

ESTUDIO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO EN CARDIOMIOCITOS H9c2

AUTORA: ISABEL GALLARDO ROMERO

DIRECTORA: MARIA LUISA NIETO CALLEJO

Julio 2014

ÍNDICE

Abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Introducción.....	3
Objetivo.....	5
Material y métodos.....	5
Resultados.....	8
Discusión.....	25
Conclusión.....	28
Referencias.....	29

ABREVIATURAS:

ALP= alopurinol

AO= ácido oleanólico

BB1X= binding buffer

Ca_{2 i} = calcio intracelular

CaCl₂= cloruro de calcio

CL = cardiolipina

CTE = cadena de transporte de electrones

DCFH-DA = 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

DHE= Dihydroethidium

DMEN = medio Eagle modificado de Dulbecco

DPI= diphenyleneiodonium chloride

EAC= conjuntivitis alérgica específica

EAE =encefalomielitis experimental

FCS = suero de ternera fetal

h= hora

H₂O₂ = peróxido de hidrógeno

HRP= peroxidasa de rábano

MAE = miocarditis autoinmune experimental

Min= minuto

mitoT= mitotempo

NaCl= cloruro de Sodio

NADH = nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa

NAO = Nonyl Acridine Orange

NaOH= hidróxido de sodio

O₂• = anión superóxido

ON = overnight (aprox.18H)

PE= Ficoeritrina

PTP = poro transitorio mitocondrial

Rh123= rodamina 123

ROS = especies reativas de oxígeno

RTN= rotenona

SOD = enzimas superóxido dismutasa

RESUMEN

La miocarditis es una enfermedad cardiovascular muy desconocida en nuestros días y que afecta a un gran número de personas en el mundo. El modelo murino con miocarditis autoinmune experimental (MAE) del laboratorio demuestra el aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), en concreto de H_2O_2 , en corazones de estos ratones enfermos. Debido a estos antecedentes en modelo *in vivo*, se quiere conocer cual es el papel de los ROS (H_2O_2 y $O_2\bullet$) en estudios *in vitro* mediante la estimulación con H_2O_2 en la línea celular de cardiomioblastos de rata (H9c2). Por lo tanto, el objetivo principal del estudio es determinar la función de H_2O_2 y $O_2\bullet$ en esta línea celular, y como objetivos particulares, determinar el origen de los ROS y las funciones que realizan, mediante el uso de antioxidantes. Para ello las células se marcan con determinadas sondas y se realizan análisis mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Los resultados demuestran que el H_2O_2 desencadena producción de ROS (H_2O_2 Y $O_2\bullet$) de origen mitocondrial y que estos desencadenan apoptosis vía intrínseca.

INTRODUCCIÓN:

Las enfermedades cardiovasculares constituyen un grupo de patologías con una alta tasa de morbilidad. Una de las menos estudiadas es la miocarditis, enfermedad inflamatoria del músculo cardíaco con daño asociado a los miocitos adyacentes (1). La importancia de su estudio recae en que es una de las principales causas de muerte súbita en adolescentes y adultos jóvenes (2). Además su origen no es bien conocido; existen grandes evidencias que apoyan su vínculo con una infección viral previa (3), aunque también puede aparecer por motivos de índole idiopático o autoinmune (4).

El diagnóstico clínico depende de electrocardiogramas, ecocardiograma, pruebas histológicas, inmunológicas o incluso de hallazgos en autopsias o biopsias (1). La clasificación clínica más extendida diferencia entre miocarditis primarias o secundarias. Así, hay pacientes que presentan cambios electrocardiográficos o ecocardiográficos sugestivos de miopericarditis, pero sanan sin consecuencias. Otros cursan con disfunción ventricular y curan con secuelas, finalmente algunos fallecen a las pocas horas de los primeros síntomas (5). Por otro lado el 21% de las miocarditis evolucionan a miocardiopatías dilatadas inflamatorias crónicas que pueden progresar a insuficiencias cardíacas, y posteriormente, a insuficiencia cardíaca congestiva con una tasa de mortalidad del 46% en 5 años (1).

En cuanto a la terapéutica, el tratamiento estandarizado no está definido. Diversos estudios incluyen agentes inmunosupresores, inmunoadsorción e interferón. Además, los fármacos antiinflamatorios no específicos son útiles en etapas tardías pero no en la fase aguda de la enfermedad. Finalmente, enfermos en los que fracasan los tratamientos requieren un trasplante cardíaco. (3)

Con el fin de desentrañar los mecanismos subyacentes en la miocarditis, así como para ensayar nuevas drogas que puedan traducirse en nuevas terapias, se han desarrollado tanto modelos animales, con miocarditis autoinmune experimental (MAE), que comparten numerosas características clínicas e histológicas con enfermos de miocarditis; como modelos *in vitro* con células cardíacas aisladas que permiten estudiar la enfermedad a nivel molecular. Estos dos tipos de aproximaciones son de gran utilidad para avanzar en el estudio de la enfermedad.

Debido a que muchos de los componentes patogénicos de las enfermedades cardíacas están estrechamente vinculados con el estrés oxidativo, las especies reactivas del oxígeno (ROS), producidas durante la enfermedad pueden estar implicadas directamente en ella (6). Aunque los ROS pueden provenir de diferentes organelas, las mitocondrias son consideradas las principales productoras de ROS. Éstas producen principalmente anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (7). Aproximadamente el 80% del anión superóxido es producido por las mitocondrias (8).

Se ha comprobado que el 30% del volumen cardíaco está ocupado por mitocondrias, y por lo tanto el corazón es altamente susceptible de sufrir daño oxidativo por ROS (9). Para combatir los efectos deletéreos de ROS, las mitocondrias han desarrollado una red de defensa antioxidante intrínseca que se compone principalmente de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y NADH, y un sistema redox de glutatión completa (10). En muchos casos esta red no es suficiente para evitar que los ROS oxiden a otras biomoléculas (7), entre otras la cardiolípidina.

La cardiolipina (CL) es un fosfolípido localizado en la membrana mitocondrial interna, donde interactúa con las proteínas de la cadena de transporte de electrones (CTE). Debido a que este fosfolípido se encuentra en estrecha proximidad a los sitios de la producción de ROS en la CTE mitocondrial, es un blanco fácil para la reacción con ROS (7). Se ha visto que la oxidación de cardiolipina causa la disfunción de CTE mitocondrial (11) y parece que contribuye a la liberación de proteínas proapoptóticas, incluyendo citocromo *c*, desde el espacio intermembrana (12). Como conclusión, si estos ROS producen una oxidación en la cardiolipina, podrían desencadenar la apoptosis vía intrínseca de las células cardíacas.

OBJETIVO DE ESTUDIO

El objetivo general de este estudio ha sido caracterizar la función de las especies reactivas de oxígeno (Peróxido de Hidrógeno - H_2O_2 y anión superóxido - $O_2^{\bullet-}$) en la línea celular de mioblastos H9c2. Como objetivos particulares nos planteamos caracterizar las distintas vías de producción de ROS, mediante el uso de antioxidantes, así como determinar si estos ROS producidos desencadenan apoptosis intrínseca vía mitocondrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular y condiciones de cultivo. La línea celular de utilizadad en este estudio es la H9c2 (cortesía de A. Branco, CNIC, España). Se trata de células primarias del miocardio ventricular de rata, procedentes de tejido cardíaco embrionario.

Las células adherentes se cultivan en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (4,5g/L) complementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL estreptomycin y 4mM L-glutamina; en condiciones de 37°C y a 5% de CO_2 . Los experimentos se realizan cuando las células alcanzan una confluencia del 80-85%, momento en el que el medio de crecimiento se cambia por DMEM sin suero. Tras 18 h de incubación las células alcanzan el estado de quiescencia.

Material inductor de ROS celular: Las células son estimuladas a 37°C durante los tiempos indicados, con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a distintas concentraciones. La concentración óptima de estímulo, 500 µM, se eligió para los estudios con inhibidores.

Medida de ROS celulares: Las células son incubadas con 3 sondas diferentes que se oxidan en presencia de ROS. La sonda 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), (10µM, Sigma) que cuantifica la cantidad de H₂O₂ celular, es de composición apolar y tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Una vez dentro es hidrolizada por la esterasas de la célula a diclorofluorescina (DCFH) que en presencia de H₂O₂, se convierte en su forma fluorescente (DCF). La sonda Dihydroethidium (DHE), (2 µM, invitrogen), compuesto no fluorescente que puede atravesar la membrana de células. En el interior se oxida por el anión superóxido produciendo etidio, compuesto que se intercala en el DNA emitiendo fluorescencia (13,14). Y por último, la sonda MitoSox red (5 µM, invitrogen) colorante fluorógeno que se dirige a las mitocondrias de células vivas, y produce fluorescencia roja cuando se oxidada con el anión superóxido(O^{2•-}) dentro de la mitocondria.

La puesta a punto de los protocolos de las distintas sondas, se realizó previamente en el laboratorio. Así, DCFH-DA se añade antes de la estimulación con H₂O₂. Por el contrario, las células se marcan con DHE y MitoSox Red después de estimular con H₂O₂. MitoSox red se añade al medio de cultivo, mientras que DHE se adiciona después de despegar y lavar las células. En todos los casos las sondas son incubadas a 37°C y 5% de CO₂ ; DCFHDA y DHE se incuba durante 30 minutos y MitoSox Red solo 10 minutos . Las células se despegan con EDTA, y el buffer para los lavados es PBS 1X, finalmente la fluorescencia se analiza en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter).

Estimación del potencial de membrana mitocondrial: Para medir el potencial de membrana mitocondrial se marcan las células con rodamina 123. Se trata de una sonda de naturaleza catiónica y lipofílica que se emplea comúnmente como indicador de la funcionalidad mitocondrial, ya que sólo se acumula en mitocondrias metabólicamente activas cuyo potencial de membrana es negativo. Por lo tanto, la fluorescencia será inversamente proporcional a la pérdida de potencial mitocondrial.

Las células se marcan durante 15 minutos, en el incubador, con Rodamina 123 (4 μM , Sigma). Posteriormente, se adiciona el H_2O_2 en presencia o ausencia de inhibidores de ROS. Las células son lavadas con PBSX1 y se analizan en el citómetro de flujo.

Estimación de oxidación de la cardiolipina: Las células se incuban durante 15 minutos a 37°C con la sonda Nonyl Acridine Orange (NAO) (10 μM , Santa Cruz) que solo es capaz de unirse a la cardiolipina no oxidada. A continuación se estimulan con H_2O_2 , a las dosis indicadas durante 30 minutos. Tras dos lavados con PBS 1x la fluorescencia se analiza con el citómetro de flujo.

Compuestos inhibidores de ROS: Los compuestos inhibidores de ROS, utilizados a diferentes dosis, fueron: El ácido oleanólico: 1, 5, 10 μM (Extrasynthese), Mitotempo: 10, 50 μM (Santa Cruz;), Alopurinol: 10, 50 μM (Sigma), Rotenona: 1, 10 μM (Sigma) y finalmente diphenyleneiodonium chloride, DPI: 5, 20 μM (Sigma;). Las dosis utilizadas se determinaron por estudios previos en el laboratorio con esta y otras líneas celulares. Las células se pretrataron con los antioxidantes durante 30 min a 37°C .

Estimación de apoptosis temprana: Uno de los primeros eventos que ocurre durante la apoptosis temprana es la externalización de la fosfatidilserina, un fosfolípido de la membrana celular. Así, la apoptosis se determinó mediante la unión de Anexina-V a la fosfatidilserina externalizada. Las células en medio sin suero son estimuladas con H_2O_2 , en ausencia o presencia de antioxidantes. Posteriormente, después de despegar y lavar, se marcan con Anexina V conjugada con ficoeritrina (PE), en un tampón óptimo para el funcionamiento de la anexina V (Hepes/NaOH 10 nM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl_2 2.5 mM) (binding buffer, BB1x) (BD). La Anexina V-PE se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, la incubación es parada con BB1x y el análisis se realiza en el citómetro de flujo.

Análisis de microscopía: En una placa de 4 pocillos se depositan cristales de 12 mm y sobre ellos las células H9c2 en DMEN sin suero. A continuación, las células se marcan con las sondas DHE ó NAO, siguiendo los mismos pasos que en los experimentos de citometría de flujo. Las células se estimulan con 500 μM de H_2O_2 durante 30 min (para DHE) ó 24 h (para NAO) a 37°C, en presencia o ausencia de 10 μM de AO (30 min de pretratamiento a 37°C). Tras lavados con PBS 1X, los cristales se montan, con la cara tratada hacia abajo en un portaobjetos, sobre la solución de Gervatol. Finalmente, se dejan secar, y se conservan a 4°C hasta su análisis. Las preparaciones se visualizan en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i.

RESULTADOS

Estudios previos realizados en el laboratorio, en ratones a los cuales se les ha inducido miocarditis autoinmune experimental (MAE), mostraron elevados niveles de H_2O_2 en el tejido cardíaco. Sin embargo cuando los ratones eran tratados con OA estos niveles se reducían significativamente (figura 1 A). Así, el estudio se centra en caracterizar el papel del estrés oxidativo en cardiomiocitos “*in vitro*”, mediante la utilización de la línea celular H9c2 (figura 1B). Esta línea posee la ventaja de tener su origen en células primarias del ventrículo de rata, lo que las acerca más al estado fisiológico; Sin embargo, tienen la desventaja del límite de supervivencia y su lento crecimiento en comparación con otras líneas celulares inmortalizadas.

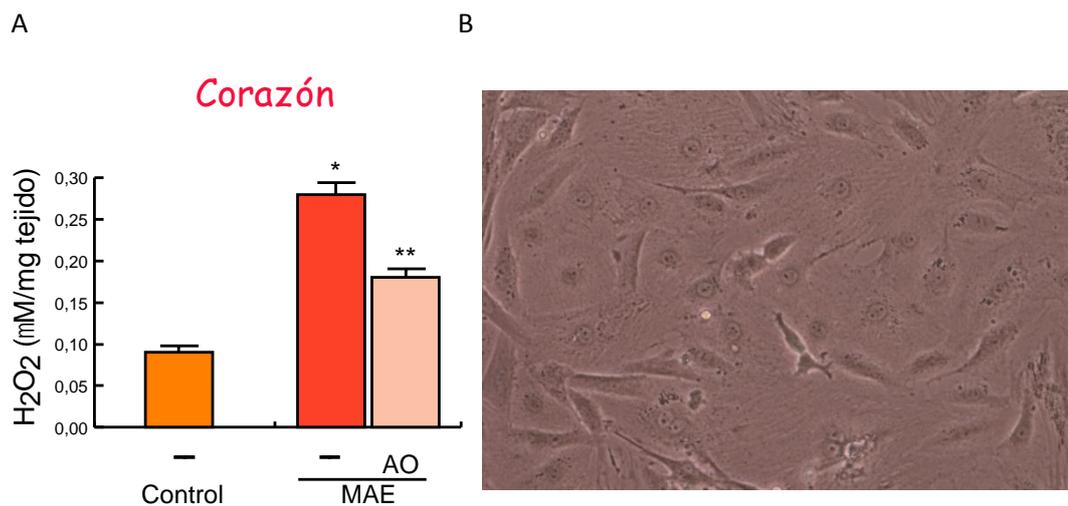


Figura 1.A) Estudio en corazón de ratones control, MAE y tratados con AO. Se ve que hay un aumento significativo de H_2O_2 en el enfermo con respecto al control. En cuanto a los ratones tratados con AO se ve que se produce un descenso significativo de H_2O_2 con respecto al enfermo. B) cultivo celular de células H9c2 después de 5 días de crecimiento.

ROS generado por el peróxido de hidrógeno en células cardíacas H9c2

Para determinar la producción celular de especies reactivas de oxígeno (ROS) se realizan experimentos con 3 sondas fluorescentes diferentes y se analizan por citometría de flujo. La fluorescencia resultante en los tres casos es directamente proporcional a la cantidad de ROS generados.

La sonda DCFH-DA cuantifica la cantidad de H_2O_2 celular. Con el objeto de determinar el tiempo óptimo de incubación de las células con H_2O_2 , se realiza una cinética a un tiempo corto (30 min) y otro largo (24 h), con una dosis de $500 \mu M$ de H_2O_2 . Como se observa en la figura 2, las células incubadas durante 30 minutos con H_2O_2 generan una respuesta significativa, con lo que este tiempo se eligió para realizar el resto de experimentos, ya que la incubación durante 24 h daña más la viabilidad celular a pesar de que hay un mayor aumento de la fluorescencia.

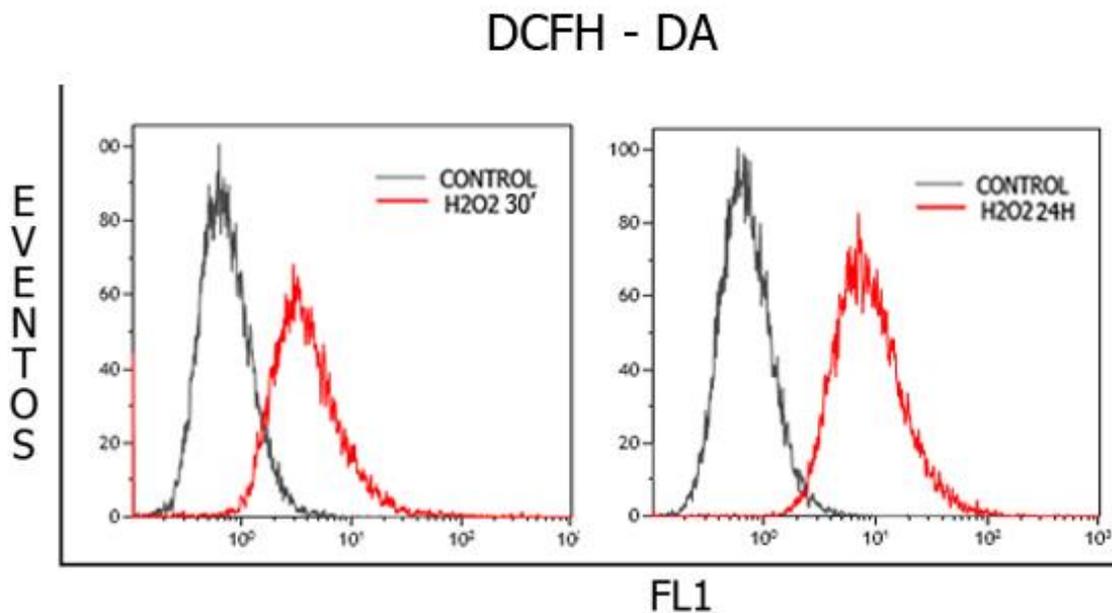


Figura 2. Cinética del H_2O_2 con la sonda DCFH-DA la cual permite la cuantificación de H_2O_2 presente en las células H9c2. Las células se estimulan a diferentes tiempos de incubación: 30 minutos y 24h y se analizan en citómetro de flujo.

A continuación, se realiza una curva dosis-respuesta con diferentes dosis de H_2O_2 (100,300,500 μM) incubadas durante 30 minutos, para corroborar estudios anteriores. Como se observa en la gráfica, la concentración de H_2O_2 a la que se produce más respuesta es la de 500 μM (figura 3) que se usará para experimentos posteriores con inhibidores.

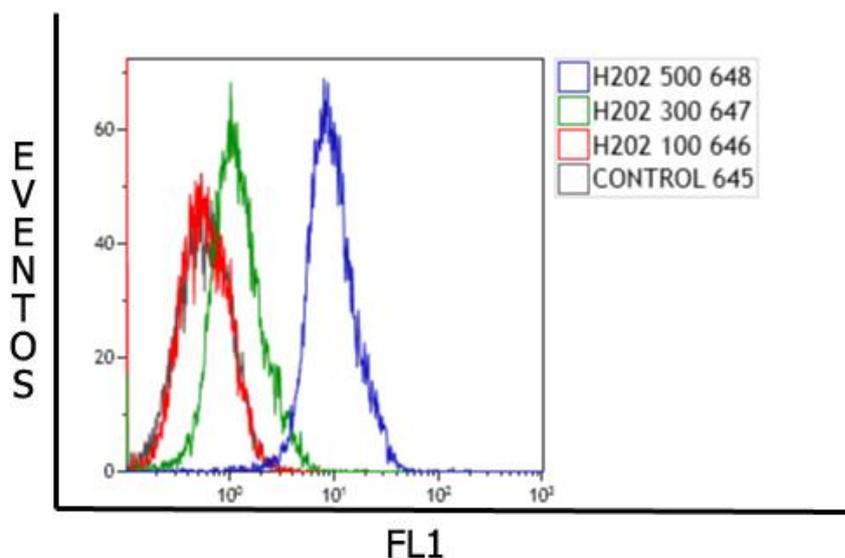


Figura 3. Curva dosis-respuesta realizada en la línea celular H9c2 a diferentes concentraciones de H_2O_2 (0, 100, 300 y 500 μM) marcadas previamente con sonda DCFH-DA e incubadas durante 30 minutos, las cuales se analizan por citometría de flujo.

Otra de las especies reactivas de oxígeno analizadas es el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$). El estudio de este anión se realiza con dos sondas diferentes, una detecta los niveles del anión en la totalidad de la célula, y la otra los detecta a nivel mitocondrial. Para la medición a nivel de célula completa, se utiliza la sonda DHE.

El procedimiento de análisis es similar al realizado con la sonda DCFH-DA. Primero se realiza una cinética utilizando la concentración 500 μM de H_2O_2 . Se establece el tiempo de 30 minutos como el óptimo de producción de $O_2^{\bullet -}$. Ya que se observa una respuesta significativa en la fluorescencia(figura 4).

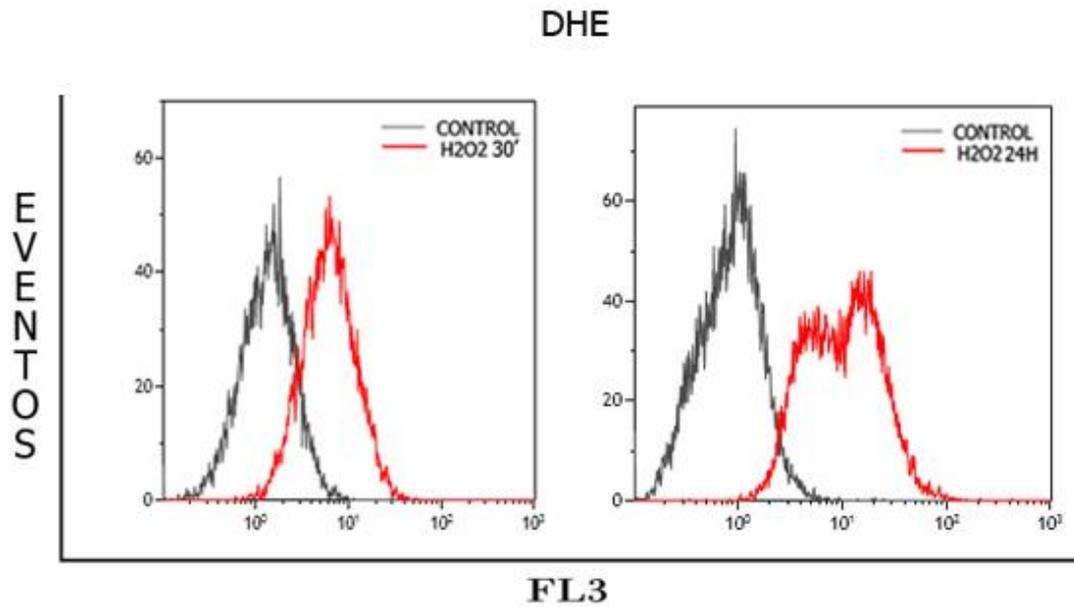


figura 4. Cinética del H_2O_2 en presencia de la sonda DHE la cual permite la cuantificación de $O^{2\bullet}$ en la línea celular H9c2 mediante su análisis en citómetro. Las células son estimuladas a diferentes tiempos de incubación (30 minutos y 24h).

Posteriormente, se realiza una curva dosis-respuesta con el tiempo de incubación óptimo (30 minutos). Se observa que la producción de $O^{2\bullet}$ es dependiente de la dosis de H_2O_2 en las células H9c2.(figura 5)

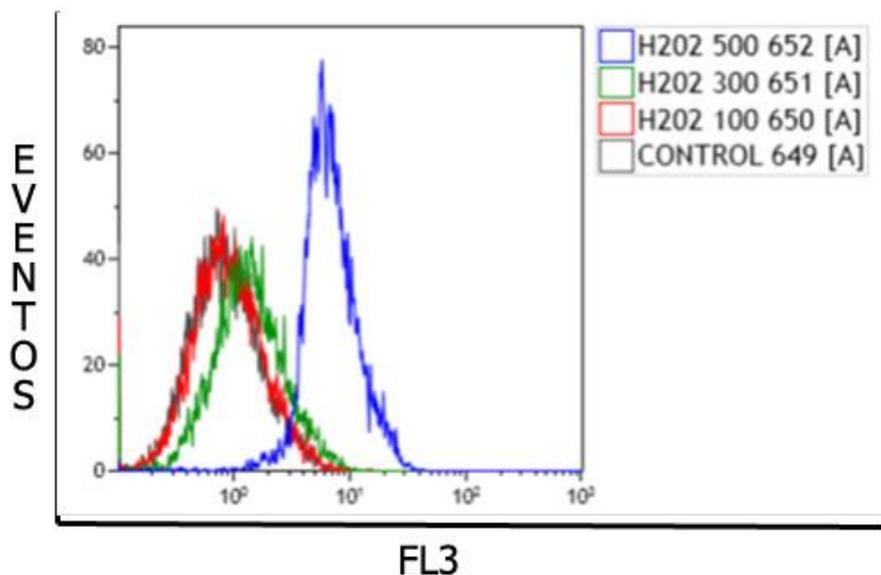


Figura 5. Curva dosis-respuesta realizada en la línea celular H9c2 a diferentes concentraciones de H_2O_2 (0, 100, 300 y 500 μM) incubadas durante 30 minutos y marcada con DHE para analizar mediante citometría de flujo.

Por otro lado, el anión superóxido mitocondrial se cuantifica por mediación de la sonda Mitosox Red. Utilizando la dosis de 500 μM , se realiza una cinética a tiempos corto y largo (30 min. y 24h) con la sonda. Como ocurre con DCFH-DA y DHE, se ve una alta respuesta a tiempo de incubación corto, por lo que ese tiempo es el que se elige para posteriores experimentos con la sonda (figura 6). Tiempos menores de exposición de las células con el estímulo no perjudican tanto la viabilidad celular.

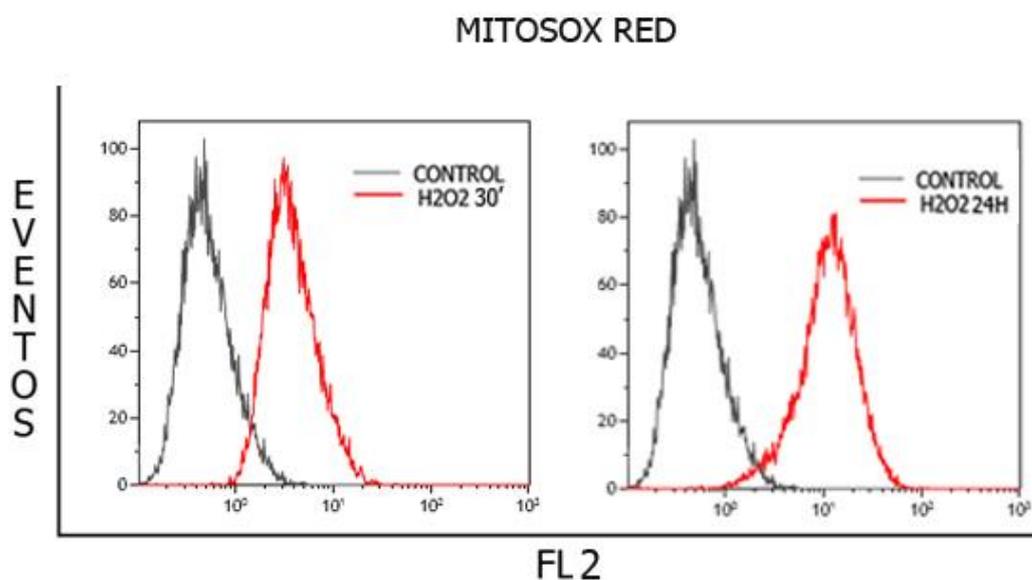


figura 6. Cinética del H_2O_2 en presencia de la sonda mitoSOX Red, que cuantifica el $\text{O}_2^{\bullet-}$ mitocondrial. Las células H9c2 se estimulan con H_2O_2 y a continuación se marcan con la sonda mitoSOX Red. Posteriormente se analizan mediante citómetro de flujo.

Alteración del potencial de membrana mitocondrial generado por el peróxido de hidrógeno en células cardíacas H9c2

Debido a que la sonda mitoSOX detectó alta cantidad de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en las mitocondrias de las células H9c2 estimuladas con H_2O_2 , y esto puede afectar a la integridad/funcionalidad de la membrana mitocondrial; a continuación nos planteamos evaluar el potencial de membrana mitocondrial. La consecuencia primaria de la apertura del poro transitorio mitocondrial (PTP) es la despolarización de la mitocondria por el fallo en el mantenimiento del potencial de membrana. (15).

Para medir el potencial de membrana mitocondrial se marcan las células con rodamina 123. Como en los casos anteriores, se realiza una cinética con 500 μ M de H₂O₂ a diferentes tiempos de incubación (1h., 3 h., 6 h., 24 h., y ON). Se ve que el tiempo de incubación es dependiente de la fluorescencia; a mayor tiempo de incubación, mayor pérdida de fluorescencia, y por tanto, mayor pérdida de potencial. Se elige el tiempo de incubación de 24h, para los posteriores experimentos, ya que es la que produce la mayor respuesta (figura 7).

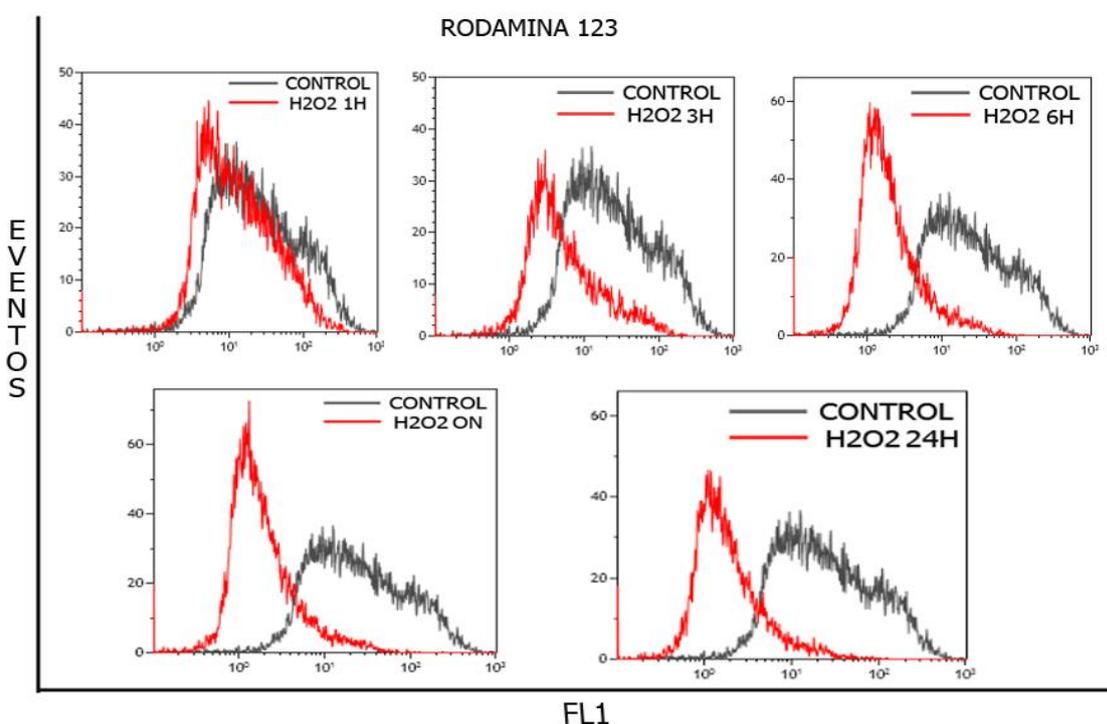


figura 7. Cinética del H₂O₂ en presencia de rodamina 123 a diferentes tiempos (1h., 3 h., 6 h., 24 h., y ON) analizado por citometría de flujo. En la figura se muestra pérdida de fluorescencia, directamente proporcional al tiempo de incubación.

Oxidación lipídica inducida por el peróxido de hidrógeno en células cardíacas H9c2

La producción de especies reactivas de oxígeno celulares, desencadenan en muchas cardiopatías la oxidación de biomoléculas, un ejemplo de ellas es la cardiolipina. La cardiolipina, es un fosfolípido de la membrana mitocondrial, altamente sensible a la oxidación por ROS. Para estudiar la oxidación de este fosfolípido, se utiliza la sonda NAO, que solo se une a la cardiolipina sin oxidar.

Las células se incuban con la sonda NAO, y a continuación se añade el estímulo a diferentes tiempos (1 h., 3 h., 6 h., 24 h., y ON). Así, se determinó que el tiempo óptimo de incubación es de 24h ya que se observa la mayor respuesta. Como se puede contemplar en la Figura 8, la fluorescencia es inversamente proporcional a la oxidación de la cardiolipina.

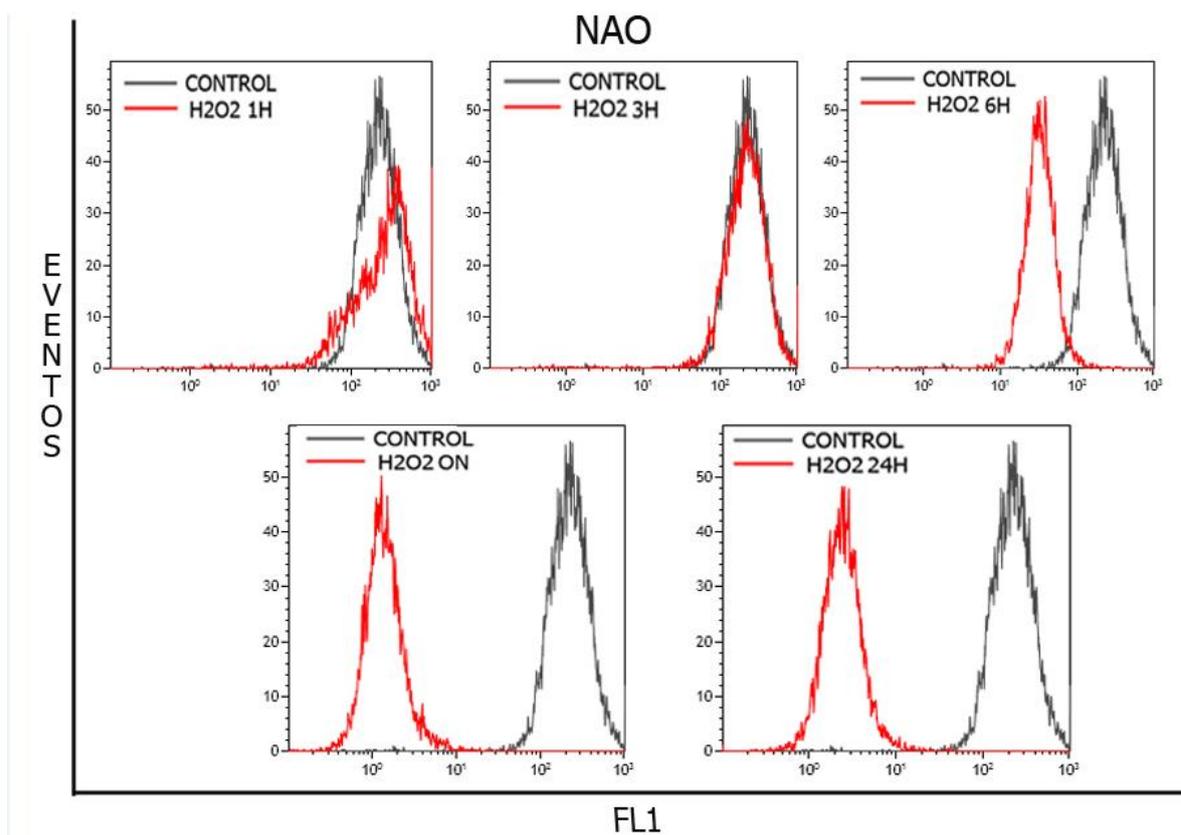


figura 8. Cinética del H₂O₂ en presencia NAO a diferentes tiempos (1 h., 3 h., 6 h., 24 h., y ON) Se muestra un aumento de fluorescencia, directamente proporcional al tiempo de incubación. Las células fueron analizadas mediante citómetro de flujo.

Inducción de apoptosis en células cardíacas H9c2 por el peróxido de hidrógeno

Una vez que se comprueba la formación de especies reactivas de oxígeno en la línea celular H9c2 en respuesta al H₂O₂, se quiere determinar las posibles funciones que podría realizar estos ROS. La presencia de ROS en patologías cardíacas se ha relacionado en muchas ocasiones con apoptosis. Por ello, para determinar si el H₂O₂

desencadena apoptosis en las células H9c2, se realiza un experimento con la anexina V conjugada con PE. Esta sonda fluorescente se une a la fosfatidil serina externalizada, que en situación fisiológica se encuentra localizada exclusivamente en la monocapa interna de la membrana plasmática. Sin embargo, en apoptosis este fosfolípido se externaliza y se hace accesible para la Anexina V que se une específicamente a él.

El procedimiento experimental comienza con la realización de una cinética de incubación con 500 μM de H_2O_2 a tiempos 1h, 3h, 6h, 24h y ON. Como se puede observar en la figura 9, la fluorescencia es dependiente del tiempo de incubación con el peróxido de hidrógeno. Por lo que se elige el tiempo de 24h para posteriores experimentos con inhibidores.

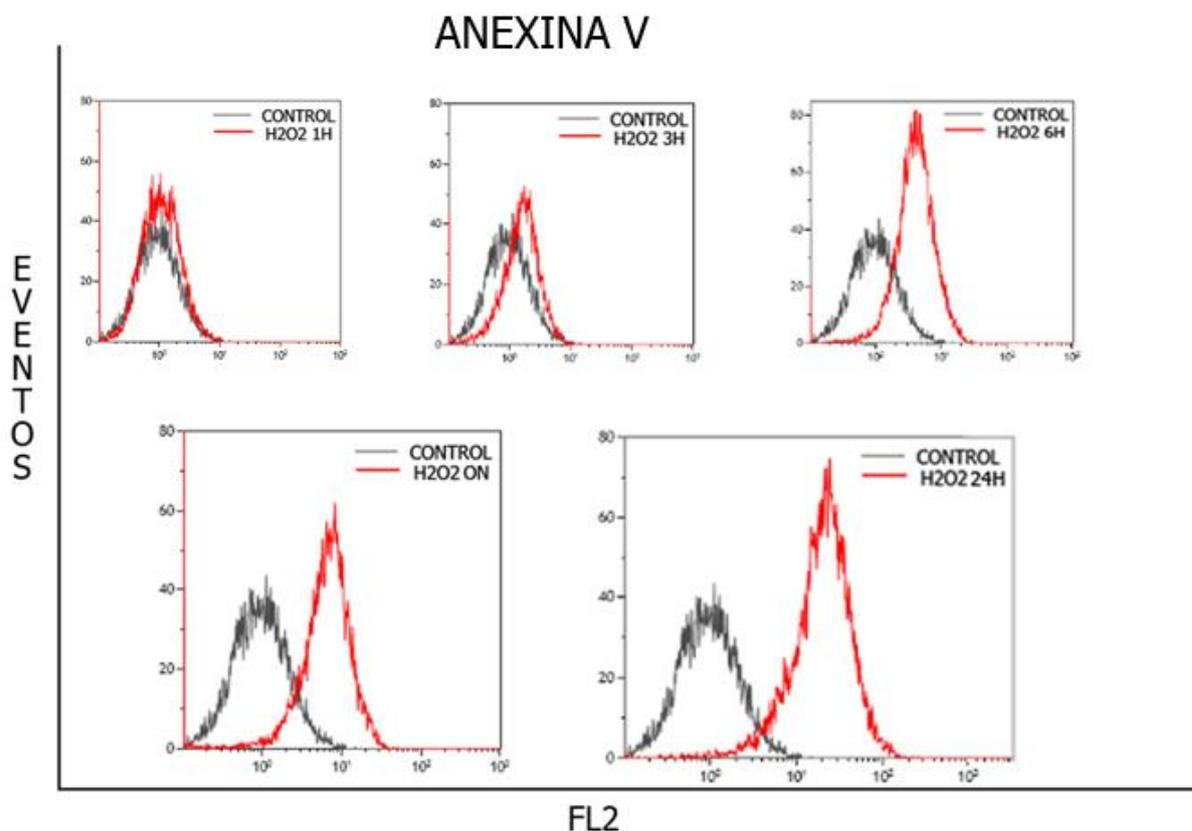


Figura 9. Cinética del H_2O_2 con Anexina V-PE a diferentes tiempos de incubación (1,3,6,24 y ON). A tiempos cortos no se observa una diferencia significativa entre el control y el estimulado con H_2O_2 . Cuando se incuba durante 24h el resultado es significativo, por lo que ese tiempo de incubación será el usado para posteriores experimentos con la sonda.

En segundo lugar, se realiza una curva dosis-respuesta para corroborar que 500 μM es la dosis óptima de estímulo. Con este objetivo, las células se incuban a diferentes dosis (100, 300 y 500 μM) de H_2O_2 . Como se observa en la figura 10, la fluorescencia es dependiente de la dosis, con lo que el citómetro capta mayor fluorescencia a mayor dosis de estímulo, es decir, con dosis altas hay mayor cantidad de células apoptóticas.

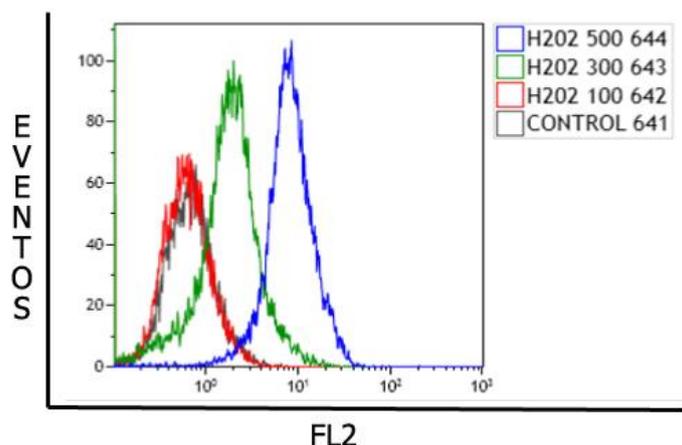


Figura 10. Curva dosis-respuesta realizada en la línea celular H9c2 a diferentes concentraciones de H_2O_2 (0, 100, 300 y 500 μM) incubadas durante 24h y marcada con AnexinaV-PE para el análisis mediante citometría de flujo.

Efecto de los ROS intracelulares sobre los procesos de apoptosis en células cardíacas H9c2

Una vez que se ha observado que el peróxido de hidrógeno produce ROS y desencadena apoptosis, se quiso determinar si estos ROS están implicados en la apoptosis inducida por el H_2O_2 . Para ello se utilizaron distintos inhibidores de especies reactivas de oxígeno.

Primero, las células se pretrataron con ácido oleanólico, un posible antioxidante en estas células. En estudios previos del laboratorio, con experimentos *in vivo* en el modelo de MAE (figura 1 A), el tratamiento con este ácido muestra una reducción significativa de la cantidad de H_2O_2 producidos. Por lo tanto, se quiere comprobar si este triterpeno también actúa eficazmente reduciendo los niveles de ROS *in vitro*, en la línea celular H9c2.

Con este objetivo, se realizan experimentos con la línea celular H9c2, en presencia o ausencia de ácido oleanólico con las diferentes sondas detectoras de ROS usadas anteriormente (DCFH-DA, DHE y Mitosox Red). Así, las células son pretratadas con ácido oleanólico a diferentes concentraciones (1, 5, 10 μM), 30 minutos antes de que sean estimuladas con 500 μM de H_2O_2 . Los resultados muestran que la disminución de ROS es directamente proporcional al aumento de la concentración del AO, siendo la concentración de 10 μM la que produce una reducción drástica de los niveles de ROS. La fluorescencia detectada en estos casos, es casi similar al control basal. Además, la dosis de 5 μM de AO, es efectiva en la reducción de los niveles de anión superóxido medidos con la sonda DHE (figura 11).

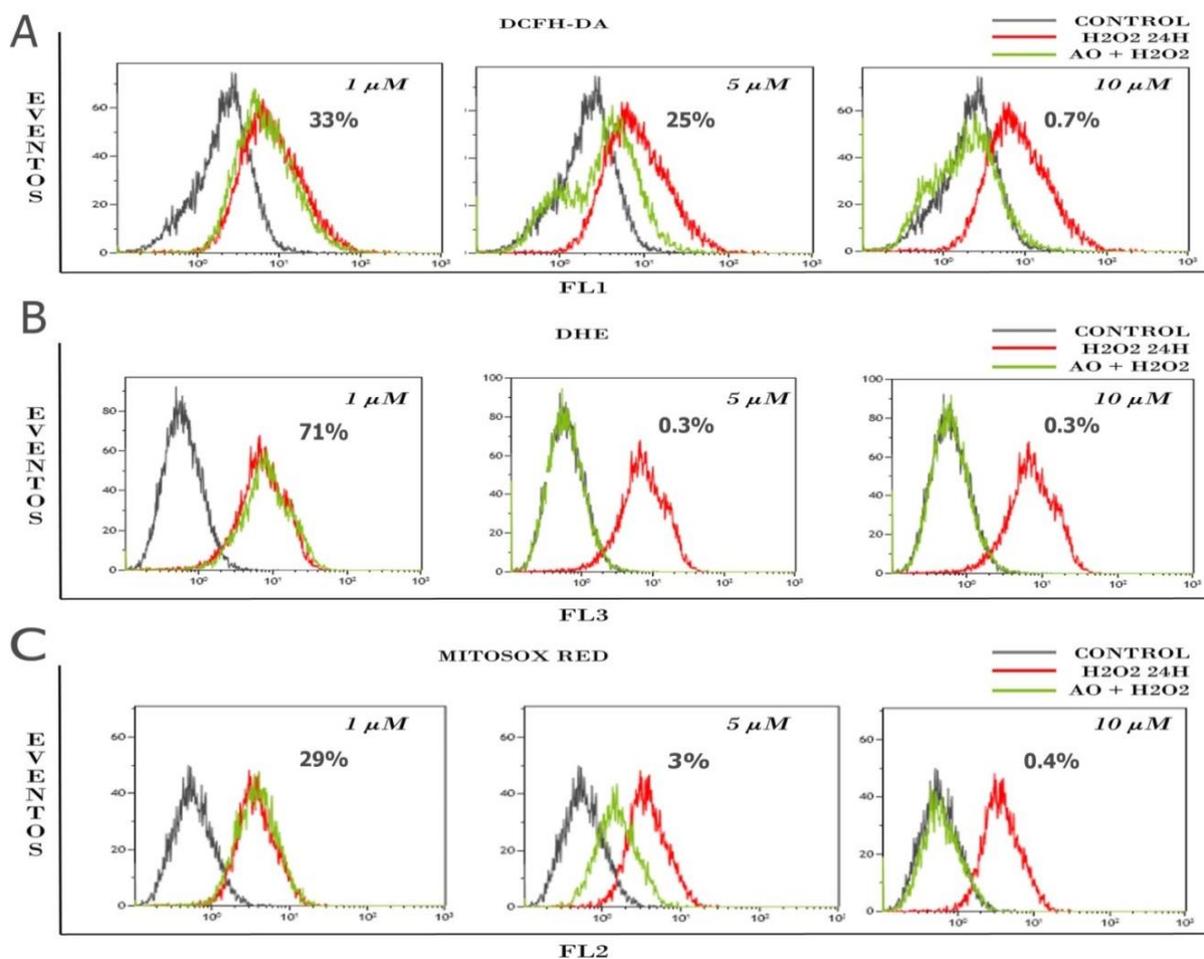


figura 11. Análisis con las distintas sondas de ROS, con ácido oleanólico. Las células se pretrataron con AO a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 μM) durante 30 minutos. A) Las células marcadas con la sonda DCFH-DA son pre-incubadas con AO y posteriormente estimuladas con H_2O_2 . B) Las células pretratadas con AO y estimuladas con H_2O_2 son marcadas con DHE. C) Las células son pretratadas con AO y estimuladas con H_2O_2 , por último se marcan con mitoSOX Red. Todas las células son analizadas por citometría de flujo.

Con posterioridad, estudiamos si el ácido oleanólico también reduce la despolarización mitocondrial, la oxidación de la cardiolipina y la apoptosis temprana. Para ello, se realizan experimentos en las células estimuladas con H₂O₂, en ausencia o presencia de AO. En la figura 12 se muestra que la dosis de 5 y 10 μM de AO reduce drásticamente la despolarización mitocondrial y apoptosis temprana, mientras que solo la dosis de 10 μM reduce la oxidación de la cardiolipina asemejándose al control.

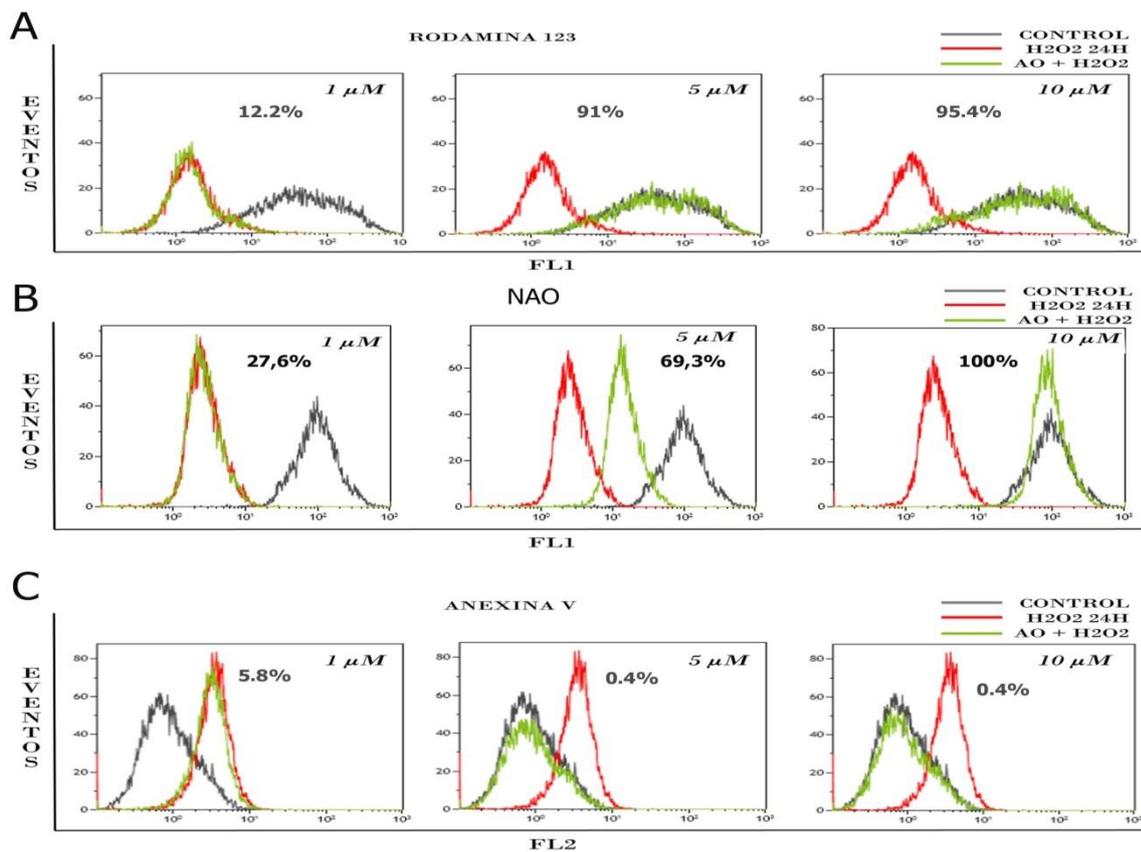


Figura 12. Análisis de las células H9c 2 pretratadas con AO a diferentes concentraciones (1,5 y 10 μM) durante 30 minutos. A) las células fueron marcadas con rodamina 123, pretratadas con AO y estimuladas con H₂O₂. B) células marcadas con NAO. C) Marcaje con Anexina V-PE. Todas las células son analizadas por citometría de flujo.

Por otro lado, para caracterizar las vías de producción de ROS celular, se realizaron experimentos con inhibidores selectivos de determinadas enzimas importantes en la producción de ROS. Los dos inhibidores son el alopurinol y el DPI. El alopurinol inhibe la Xantina oxidasa, que constituye una importante fuente de anión superóxido. En estudios clínicos el uso de este fármaco ha demostrado disminuir el consumo de oxígeno miocárdico. Mientras que el DPI inhibe la enzima NADPH celular evitando la producción de especies reactivas de oxígeno.

Las células son pretratadas durante 30 minutos con diferentes dosis de estos dos inhibidores enzimáticos, alopurinol (10, 50 μM) y DPI (5 y 20 μM), y posteriormente se estimulan otros 30 minutos con 500 μM de H_2O_2 . Con la máxima concentración de inhibidor, los niveles de ROS intracelular disminuyen drásticamente hasta hacerse similares al control (figura 12).

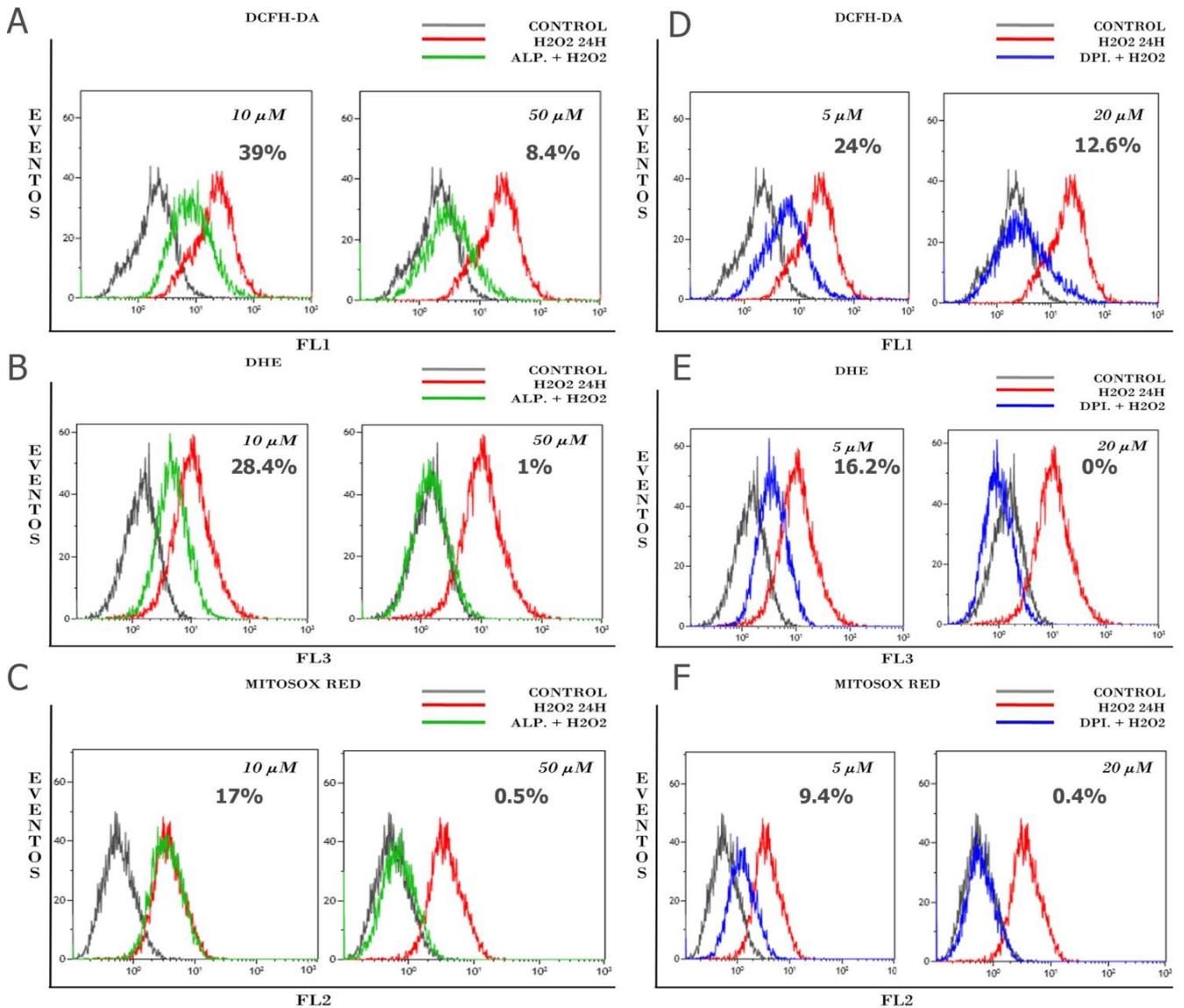


figura 13. Análisis de las células H9c2 pretratadas con inhibidores de ROS a diferentes concentraciones. A, B y C muestran el pretratamiento con Alopurinol. D, E y F exponen el pretratamiento con DPI. Se realizaron experimentos con DCFH-DA, DHE y mitoSOX red. Las células son analizadas por citometría de flujo.

Finalmente, con el objeto de examinar la producción de ROS en la mitocondria y su funcionalidad; se hicieron experimentos con los inhibidores rotenona y mitoTEMPO. La rotenona, es un compuesto químico, usado como insecticida, que inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones.

El curso experimental comienza con el pretratamiento de las células durante 30 minutos con rotenona (1, 10 μM). Posteriormente se incuban 30 minutos con H_2O_2 500 μM . Para la determinación de la producción de ROS, se marcan las células con las sondas Mitosox, DHE y DCFH-DA y se analiza en el citómetro de flujo.

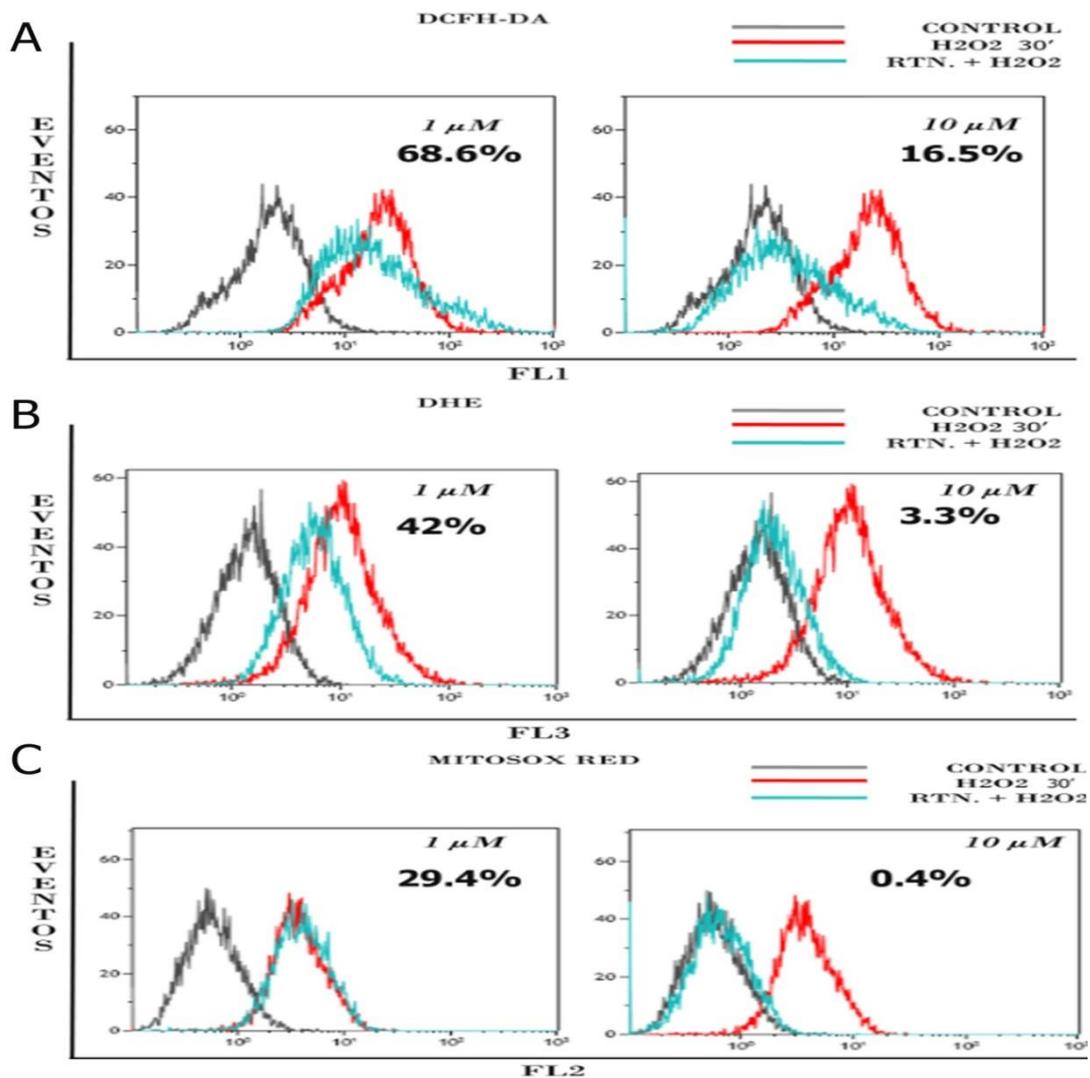


Figura 14. Análisis de las células H9c2 pretratadas con rotenona a diferentes concentraciones. Pretratamiento con rotenona (1, 10 μM) durante 30 minutos, antes de la estimulación con H_2O_2 . Se analizó la producción de ROS, con las diferentes sondas y mediante citometría de flujo.

Como se observa en la gráfica, las células pretratadas con rotenona muestran una disminución de las especies reactivas de oxígeno, observada por una reducción en la fluorescencia, mas drástica cuando se utiliza la concentración máxima. (figura 14).

Afirmada la reducción de los ROS en presencia de rotenona, se quiere saber si este inhibidor, también reduce la despolarización mitocondrial y la apoptosis celular. Las células se pretratan con rotenona(1, 10 μ M) y se estimulan con 500 μ M de H₂O₂ durante 24 h, después, son analizadas por citometría de flujo. La figura 15 A muestra un aumento drástico de la fluorescencia cuando las células son pretratadas con la máxima concentración de rotenona. Sin embargo la figura 15B muestra una disminución de la fluorescencia, similar a la del control, cuando las células son pretratadas con la concentración alta. Ambos resultados demuestran que la rotenona inhibe la despolarización mitocondrial y la activación de la apoptosis.

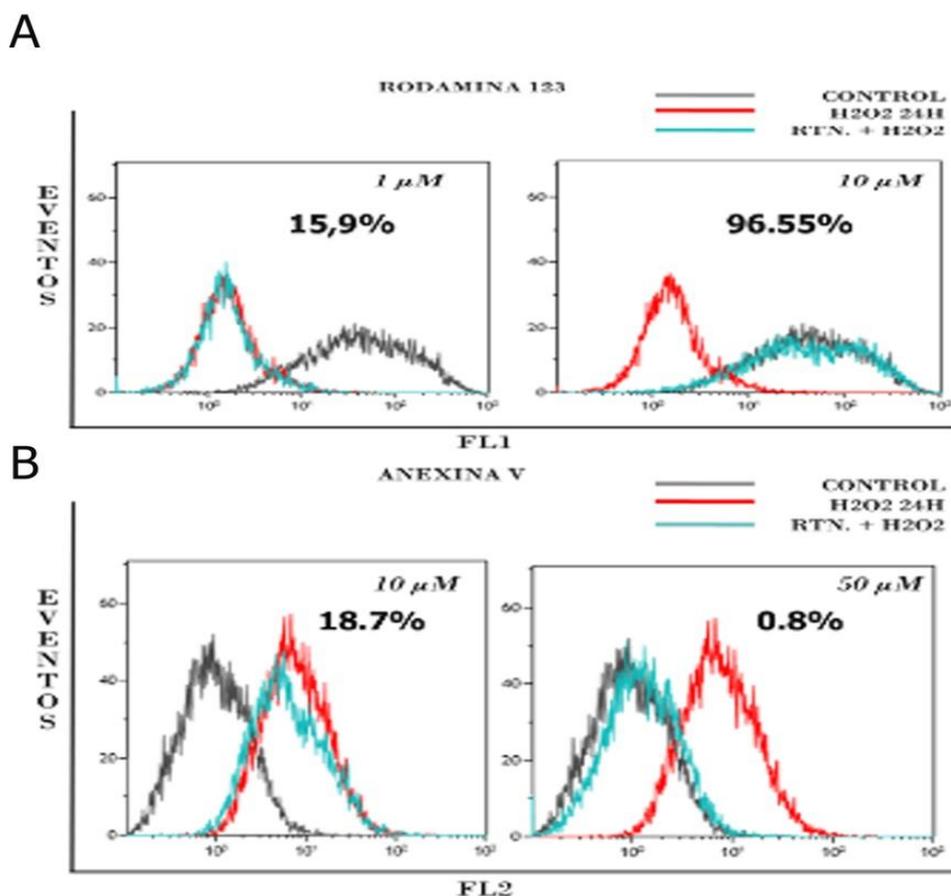


Figura 15. Análisis de las células H9c2 pretratadas con rotenona a diferentes concentraciones (1, 10 μ M) durante 30 minutos, antes de la estimulación con H₂O₂ y marcadas con rh123 y anexina V.

Por otro lado, se utiliza el mitotempo, antioxidante mitocondrial cargado positivamente que se concentra en la matriz de la mitocondria y actúa allí como un eliminador de especies reactivas del oxígeno (16). Este antioxidante se usa a concentraciones de (10, 50 μM) y se incubó 30 minutos antes de la estimulación con H_2O_2 . Primeramente se quiso saber si este compuesto químico, inhibe la producción de ROS, para ello se marcan las células con las distintas sondas (DCFH-DA, DHE y mitoSOX red). Como se muestra en la gráfica el inhibidor elimina casi por completo los ROS celulares con la concentración máxima en los tres casos (figura 16). Además reduce eficientemente los niveles de $\text{O}^{2\bullet}$ captados con DHE a concentración de 10 μM (figura 16B)

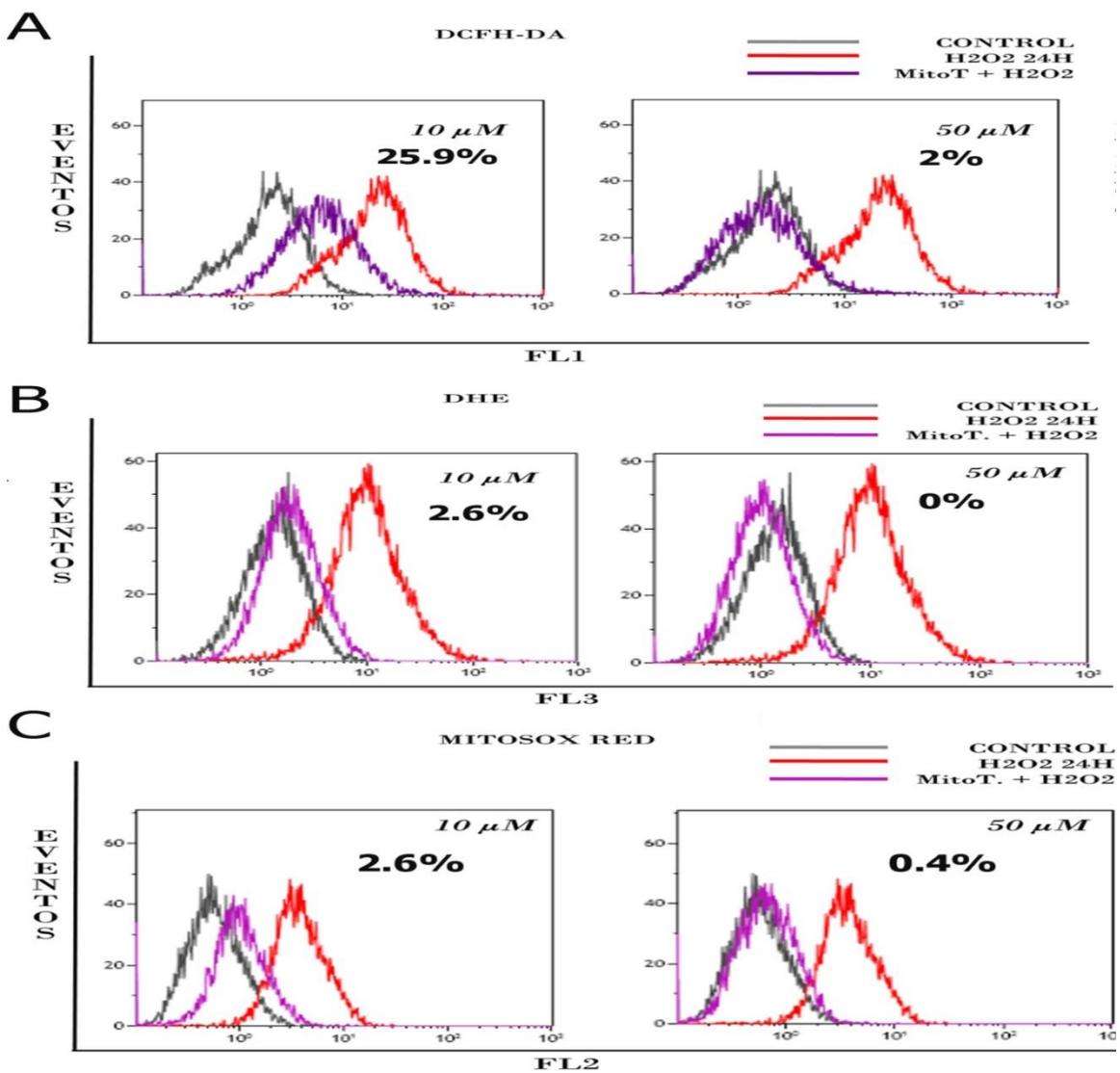


Figura 16. Análisis de las células pretratadas con mitotempo, a diferentes concentraciones. Las células se pretrataron con mitotempo (10 y 50 μM) durante 30 minutos y se marcan con sondas que determinan ROS celular.

Determinada la reducción de ROS por el inhibidor, se realiza el mismo procedimiento, marcando las células con Rh123, NAO y Anexina V. Como se observa en la figura 17 sólo a concentraciones altas, se inhibe eficazmente A) la despolarización de la membrana mitocondrial, B) la oxidación de cardiolipina y C) la activación de apoptosis celular.

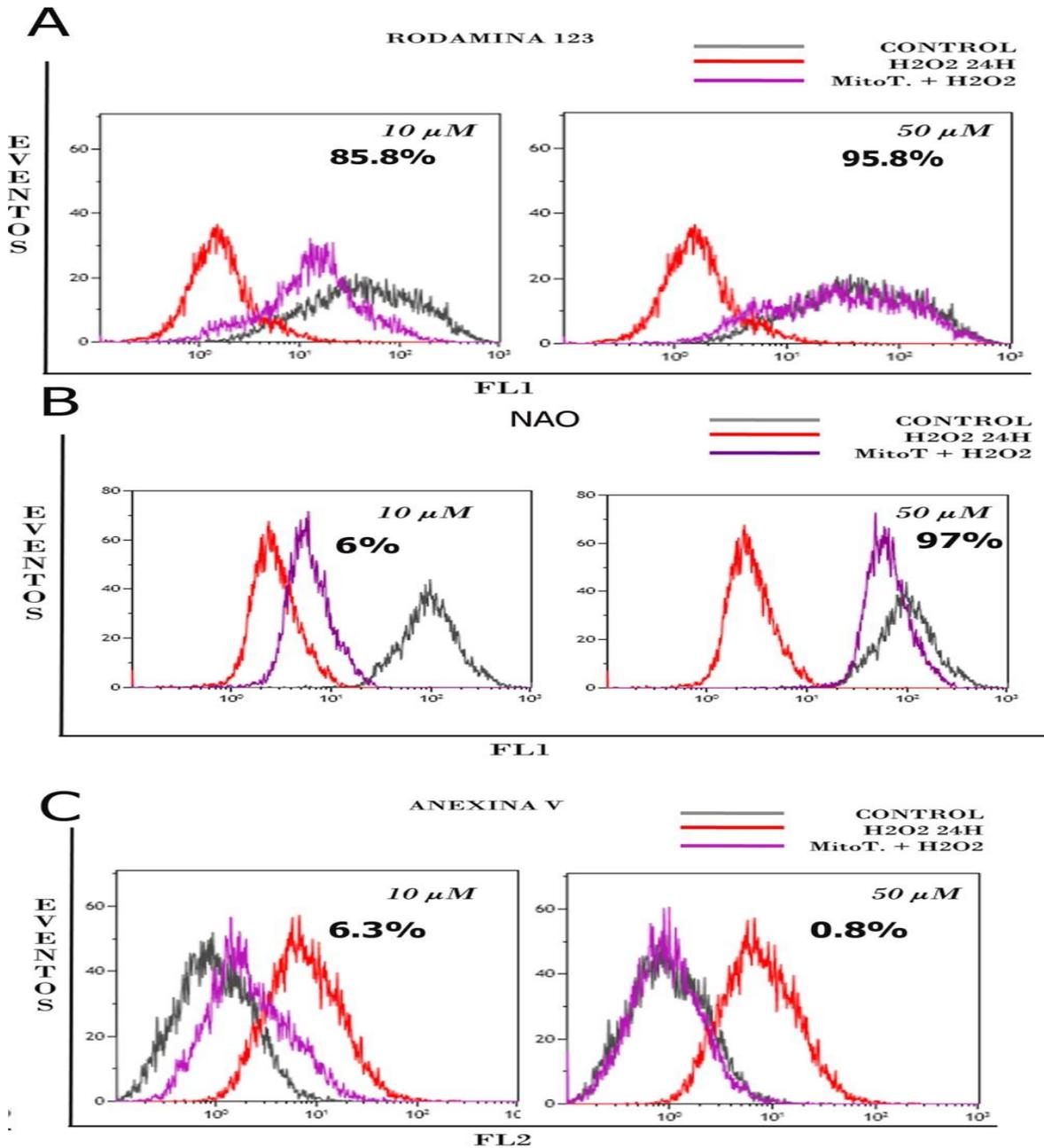


Figura 17. Análisis de las células H9c2 pretratadas con mitotempo, a diferentes concentraciones. Las células se pretrataron con mitotempo (10 y 50 μ M) durante 30 minutos. Análisis con las diferentes sondas de Rh123, NAO y Anexina V analizadas por citometría de flujo.

Por último, se realizaron experimentos de microscopía de fluorescencia mediante la tinción celular con las sondas DHE y NAO anteriormente utilizadas en citometría. Así se obtuvieron algunas imágenes representativas de los experimentos realizados con el citómetro de flujo. Se seleccionó como inhibidor el ácido oleanólico, por la reducción del estrés oxidativo en el modelo animal.

Las fotos muestran un aumento de la fluorescencia de la sonda DHE cuando son tratadas con H_2O_2 , y una disminución de la fluorescencia cuando las células son pretratadas con AO. En el caso de la sonda NAO la fluorescencia se pierde cuando las células son estimuladas con H_2O_2 , recuperándose cuando estas son pretratadas con AO (figura 18).

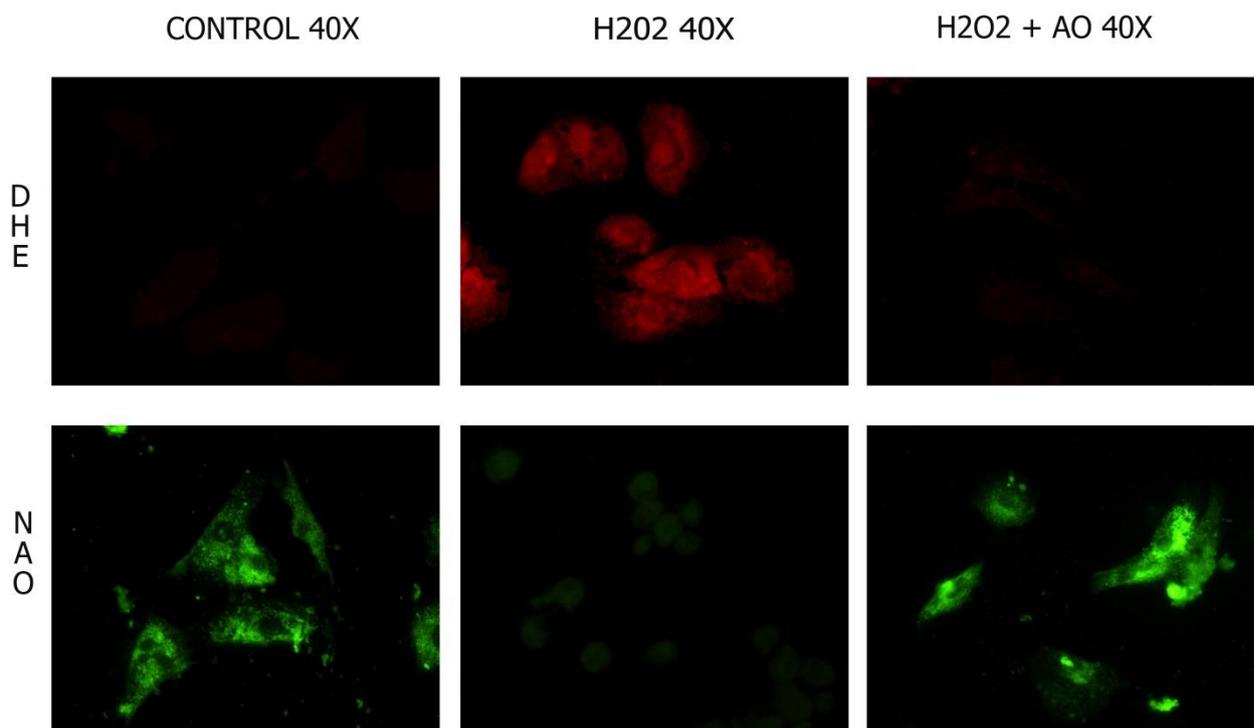


Figura 18. Análisis mediante microscopía de fluorescencia de las células marcadas con DHE y NAO. Las células se estimulan con H_2O_2 en presencia o ausencia de AO (10 μ M). Imágenes representativas de la preparación, con el objetivo de 40X.

DISCUSIÓN

Estudios previos con la línea celular H9c2 expuesta a H_2O_2 muestran un aumento significativo del estrés oxidativo intracelular (17, 18, 19). En consonancia con estos resultados, en este estudio, se contempla una producción de especies reactivas de oxígeno debido a la estimulación de las células con H_2O_2 . Las células estimuladas muestran un aumento de la fluorescencia debido a la oxidación de las 3 sondas que miden las especies reactivas de oxígeno celulares (DCFH-DA, DHE, mitoSOX Red), con respecto a las células que no son tratadas con este estímulo.

Adicionalmente, se ha descrito que la apoptosis inducida por H_2O_2 está relacionada con el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ i produciendo un cambio de homeostasis y en consecuencia, la activación de la apoptosis(20). En particular, en nuestro estudio, se deduce una clara relación entre la estimulación con peróxido de hidrógeno, la despolarización de la mitocondria y la activación de la apoptosis, cuando las células son marcadas con rodamina 123, NAO y AnexinaV (figuras 7, 8 y 9).

En numerosos estudios la sonda NAO ha sido utilizada como una herramienta para cuantificar la carga mitocondrial y la oxidación de la cardiolipina (21,22). Sin embargo, otros autores han observado que la acumulación de la sonda en la mitocondria, es claramente dependiente del potencial de membrana mitocondrial (23). Por lo tanto, si NAO también depende del potencial de membrana, no se puede determinar que la reducción de la fluorescencia observada en este estudio, sea debida exclusivamente a la oxidación de la cardiolipina, si no que puede deberse a la despolarización de la membrana mitocondrial.

En un estudio reciente con sesamol, se ha observado que este compuesto fenólico natural reduce los niveles de ROS en las células H9c2(24). Este hallazgo abre un campo de investigación a productos de origen natural como posibles fármacos para enfermedades cardiovasculares, como la miocarditis. Así, el ácido oleanólico, triterpeno natural, ha mostrado tener actividad antioxidante en el modelo experimental murino de miocarditis ya que reduce los niveles de H₂O₂ generados en el tejido cardíaco de los animales MAE tratados con OA, con respecto a los no tratados (25). Estudios realizados en estas células, demuestran que el pretratamiento con el triterpeno reduce drásticamente la producción de ROS y la apoptosis celular (figura 11 y 12).

Diversos estudios preclínicos de patologías inflamatorias han mostrado las propiedades beneficiosas del AO: i) En el modelo de ratones con encefalomiелitis experimental (EAE), parece que el tratamiento con AO antes o al inicio de la EAE, mejora los signos neurológicos de estos ratones (26); ii) En modelos de ratones con conjuntivitis alérgica (EAC), se descubrió que el tratamiento con AO limita la degranulación de los mastocitos y la infiltración de eosinófilos en el tejido conjuntivo (27); iii) En ratones diabéticos tratados con AO mejoran su enfermedad, teniendo este AO un potencial antidiabético alto (28). Los resultados aquí encontrados permiten hipotetizar en el uso del AO como posible fármaco para el tratamiento de algunas patologías en las que el estrés oxidativo tenga un papel relevante.

Por otro lado, las enzimas xantina oxidasa y NAD(P)H oxidasa, enzimas importantes en el metabolismo celular, juegan un papel fundamental en la producción de ROS en las células H9c2. Cuando las células son pretratadas con sus respectivos inhibidores (alopurinol y DPI), y posteriormente estimuladas con H₂O₂, la fluorescencia que detectan las sondas de ROS disminuye hasta asemejarse al control (figura 13). En este sentido, se ha descrito que la inhibición de la xantina oxidasa mediada por el alopurinol, demuestra ser eficaz en algunos casos de enfermedades cardiovasculares, ya que reduce los niveles de ROS (29). Por otro lado el pretratamiento con el DIP, inhibe casi completamente el aumento de fluorescencia captada por DCFH-DA inducido por doxorubicina en células H9c2 (30).

En relación con otro de los objetivos experimentales, las células estimuladas con H_2O_2 fueron pretratadas con inhibidores mitocondriales. Los resultados obtenidos, sugieren que la cadena de transporte de electrones es la mayor formadora de los ROS celulares y que podría desencadenar la apoptosis intrínseca de origen mitocondrial. El pretratamiento con rotenona, que inhibe el complejo I mitocondrial, reduce drásticamente i) la producción de ROS, ii) la despolarización celular y iii) la apoptosis temprana (figura 15). Existen trabajos previos donde las células H9c2 marcadas con luminol/HRP y pretratadas con rotenona muestran poca quimioluminiscencia de ROS en la mitocondria (31).

Este resultado, consecuencia del uso de rotenona como inhibidor de ROS, es similar al obtenido en células H9c2 pretratadas con mitoTEMPO, el cual reduce drásticamente los niveles de ROS mitocondriales, corroborando la idea de la producción de ROS en la cadena de electrones y la activación de la apoptosis vía mitocondrial. Estudios anteriores de otros autores, demuestran que mitoTEMPO preserva parcialmente la integridad de la membrana mitocondrial y atenúa la necrosis y apoptosis debido a la prevención de la transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial (32). Por otro lado, estudios en ratones, han mostrado que el tratamiento con mitoTEMPO reduce 1,1 veces los niveles de ROS en comparación con los ratones control ($P=0,45$)(33).

Finalmente, se ha descrito que el aumento de ROS desencadena la vía intrínseca mitocondrial de apoptosis en cardiomiocitos mediante la activación de la ruta PI3K/Akt en H9c2 (34). En este estudio, el uso de inhibidores mitocondriales, lleva a la conclusión del desencadenamiento de la apoptosis vía mitocondrial, dato que se apoya en la despolarización de la membrana(rh123), uno de los primeros sucesos que desencadena la formación del poro transitorio mitocondrial, y la inhibición de la fluorescencia de la anexina cuando se trata con mitoTEMPO y rotenona. Por otro lado se quiere estudiar la ruta metabólica que se activa tras la inducción con H_2O_2 , experimentos no completados por falta de tiempo.

CONCLUSIONES:

Se puede concluir, por tanto, que el peróxido de hidrógeno está desencadenando producción de ROS en la línea celular H9c2. Además existe una relación significativa de la producción de ROS con la xantina oxidasa y la NADH deshidrogenasa, porque bloqueando estas enzimas con antioxidantes se reducen drásticamente los niveles de ROS. Lo mismo sucede cuando se usan inhibidores mitocondriales, por lo tanto, parece que es en la mitocondria, donde se producen los ROS, los cuales están desencadenando apoptosis vía intrínseca en las células. Finalmente en este experimento también se puede concluir que el tratamiento con AO reduce considerablemente los niveles de ROS celulares, y por tanto la apoptosis celular; con lo que podría ser un posible fármaco, que ayude a mejorar las lesiones producidas por la miocarditis.

REFERENCIAS:

1. Rose N. and Kaya Z. (2014) Chapter 70 - Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy Las Enfermedades Autoinmunes (Quinta Edición) páginas 1033-1048
2. Appel DA. , Avedissian L., Burke AP., Castillo-Rojas LM., Eckart RE., Gentlesk PJ., Huffer L., McNear JA., Pearse LA., Potter RN., Reich SS., Shry EA., Stevenson WG. and Tremaine L. (, 2011,September) Sudden death in young adults: an autopsy-based series of a population undergoing active surveillance Elsevier 13;58(12):1254-61
3. Rose NR. (2014, May) Learning from myocarditis: mimicry, chaos and black holes F1000Prime Rep; 6:25.
4. Caforio A., Mahon N., Mackenna W and Tona F. (2002, August) circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. European Journal of Heart Failure. Volumen 4, issue 4. Pages 411-417.
5. Alfonso F., Ballester M., Castro A., , Fernández R., Galve E, Penas M. and Sánchez J. (2000) Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en miocardiopatías y miocarditis Rev Esp Cardiol Vol. 53 Núm.353:360-93
6. Chen K. and Keaney J. (2012, october) Evolving Concepts of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease current atherosclerosis reports NIH Public Access 14(5): 10.1007/s11883-012-0266-8
7. Hoppel CL., Kim J., Minkler and Paul E (2011, january) cardiolipin: characterization of distinct oxidized molecular species Journal of lipid research American Society for Biochemistry and molecular Biology. 52(1): 125-135
8. Hemann C., Velayutham M., and Zweier JL., (2011, July) removal of H₂O₂ and generation of superoxide radical: Role of cytochrome C and NADH. Free radical biology & medicine 51(1: 160-170)
9. Castilho RF., De Souza-Pinto NC., Kowaltowski AJ. And Vercesi AE. (2009, august) Mitochondria and reactive oxygen species. El sevier. 47(4):333-43
10. Jing G., Jingman X., Shuxia C., Wei T., 1 Xiangbo G., Ya W. Yujie S., Yulan J., Zhelong X. and Zhimei H. (2013, june) Imaging of reactive oxygen species burst from mitochondria using

laser scanning confocal microscopy. *Microscopy Research and Technique* Volume 76, issue 6, pages 612-617.

11. se supone que era esta página, pero está vacía.
12. Gogvadze V., Orrenius S., Ott M., Robertson JD., and Zhivotovsky B (2002, January) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;99(3):1259-63.
13. Lebel P., Ischiropoulis H and Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicos* 5: 227-231
14. Wang H and Joseph JA (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612-616.
15. Lopategui I., Herrera A. (2010, Marz) papel crucial de la mitochondria en la muerte celular programada. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas «Victoria de Girón». Ciudad de La Habana, Cuba.
16. Liu H., Dudley S., (2010, October) *Reactive oxygen Species Originating from Mitochondria Regulate the cardiac Sodium Channel.*
17. Shih-Rong H., Wei-Cheng C., and Ying-Ming L.(2014) *Molecular identification for epigallocatechin-3-gallate-mediated antioxidant intervention on the H2O2-induced oxidative stress in H9c2 rat cardiomyoblasts.* *Journal of Biomedical Science.* 21(1): 56
18. Dong-hun K., Hyung-Oh J and Kyu-Won K., (2011, January) *Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 β signaling pathway.* *Experimental & molecular Medicine* 43(1): 53-61
19. Oyama K., Sakurai K., and Takahashi K.(2009, november) *Cardiomyocyte H9c2 Cells Exhibit Differential Sensitivity to Intracellular Reactive Oxygen Species Generation with Regard to Their Hypertrophic vs Death Responses to Exogenously Added Hydrogen Peroxide.* *Journal of clinical biochemistry and nutrition.* 45(3)361-369.
20. Goto S., Ihara Kondo T. And Y., Urata Y.,(2006, January) *Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide.* *American Journal of Physiology.* Vol. 290no.

21. Guo-Xing Z., Hiroko M., Kijo M., Kijo O., Miyako T. and Shoji K. Inhibition of cytochrome c release by 10-N-nonyl acridine orange, a cardiolipin-specific dye, during myocardial ischemia-reperfusion in the rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. Vol. 298no.
22. Birke RL., Dowhan W., Haines TH., Lutterodt L., Mileykovskaya E. And Zheng D. (2001, October) *Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces*. El sevier. 507(2):187-90
23. Duchen M., Heales S. And Jacobson J.(2002) *Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass*. *Journal of Neurochemistry*. 82, 224–233
24. Bansal P., Kutty NG., Nayak PG., Pai KS and Paul P (2013, July)*Sesamol prevents doxorubicin-induced oxidative damage and toxicity on H9c2 cardiomyoblasts*. *J Pharm Pharmacol* 65(7):1083-93
25. Cachafeiro V., Cordova C., Gutierrez B., Martin R., Nieto ML., and San Román JA. (2014, july) *Oleanolic acid modulates the immune-inflammatory response in mice with experimental autoimmune myocarditis and protects from cardiac injury. Therapeutic implications for the human disease*. *J Mol Cell Cardiol.* ;72:250-62.
26. Arnés M., Carvalho-Tavares J., Hernández M., Martín R., Nieto ML and Ruiz-Gutiérrez V. (2010 January) *Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role*. *Biochem Pharmacol*. Volume 79(2), pages: 198-208.
27. Córdova C., Gallego-Muñoz P., Hernández M., Martín R.,Martínez-García C Nieto ML and Gutiérrez B. (2014 April). *Oleanolic Acid Controls Allergic and Inflammatory Responses in Experimental Allergic Conjunctivitis*. Volume 9(4) e91282.
28. Chen HL., Hai CX., Liao N., Liu JZ., Li WL., Wang X., Yu WH., Zhang XD. and Zhang T., (2013 January-February). *Protective effect of oleanolic acid against beta cell dysfunction and mitochondrial apoptosis: crucial role of ERK-NRF2 signaling pathway*. *J Biol Regul Homeost Agents*. Volume 27(1) pages 55-67.
29. Rober AM and Robert L. (2014, January) *Xanthine Oxido-Reductase, Free Radicals and Cardiovascular Disease. A Critical Review*. *Pathology & Oncology Research* Volume 20, Issue 1, pp 1-10.

30. Altieri P., Ballestero A., Barisione C., Barsotti A., Brunelli C., Fabbi P., Garibaldi S., Ghigliotti G., Manca V. and Spallarossa P., (2005, August) Metaloproteinasas de matriz-2 y -9 se inducen de manera diferente por la doxorubicina en las células H9c2: El papel de las MAP quinasas y NAD (P) H oxidasa. *Oxford journals cardiovascular Research*. Vol 69, 3
31. Jiang M., Li Y., Shen H., Trush M.A., Wang G and Zhu H. (2009 February). In Situ Real-Time Chemiluminescence Imaging of Reactive Oxygen Species Formation from Cardiomyocytes. *Int J Biomed Imaging*. 2008: 941729.
32. Bosnjak Z., Ling Liang H, Nilakantan V and Sedlic F. (2010 August). SOD1 and MitoTEMPO partially prevent MPTP, necrosis and mitochondrial apoptosis following ATP depletion-recovery. *Free Radic Biol Med*. Volume 49(10):10.1016.
33. Arasu D., Dolmatova., Bonini M. G E., Duffy H.S., Gu L., Jeong E.M., Liu H., Rutledge C.A., Samuel C. Dudley S.C. Jr., Sovari A.A., Vahdani N., and Zandieh L.H (2013 April). Mitochondria Oxidative Stress, Connexin43 Remodeling, and Sudden Arrhythmic Death. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. Volume 6(3), pages: 623–631.
34. , Hua-Lei G., Li-He L., Wei-Kang W., Xiao-Dong Z., Xin-Xue L., Yan-Ling C. and Zhi-Wei X. (2013 January). Higenamine Combined with [6]-Gingerol Suppresses Doxorubicin-Triggered Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes via Upregulation of PI3K/Akt Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. Volume 2013 (2013), Article ID 970490, 14 pages.