidas de manera significativa así como la capacidad antioxidante (Figuras 10, 11 y 13). El tratamiento con fenofibrato aumento de manera significativa la expresión de enzimas antioxidantes así como, la capacidad antioxidante. Estos resultados de protección por el fenofibrato son semejantes a los obtenidos por Liu y *cols.*[47], los cuales al estudiar la retinopatía diabética en un modelo de diabetes tipo 1 en ratones C57BL/6J-2Ins^{akita} observaron que existía una sobrerregulación de la enzima productora de radical superóxido NADPH oxidasa, así como también una disminución en la expresión de las enzimas antioxidantes SOD Cu^{2+}/Zn^{2+} , todas estas acciones se ven revertidas por acción del fenofibrato en estos.

Las alteraciones que inexorablemente traen consigo las concentraciones elevadas de glucosa son el incremento del estrés oxidativo por diversos mecanismos, entre los cuales se encuentran: la autooxidación de la glucosa, la glicación de proteínas, la activación de la vía de los polioles y la disminución de las defensas antioxidantes [10]. Zhou y *cols.* [24], realizaron cultivos de cardiomiocitos de ratas Sprague-Dawley, y determinaron la medición de EROs el grupo expuesto a alta glucosa (30 mmol/L). Sus resultados indican que la generación de EROs fue mayor en el grupo al que se administró alta glucosa. En este mismo estudio se evaluó el daño a macromoléculas importantes en las células como los lípidos mediante la medición de MDA y la expresión de enzimas antioxidantes. Sus resultados indican que el daño a proteínas se encontraba aumentado mientras que la defensa antioxidante dada por la expresión de las enzimas antioxidantes se encontraba disminuida (Figuras 10 y 11). Los resultados que obtuvimos en nuestra investigación son semejantes a los obtenidos por Zhou y *cols.*, [24], en donde, al someter a los cardiomiocitos a alta glucosa disminuyen la capacidad antioxidante y la expresión de SOD Cu^{2+}/Zn^{2+} , SOD Mn^{2+} y catalasa, también se aumentó el daño a macromoléculas importantes como lípidos y ADN. Sin embargo el tratamiento con el fármaco recupera el estado oxidante de la célula y

observamos una disminución en el daño macromoléculas celulares importantes (lípidos y ADN) y enzimas celulares importantes como la eNOS, la cual en nuestra investigación aumenta su expresión. (Figuras 15, 16, 17 y 18).

El Nrf2 es un factor de transcripción que se activa en respuesta a cambios en el estado redox celular [22]. Estudios han demostrado que Nrf2 juega un papel fundamental en la protección contra el daño ocasionado por la hipoxia-reperfusión y alta glucosa [48]. Xiaoqing y cols. [48] reportaron el efecto protector de Nrf2 sobre el daño oxidativo *in vitro* (en cardiomiocitos). Ellos realizaron cultivos de cardiomiocitos de ratones Knockout (KO) del gen Nrf2 y de ratones Wilde Type (WT) y los trataron con altos niveles de glucosa (40 mM). Los cultivos de cardiomiocitos KO del gen de Nrf2 exhibieron un nivel notablemente elevado de EROs incluso en ausencia de alta glucosa comparado con los cultivos de cardiomiocitos WT. De igual forma Nrf2 juega un papel en la protección cardiaca contra la hipoxia-reperfusión. Xu. y cols. [49] demostraron que ratones knockout de Nrf2 incrementaron el tamaño del infarto posterior a la isquemia reperfusion realizada. Además, un estudio reciente [50] demostró que el fenofibrato atenúa el estrés oxidante en retinopatía diabética por activación de Nrf2 y se reportó en este que el fenofibrato activaba Nrf2 al inducir la degradación de Keap-1 a través de una forma dependiente de la autofagia. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran semejanza a los estudios anteriormente mencionados, ya que con la activación de PPAR α aumenta la expresión de Nrf2 (Figura 12) en los diferentes insultos realizados a los cardiomiocitos, favoreciendo un estado antioxidante en nuestras condiciones experimentales planteadas.

Existen estudios [29] [51] que indican que en la hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación de estos procesos se produce un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y que la principal fuente de éstas es la activación de la NADPH oxidasa. De acuerdo a nuestros resultados se sugiere que la estimulación de los PPAR α , por fenofibrato, disminuye la expresión de subunidades tanto citosólicas como membranales de la enzima con lo que se impide que se acople la enzima y forme el radical superóxido. Este resultado es semejante a lo observado en el estudio llevado a cabo en corazón integro sometido a isquemia en donde estas subunidades por acción del clofibrato disminuyen su expresión significativamente [52].

Para la síntesis de NO, la eNOS requiere del cofactor sensible a la oxidación: BH₄. Estudios previos [52] muestran que, la disminución en la concentración de BH₄ no solamente evita la formación de NO por parte de la eNOS, sino que también aumenta la formación de anión superóxido convirtiéndose en una fuente potencial de este radical. Debido a la importancia que tiene este cofactor en el buen funcionamiento de la eNOS, evaluamos el efecto de la estimulación de los PPAR α con fenofibrato sobre la concentración de BH₄, y observamos que en los cultivos de cardiomiocitos expuestos a hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación disminuyó la concentración de BH₄, la disminución de este cofactor se acompañó del aumento de la concentración de BH₂ (Figura 17), la cual es el producto de oxidación de la BH₄. Con estos resultados sugerimos que BH₄ está siendo oxidada durante los insultos favoreciéndose un ambiente oxidante en los cardiomiocitos, estos resultados son consistentes con lo observado por Ibarra y *cols.* en 2012 [52] quienes estudiaron el corazones de rata y observaron que en estos disminuye BH₄ posterior a dos horas de isquemia. Sin embargo en periodos de isquemia de más de 45 minutos se produce pérdida de >90% de BH₄. En nuestro estudio el tratamiento con fenofibrato (10 μ M) aumentó la concentración de BH₄ y disminuyó la de BH₂. Estos hallazgos coinciden con lo demostrado por otros grupos que demostraron que estos parámetros aumentan durante la isquemia miocárdica [53]. La estimulación de los PPAR α por fenofibrato disminuye la actividad de otra posible vía productora de especies reactivas de oxígeno, favoreciéndose un ambiente antioxidante que evita la degradación de BH₄ y por lo tanto favorece el acople de eNOS.

Para determinar el efecto de la estimulación de los PPAR α sobre la expresión de eNOS y su activación al ser fosforilada en la SER1177, evaluamos su expresión proteica. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que en el proceso de hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación de estas condiciones efectivamente disminuye la expresión de eNOS y su fosforilación (Figura 18). Reportes previos [54] demostraron que la hipoxia activa proteasas celulares, por lo que entonces este evento puede deberse a la degradación de la proteína eNOS. El tratamiento con fenofibrato aumenta significativamente la expresión de esta enzima y su fosforilación, estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio llevado a cabo por Goya y *cols.* [55] en donde

demonstraron que, el pretratamiento con WY14309 (activador de los PPAR α) en células endoteliales aórticas bovinas, aumenta la expresión de eNOS. Nuestros resultados podrían explicarse debido a un mejor acople de la eNOS, ya que los niveles de BH4 se encuentran aumentados y se puede deducir que hay un menor estrés oxidante por el aumento en la expresión de enzimas antioxidantes.

La viabilidad celular se evaluó mediante la exclusión del colorante de azul de tripán, la cual es la técnica que más se utiliza para tal efecto. Estudios han demostrado que la hipoxia-reperfusión genera muerte celular. Zhang & Yu (2017) [56], sometieron a un proceso de hipoxia-reperfusión células H9c2 (cardiomiocitos). La hipoxia-reperfusión la generaron mediante una solución hipóxica e isquémica la cual, consistió en que el medio de cultivo no contenía glucosa ni suero fetal bovino. Además, las incubaron con aire mixto: 1% de O₂, 94% de N₂, 5% de CO₂ durante al menos 2 h para producir una solución anóxica saturada de aire; Luego, las células se incubaron en una incubadora a 37°C durante 10 h. La solución hipóxica e isquémica fue retirada. Luego, las células se suplementaron con suero bovino fetal al 10% (FBS) y se cultivaron en una incubadora (95% de aire y 5% de CO₂) a 37 ° C durante 2 h (reperfusión). Posteriormente evaluaron la viabilidad celular con anexina V a través de citometría de flujo, en donde se observó que la viabilidad de las células H9c2 con hipoxia-reperfusión se encontraba disminuida de manera significativa comparada con el control. Por otro lado, Zhang y cols. (2019) [57], expusieron a células H9c2 a un proceso de alta glucosa (55 mmol/L) durante 24 hrs y evaluaron la viabilidad mediante la técnica MTT en donde se observó que estaba disminuida de manera significativa comparada con las células control. Nuestros resultados muestran semejanza a los estudios mencionados previamente; en los grupos controles que fueron: control, control DMSO, control fenofibrato y control manitol (el cual se realizó para descartar que el efecto dañino que observamos por el alta glucosa es ocasionado por la glucosa per se y no por un efecto de hiperosmolaridad) la viabilidad se encuentra casi al 100%, lo que nos indica que los cultivos se encuentran en buenas condiciones. Por otro lado, los cultivos con hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación disminuye de manera significativa el porcentaje de viabilidad celular comparado con el control. De manera interesante, el fenofibrato disminuyó la muerte celular en los cultivos con alta glucosa y la combinación alta glucosa

hipoxia-reperfusión de manera significativa; pero en los grupos con exposición alta glucosa durante 48 horas y la administración posterior de fenofibrato durante 4 horas, no se observa cambio alguno en el porcentaje de viabilidad celular (Figura 7), por lo que esto nos sugiere que la administración fenofibrato posterior al insulto (exposición a alta glucosa 48 hrs) no tiene ningún efecto de reversión del daño ocasionado ya por la alta glucosa. Se obtuvieron resultados similares al evaluar la viabilidad celular pero ahora mediante la técnica de MTT, en donde esta técnica nos refleja también la funcionabilidad de la mitocondria (Figura 8).

Para determinar si el fenofibrato disminuía la muerte celular este se administró 4 horas antes de la exposición a las 48 hrs con alta glucosa y observamos que la viabilidad se mantiene casi a niveles normales (Figura 7), esto nos indica que el fenofibrato cuando se administra antes del insulto tiene un efecto protector sobre los cardiomiocitos que hace que se mantenga la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la estimulación de los PPAR α por fenofibrato atenúa el daño ocasionado por la hipoxia-reperfusión, alta glucosa y la combinación en la ultraestructura de los cardiomiocitos (Figura 9). Se observó en la hipoxia-reperfusión las crestas mitocondriales tubulares y menos densas que las controles; además, de un vaciamiento de su contenido y al examinar las membranas se observó una disrupción de estas. El núcleo presentó condensación de la cromatina y ruptura en su membrana. En los grupos con alta glucosa se observó que las mitocondrias sufren un proceso de vacuolización, se encuentran hinchadas, la membrana plasmática se observó fragmentada. En los cardiomiocitos sometidos a alta glucosa e hipoxia-reperfusión se observa un mayor daño en la ultraestructura y no se puede distinguir la citoarquitectura celular. Sin embargo, la estimulación de los PPAR α por fenofibrato atenúa el daño en estructuras celulares fundamentales para el cardiomiocito. Sugerimos que la disminución del daño observada en los cardiomiocitos se debe a: 1) disminución del estrés oxidante por una disminución de la expresión de subunidades de la enzima NADPH oxidasa (principal enzima productora del radical superóxido) 2) se favorece un ambiente antioxidante por un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes, de Nrf2, 3) disminución del daño generado a macromoléculas como lípidos de membrana y ADN; y 4) Aumento la activación eNOS (fosforilación en la SER1177).

X.- CONCLUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que tanto la hipoxia reperfusión como la alta glucosa y la combinación de ambas condiciones experimentales generan estrés oxidante en el cardiomiocito lo que trae consigo daño a macromoléculas importantes en la célula como como lípidos, ADN y proteínas. Además, disminución en la viabilidad celular y daño en la ultraestructura cardiaca. El tratamiento con fenofibrato mejora la ultraestructura cardiaca y la viabilidad celular, disminuyendo las vías que favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno (estado oxidante) y mejorando el estado antioxidante de la célula.

XI.- PERSPECTIVAS A FUTURO

Al investigar parte de los mecanismos y bases moleculares que subyacen en materia de la cardioprotección en un modelo de cultivo de cardiomiocitos expuestos a hipoxia-reperusión, alta glucosa y la combinación de ambas condiciones experimentales; se podrá investigar las acciones novedosas de fármacos sobre las diversas funciones celulares, donde juegan un papel importante en la bioregulación y limitación del daño en las células cardiacas. Con sustento en lo anterior, la utilización de fenofibrato se podría utilizar como tratamiento coadyuvante para el control y como prevención del daño ocasionado por las enfermedades isquémicas del corazón y la diabetes mellitus.

Estudiar el fenofibrato en concomitancia con otros fármacos que se utilizan específicamente para las enfermedades isquémicas y en la diabetes mellitus y sirvan de sustento y base molecular; cuya aportación conduzca a nuevas estrategias terapéuticas o preventivas, disminuyendo sus posibles complicaciones. Además, de la comprensión de los eventos biológicos implicados en ellas.

Evaluar con detenimiento mediante diversas técnicas, el efecto observado en el presente estudio del fenofibrato sobre la membrana celular el cual fue su estabilización e integridad.

Estudiar mediante estudios clínico el efecto de fenofibrato en pacientes con alguna enfermedad cardiovascular y/o diabetes mellitus y comparar estos con los ya obtenidos en estudios *in vivo* e *in vitro*.

XII.- REFERENCIAS

1. Soto, E.G., Moreno A. L., Pahua D. D., *Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad*. Facultad de Medicina de la UNAM, 2016. **59**(6): p. 8-22.
2. Salud, O.M.d.I., *INFORME MUNDIAL SOBRE LA DIABETES*. Biblioteca de la OMS, 2016: p. 1-88.
3. Sánchez, A.A.G., Bobadilla, S. M. E., Dimas, A. B., Gómez, O. M., González, G. G., *Enfermedad Cardiovascular: Primera Causa de Morbilidad en un Hospital de Tercer Nivel*. Revista Mexicana de Cardiología, 2016. **27**(3): p. s98-s102.
4. Moreu, B.J., Macaya, M. C., *Fisiopatología del Miocardio Isquémico. Importancia de la Frecuencia Cardíaca*. Rev Esp Cardiol Supl. , 2007. **7**: p. 19D-25D.
5. Rivas, A.E., Zerquera, T. G., Hernández, G. C., Sánchez, B. V., *Manejo Práctico del Paciente con Diabetes Mellitus en la Atención Primaria de Salud*. Finlay, 2011. **1**(3): p. 1-22.
6. Sanabria, R.F.G., K. J. C., *Síndrome de Reperusión. Fisiopatología, Prevención y Manejo*. Revista Colombiana de Anestesiología, 2000. **XXVIII**(4): p. 1-8.
7. Rosado, P.J.M., N. V. , *Mini-Revision:Inflamacion Crónica y Estrés Oxidativo en la diabetes mellitus*. Bioquímica, 2007. **32**(2): p. 58-69.
8. Venereo, G.J.R., *Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes*. Rev. Cubana Medicina Militar, 2002. **31**(2): p. 126-133.
9. Konigsberg, F.M., *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas* Manual moderno, 2008. **1era edición**: p. 1-623.
10. Cruz, H.J., Licea, P. M. E., Hernández, G. P., Abraham, M. E. A., Yanes, Q. M., *Estrés Oxidativo y Diabetes Mellitus*. Rev Mex Patol Clin, 2011. **58**(1): p. 4-15.
11. Cadenas, S., *ROS and Redox Signaling in Myocardial Ischemia-reperfusion Injury and Cardioprotection*. Free Radical Biology and Medicine, 2018. **117**: p. 76-89.
12. Velimirović , M., Jevtić, G., Selaković, V., *Effects of Vitamin D3 on the NADPH Oxidase and Matrix Metalloproteinase 9 in an Animal Model of Global Cerebral Ischemia*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018. **2018**: p. 1-18.
13. George, J., Struthers, A. D., *Role of Urate, Xanthine oxidase and the Effects of Allopurinol in Vascular Oxidative Stress*. Vascular Health and Risk Management, 2009. **5**: p. 265–272.
14. San Miguel, A., Iglesias, R., Alonso, N., Calvo, B., Martín-Gil, F. J., *Síntesis e Implicaciones Fisiológicas del Óxido Nítrico*. Diagnóstico in vitro 2006. **4**(76): p. 1-17.
15. Zhang, J.X., Liang, X. Q., Chu, P., Jiang, D. X., Lin, L. Z., Lin Y. Ch., Zhang, J. J., Chen, S. L., *Low Shear Stress Induces Vascular eNOS Uncoupling Via Autophagy-mediated eNOS Phosphorylation*. Molecular Cell Research, 2018: p. 1-24.
16. Balamurugan, K., *HIF-1 at the Crossroads of Hypoxia, Inflammation, and Cancer*. . International Journal of Cancer, 2015. **138**(5): p. 1058-1066.
17. Fraga, A., Ribeiro, R., Medeiros, R., *Hipoxia tumoral: Papel del Factor Inducible por Hipoxia*. Actas Urológicas Españolas, 2009. **33**(9) : p. 941-951.
18. O., M.R., *Oxidative Stress and Antioxidant Defense System*. Rev. Inst. Med. Trop., 2010. **5**(2): p. 23-29.
19. Murugesan, B., Paulraj, S., Thangamuthu, M., Seenivasan, R., Niroj, K. S., Kalpana, B., Srigiridhar, K., Chandran, K., *Recent trends in Electrochemical Biosensors of Superoxide Dismutases*. Biosensors and Bioelectronic, 2018: p. 1-37.
20. Constanza, C.C., Muñoz, A. M., *Estrés Oxidativo: Origen, Evolución y Consecuencias de la Toxicidad del Oxígeno*. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, 2012. **10**: p. 213-225.
21. Díaz, A., *La Estructura de las Catalasas*. REB, 2003. **22**(2): p. 76-84.

22. Menegon, S., Columbano, A., Giordano, S., *The Dual Roles of NRF2 in Cancer*. Trends in Molecular Medicine, 2016. **22**(7): p. 578-593
23. Wang, X., Yang, L., Kang, L., Li, J., Yang, L., Zhang, J., *Metformin Attenuates Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Via up-regulation of Antioxidant Enzymes*. PLOS ONE, 2017. **12**(8): p. 1-13.
24. Zhou, X., Lu, X., *The Role of Oxidative Stress in High Glucose-induced Apoptosis in Neonatal Rat Cardiomyocytes*. Experimental Biology and Medicine, 2013. **238**: p. 898-902.
25. Zorrilla, G.A., Eirez, I., Izquierdo E. M., *Papel de los Radicales Libres sobre el ADN: Carcinogénesis y Terapia Antioxidante*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2004. **23**(1).
26. García, U.L., Marquéz, L. J. Rhenals, M., *Estrés Oxidativo, Daño al ADN y Cáncer*. Ciencias Biomédicas 2015. **6**(1): p. 107-117.
27. San Miguel, A., Martín, G. F. J., *Importancia de las Especies Reactivas de Oxígeno (Radicales Libres) y los Antioxidantes en Clínica*. Gac Med Bilbao., 2009: p. 106-113.
28. González, T.M.C., Betancourt, R. M., Ortiz, M. R., *Daño Oxidativo y Antioxidantes* BIOQUIMIA, 2000. **25**(1): p. 3-9.
29. Téllez, F., Carvajal, K., García, C., Vásquez, C., Chávez, E., Moreno, S. R., *Bases Bioquímicas y Celulares del Daño por Isquemia y Reperusión en el Miocardio* Archivos del Instituto de Cardiología de México, 1996. **66**(2): p. 162-181.
30. Férrez, S.S.M., Márqueza, M. F., Peña, D. M.A., Ocaranza, S. R., Peña, A. E., Eid, L. G., *Daño Miocárdico por Reperusión*. Rev Esp Cardiol Supl., 2003. **57**(1): p. 9-21.
31. Benavides, T.M.C., Pinzón, T. A., *Óxido Nítrico: Implicaciones Fisiopatológicas*. Rev. Col. Anest. , 2008. **36**: p. 45-52.
32. Rang, H.P., Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G., *Farmacología*. 8° ed. 2016, España.
33. Tamargo, J.C., R. Gómez, R. Núñez, L. Vaquero, M. Delpón, E., *Efectos del Óxido Nítrico sobre la Función Cardíaca*. Rev Esp Cardiol Supl., 2006. **6**: p. 3A-20A.
34. Ortega, D., Herrera, R. M., Tecalco, C. A., *Receptores Nucleares: del Núcleo al Citoplasma*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2015. **18**(2): p. 131-143.
35. Botta, M., Audano, M., Sahebkar, A., Sirtori, C. R., Mitro, N., Ruscica, M., *PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? International Journal of Molecular Sciences* 2018. **19**: p. 1-21.
36. Berger, J., Moller, D. E., *The Mechanisms of Action of PPARs*. Annu. Rev. Med, 2002. **53**: p. 409- 435.
37. Carvajal, K., Hernández, E. M., Moreno, S. R., *PPARs, Síndrome Metabólico y Enfermedad Cardíaca*. Archivos de Cardiología de México 2007. **77**(4): p. 66-76.
38. Sanhueza, C.J., Valenzuela, B. A., *Receptores Nucleares y Regulación de la Expresión Génica por Ácidos Grasos Poliinsaturados: Algo más que Producción de Energía y Esencialidad*. Revista Chilena de Nutrición, 2006. **33**(2): p. 1-17.
39. Taberner, A., Schoonjans, K., Jesel, L., Carpusca, I., Auwerx, J., Andriantsitohaina, R., *Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor α protects against myocardial ischaemic injury and improves endothelial vasodilatation*. BMC Pharmacology, 2002. **2**(10): p. 1-10.
40. Velázquez, B., Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A., *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª ed, ed. M. Panamericana. 2008.
41. Zhang, L., Wang, X., Wu, Y., Lu, X., Chidiac, P., Wang, G., Feng, Q., *Maternal Diabetes up-regulates NOX2 and Enhances Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Adult Offspring*. J. Cell. Mol. Med., 2017. **XX** (X): p. 1-10.

42. Pitts, K.R., Toombs C. F., *Coverslip Hypoxia: a Novel Method for Studying Cardiac Myocyte Hypoxia and Ischemia in vitro*. *AJP-Heart Circ Physiol*, 2004. **287**: p. 1801- 1812.
43. González, M., Soria, C. M. E., *Changes in the Tubular Compartment of Testis of Gallus Domesticus During Development*. *Br Poult Sci*, 2010. **51** p. 296-307.
44. Medeeha, H.H., *Fast High Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Method for Determination of Phenolic Antioxidants in Fresh Rosemary Leaves*. *Journal Natural Sciences Research* 2015. **5**: p. 89-92.
45. Zhang, Z.Q.C., Zhu, M., Huang, Y., Walter, K. K., Yu, Z. C., *Characterization of Antioxidants Present in Hawthorn Fruits* *Journal Nutritional Biochemistry*, 2001. **12**: p. 144-152.
46. Jia, Z., Lian, W., Shi, H., Cao, C., Han, S., Wang, Li, M., Zhang, X., *Ischemic Postconditioning Protects Against Intestinal Ischemia/ Reperfusion Injury via the HIF-1 α / miR-21 Axis*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 1-11.
47. Liu, Q., Zhang, X1., Cheng, R., Ma, JX., Yi, J., Li, J., *Salutary Effect of Fenofibrate on Type 1 Diabetic Retinopathy Via Inhibiting Oxidative Stress-mediated Wnt/ β -catenin Pathway Activation*. *Cell Tissue Res*, 2019. **376** (2): p. 165-177.
48. He, X., Kan, H., Cai, L., Ma, Q., *Nrf2 is Critical in Defense Against High Glucose-induced Oxidative Damage in Cardiomyocytes*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009. **46**: p. 47-58.
49. Xu, J.B., Zhang, J., Strom, J. S. Lee, Q. M., *Myocardial Ischemic Reperfusion Induces de Novo Nrf2 Protein Translation*. *Biochemical and Biophysical* 2014. **9**: p. 1638-1647

50. Liu, Q., Zhang, F., Zhang, X., Cheng, R., Ma, J., Yi, J., Li, J., *Fenofibrate Ameliorates Diabetic Retinopathy by Modulating Nrf2 Signaling and NLRP3 Inflammasome Activation*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2017: p. 1-11.
51. Calderón, S.J.V., Muñoz, R. E. G., Quintanar, E. M. A., *Estrés Oxidativo y Diabetes Mellitus*. *Revista de educación bioquímica*, 2013. **32**(2): p. 53-66.
52. Ibarra, L.L., Hong, E., Soria, C. E., Torres, N. J. C., Pérez, S. F., del Valle, M. L., Cervantes, P. L. G., Sánchez, M. A., *Fenofibrate PPAR α Activation Reduces Oxidative Stress and Improves Ultrastructure and Ventricular Hemodynamics in No-flow Myocardial Ischemia*. *Cardiovascular Pharmacology*, 2012. **60**(4): p. 323-334.
53. Xia, Y., Tsai, A. L., Berka, V., Zweier J. L., *Superoxide Generation from Endothelial Nitric Oxide Synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and Tetrahydrobiopterin Regulatory Process*. *Biol Chem*, 1997. **272**: p. 21420-21426.
54. Giraldez, R., Panda, A., Xia, Y., Sanders, S., Zweier, J., *Decreased Nitric-oxide Synthase activity Causes Impaired Endothelium Dependent Relaxation in the Postischemic Heart*. *Biol Chem*, 1997. **272**: p. 21420-21426.
55. Goya, K., Sumitani, S., Xu, X., Kitamura, T., Yamamoto, K., *Peroxisome proliferator-activated receptor α Agonists Increased Nitric Oxide Synthase Expression in Vascular Endothelial Cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**: p. 658-663.
56. Zhang, J.R., Yu, H. L., *Effect of NF- κ B Signaling Pathway Mediated by miR-711 on the Apoptosis of H9c2 Cardiomyocytes in Myocardial Ischemia Reperfusion*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017. **21**: p. 5781-5788.
57. Zhang, S., Wang, H., Li, L., Chang, X., Ma, H., Zhang, M., Qing, X., Zhang, L., Zhang, Z., *Qishen Yiqi Drop Pill, a Novel Compound Chinese Traditional Medicine Protects Against High Glucose-induced Injury in Cardiomyocytes*. *Wiley*, 2019. **00**: p. 1-10.

XIII.-APÉNDICE

Preparación de soluciones.

Solución de PBS pH 7.2

Mezclar 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 41.15 g Na₂HPO₄ y 0.02 g K₂HPO₄. Se ajusta el pH 7.2 y se afora a un litro.

Solución PBS pH 7.2 completo

Mezclar PBS pH 7.2, rojo fenol, antibiótico-antimicótico (5 ml por cada 500 ml), albúmina al 5% (5 ml por 500ml), glucosa al 10% (5ml por cada 500ml).

Medio de cultivo completo

Mezclar 500 ml de medio de cultivo F10, 50 ml de suero fetal bovino y 5 ml de antibiótico-antimicótico.

Solución bloqueadora de PBS leche al 5%

Disolver 5 g de leche descremada en polvo en 100 ml de PBS pH 7.2.

Solución bloqueadora de PBS leche al 1%

Disolver 1 g de leche descremada en polvo en 100 ml de PBS pH 7.2.

Solución de corrida 4X.

Se pesan 12.12 g de Tris-base, 57.6 g de glicina y 4 g de SDS y se disuelven en 750 ml de agua bidestilada, después se afora a 1 litro. Almacenar de 2° - 8° C.

Solución amortiguadora de transferencia

Pesar 14.4 g de glicina y 3.03 g de Tris-base, disolver en 250 ml de agua bidestilada, agregar 200 ml de metanol absoluto y aforar a 1 litro.

Solución amortiguadora de carga

Se agrega en un tubo falcon de 50 ml los reactivos siguientes:

Agua destilada: 4 ml, Tris HCl (0.05 M) pH 6.8: 1 ml, SDS (10%): 0.8 ml, Betamercaptoetanol: 1.6 ml, Azul de bromofenol: 0.5 ml. Se almacena a temperatura ambiente.

Solución de Fosfatos y Tween 20

Se agrega a 1 litro de PBS (pH 7.2) 500 µl de Tween 20.

Persulfato de amonio al 10%

Pesar 5 g de persulfato de amonio y disolverlo en 100 ml de agua bidestilada. Guardar a 4° C.

Solución 4X Tris-HCl/SDS pH 6.8

Disolver 6.05 g de Tris base en 40 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8. Aforar a 100 ml, filtrar la solución y agregar 0.4 g de SDS, mezclar y almacenar a 4° C.

Solución 4X Tris-HCl/SDS pH 8.8

Disolver 91 g de Tris base en 300 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.8. Aforar a 500 ml, filtrar la solución y agregar 2 g de SDS, mezclar y almacenar a 4° C.

Solución patrón de acrilamida

Se disuelve 80 g de acrilamida y 30 g de bisacrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida) en agua bidestilada. Se afora a 100 ml y se almacena protegida de la luz a 2-8° C.

Buffer de corrida para electroforesis capilar de zona (CZE)

El amortiguador de corrida para CZE consiste en (mM): ácido bórico 100 y ácido tartárico 3 y pH 9.

Reactivo Bradford

Adicionar a 50 ml de etanol absoluto 100 mg de azul de Coomassie y agitar hasta disolver, posteriormente adicionar 100 ml de ácido fosfórico y agitar durante 60 segundos. Aforar a 200 ml con agua desionizada, filtrar y guardar en frasco ambar.

Preparación del sistema de transferencia de proteínas

Colocar los materiales siguientes en el orden que se indica:

- 1.- Papel filtro (3 cuadros previamente humedecidos en buffer de transferencia)
- 2.- Membrana PVDF (Preparada como indica el proveedor Millipore)
- 3.- Gel de acrilamida. (Conteniendo las proteínas previamente separadas por electroforesis)
- 4.- Papel filtro (3 cuadros previamente humedecidos en buffer de transferencia)

Colocar el emparedado en la unidad de transferencia