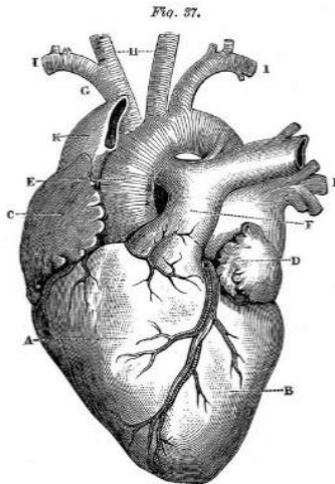


TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

CURSO 2022-2023

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE DAÑO CARDÍACO



LAURA PARIENTE MARTÍN

TUTORAS

DRA. MARÍA LUISA NIETO
DRA. MARITA HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y GENÉTICA MOLECULAR



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
INSUFICIENCIA CARDIACA	6
REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	7
RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	7
ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	9
RELACIÓN INFLAMACIÓN-OXIDACIÓN EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
MATERIALES	13
Anticuerpos	13
Reactivos	13
Estímulos	13
Software.....	13
MÉTODOS.....	14
Cultivo celular. Línea celular. H9c2.	14
Extracción de proteína	14
Cuantificación de proteína por BCA	15
Western Blot	15
Estudio del citoesqueleto mediante microscopía de fluorescencia.....	16
Ensayo ELISA.....	16
Kit de nitritos.....	16
Cinética de estrés oxidativo	16
Análisis estadístico	16
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Suero bovino fetal
H ₂ O mq	Agua mili-Q
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
IC	Insuficiencia cardiaca
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
LPS	Lipopolisacárido
ON	<i>Overnight</i>
P/S	Penicilina-estreptomicina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
TLR	Receptor tipo Toll (" <i>Toll like receptor</i> ")
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral
TNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TTBS	Tween-Tris-buffered saline
WB	Western blot

RESUMEN

La insuficiencia cardíaca es un síndrome clínico heterogéneo que supone un problema de salud a nivel global. En esta patología se han reconocido mecanismos de inflamación, estrés oxidativo y apoptosis, por lo que nos proponemos caracterizar la línea celular H9c2 de cardiomioblastos y diferentes estímulos para generar un modelo *in vitro* que nos permita emular estas condiciones en el laboratorio. Estudiamos además si se producen cambios en el citoesqueleto como consecuencia de dichas alteraciones metabólicas. Tras los estudios comprobamos que los estímulos para estudiar el perfil inflamatorio, LPS y TNF α , no son capaces de poner en marcha las rutas de señalización esperadas, mientras que el estímulo mimético de hipoxia, CoCl $_2$, sí que es capaz de activar la línea de cardiomiocitos. Sería necesaria la realización de más experimentos para una completa caracterización y uso del modelo propuesto para el estudio de la insuficiencia cardíaca *in vitro*.

Palabras clave: Insuficiencia cardíaca, cardiomiocitos H9c2, CoCl $_2$, LPS, TNF α , inflamación, estrés oxidativo y apoptosis.

ABSTRACT

Heart failure is a heterogeneous clinical syndrome that represents a global health problem. In this pathology, mechanisms of inflammation, oxidative stress, and apoptosis have been recognized. Therefore, our goal is to characterize the H9c2 cardiomyoblast cell line and different stimuli to generate an *in vitro* model that allows us to emulate these conditions in the laboratory. We also investigate whether changes occur in the cytoskeleton because of these metabolic alterations. After conducting the studies, we found that the stimuli used to study the inflammatory profile, LPS and TNF α , are unable to activate the expected signaling pathways, while the hypoxia-mimicking stimulus, CoCl $_2$, is capable of activating the cardiomyocyte line. Further experiments would be necessary for a complete characterization and utilization of the proposed model for the study of *in vitro* heart failure.

Keywords: heart failure, cardiomyocytes H9C2, CoCl $_2$, LPS, TNF α , inflammation oxidative stress and apoptosis.

INTRODUCCIÓN

INSUFICIENCIA CARDIACA

La insuficiencia cardiaca (IC) es un síndrome clínico, heterogéneo, caracterizado por la reducción de la capacidad cardiaca para bombear o recibir sangre, ocasionado por un trastorno estructural o funcional. (1,2) En 1997 es definida como pandemia (3), y actualmente es un problema de salud pública ya que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en países industrializados, con una estimación de 64.3 millones de afectados en 2017. (4) La hipertensión, la diabetes, el sedentarismo, la hiperlipidemia y el tabaquismo son algunos de los factores de riesgo de este síndrome, mediados por una enfermedad coronaria, o directamente asociados a IC. (1,5) Los síntomas cardinales de la IC son disnea, fatiga, intolerancia al ejercicio y retención de líquidos y pueden ir acompañados de signos como presión venosa yugular elevada, crepitantes pulmonares, edema periférico o ascitis. Estos signos y síntomas son inespecíficos y para un correcto diagnóstico se requiere de la realización de pruebas clínicas que los justifiquen. (6,7)

La IC se considera un síndrome complejo y multifactorial, porque puede verse como la etapa crónica de cualquier patología que conduce a un deterioro de la función cardíaca, lo que dificulta asignarle una causa específica. Gran parte de los pacientes que sufren IC padecen multimorbilidad, es decir, es común la coexistencia de diversas causas, que comparten una serie de factores de riesgo con la IC y tienen un papel en la patogénesis del síndrome, esta comorbilidad se asocia a una mayor gravedad de los síntomas, y se asocia con una peor calidad de vida y con un peor pronóstico. (5) Algunas de las causas subyacentes que pueden contribuir al desarrollo de este síndrome, son las que aparecen en la **Tabla 1**. (1,7)

Tabla 1. Causas que contribuyen al desarrollo de la insuficiencia cardiaca.

Causa	Ejemplos de presentación
Enfermedades cardiovasculares	Cardiopatía isquémica Enfermedad valvular y reumática
Hipertensión	Insuficiencia cardiaca con función sistólica preservada
Factores infecciosos	Virus de Chagas Miocarditis viral Enfermedad de Lyme
Fármacos y sustancias químicas	Inhibidores del sistema inmune Inhibidores de proteasoma Antraciclinas
Tratamientos anticancerígenos	Quimioterapia Radioterapia

La incidencia y la prevalencia de la IC varían geográficamente en función de diversos factores culturales, sociales, económicos, personales e interpersonales. (5,8) En términos generales, se estima que la prevalencia a nivel global es del 4.2% en la población general, alcanzando el 11.8% en personas mayores de 65 años (4) y se calcula que actualmente la incidencia es de 1-20 casos por cada 1000 personas por año. (1). En España, la prevalencia en pacientes mayores de 18 años es del 1.89%, mientras que en pacientes octogenarios alcanza el 9%, por otro lado, la incidencia del país en 2019 fue de 2.78 casos por cada 1000 personas y año. (9)

Se cree que tanto la prevalencia, como la incidencia de la IC aumentarán como resultado de la mayor esperanza de vida, y el aumento de la población mundial, pero de forma paralela disminuirán debido a la mejora de la supervivencia tras un diagnóstico de IC, junto con la disponibilidad de tratamientos o el mejor manejo de la enfermedad (1,2,4,7,10).

Debido a su gran impacto a nivel global, la investigación en el ámbito clínico de este síndrome tiene una gran relevancia. Numerosos estudios han demostrado que la IC se caracteriza por una inflamación sistémica persistente, que puede estar relacionada con el estrés oxidativo entre otros mecanismos. (11). Debido a la gran importancia de estos procesos metabólicos en el desarrollo de este síndrome, dedicaremos unas secciones propias a la inflamación y la oxidación.

REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La arquitectura del citoesqueleto de las células cardíacas está adaptada para soportar la carga de trabajo del corazón y debe ser capaz de adecuarse a condiciones de estrés como el deporte, la hipertensión o las lesiones isquémicas. (12)

En pacientes con cardiopatías se observa aumento en los niveles de tubulina total, de la red de microtúbulos, de la expresión de MAP estabilizadores, de la detirosinación de los microtúbulos y acetilación, y una marcada regulación positiva de los filamentos intermedios. En la IC avanzada junto con la densificación de microtúbulos y filamentos intermedios, a menudo se produce la pérdida de contenido y organización de actomiosina. (12) Además, se ha comprobado que el estrés oxidativo es una fuerza impulsora de cambios del citoesqueleto celular que acompaña a la remodelación cardíaca. (13)

Una alteración de los niveles de ROS puede afectar de forma directa a la función contráctil de las células cardíacas al modificar proteínas centrales para el acoplamiento de excitación-contracción. También estimulan la proliferación de fibroblastos cardíacos y activan las metaloproteinasas de matriz, lo que conduce a la remodelación de la matriz extracelular. Estos eventos celulares están implicados en el desarrollo y la progresión del remodelado miocárdico desadaptativo y la IC. (2)

RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La inflamación es una respuesta adaptativa desencadenada por diversos estímulos y condiciones nocivas, como las infecciones o las lesiones tisulares. Por lo general, una respuesta inflamatoria controlada es beneficiosa, pero puede volverse perjudicial si no se regula. (14)

La inflamación sistémica ha sido reconocida como una característica patobiológica común de la IC, en concreto se ha vinculado al desarrollo, progreso y complicaciones del síndrome. (15) Se ha observado que los pacientes que padecen IC presentan elevados niveles de endotoxinas y citocinas inflamatorias en circulación, entre las que se encuentran $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ o $IL-6$, este aumento de mediadores inflamatorios está relacionado directamente con el deterioro funcional y de rendimiento cardíaco. (11)

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los TLR juegan un papel crucial en la activación de este sistema. El TLR con mayor expresión en el corazón es TLR4, y contribuye a la inflamación de miocardio característica de IC y otras patologías cardíacas. (15,16) Los PRR se expresan en la superficie de los cardiomiocitos y

reconocen ligandos específicos denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). (15)

Cuando los DAMPs o PAMPs activan TLRs se inicia una cascada de señalización que resulta en la activación del inflammasoma NLRP3 y la expresión de numerosos genes proinflamatorios como TNF α e IL-6, y factores de transcripción como NF κ B. **Figura 1.** A corto plazo, son respuestas citoprotectoras, pero a largo plazo son desadaptativas y participan en el reclutamiento de células inflamatorias y en el remodelado cardíaco adverso. (15,17)

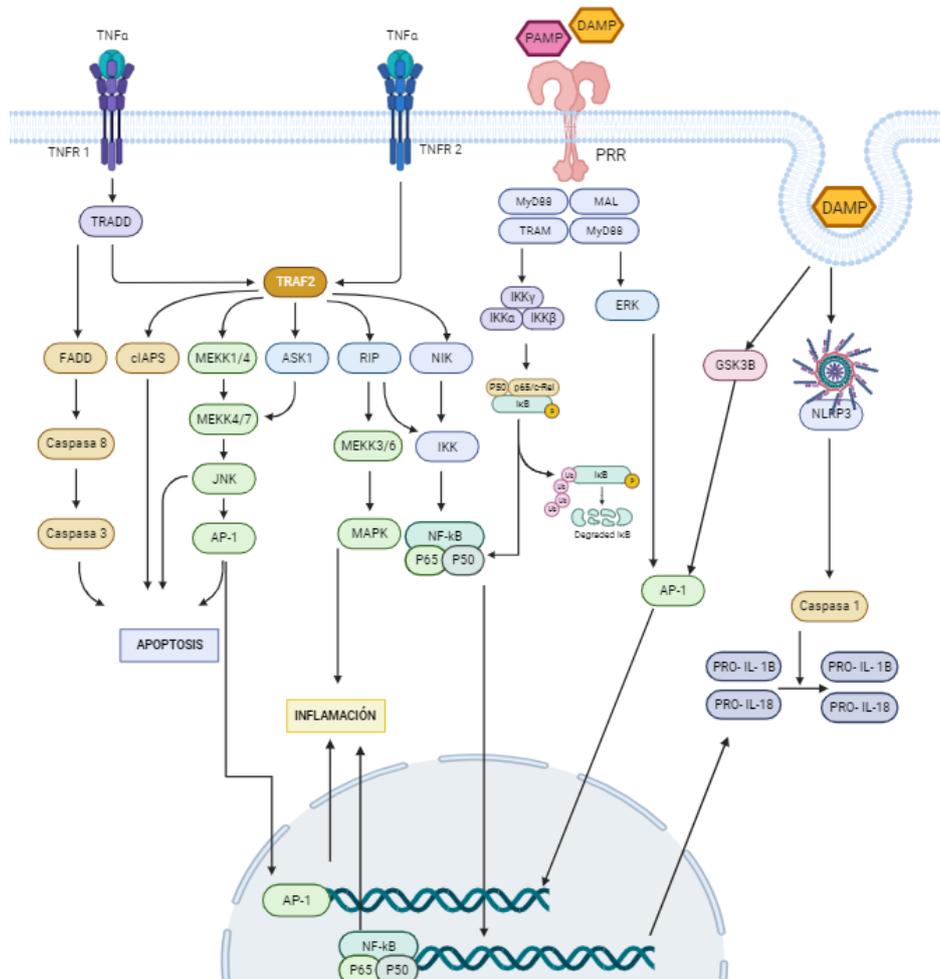


Figura 1. Vía de señalización de inflamación y apoptosis de TNF α y LPS a través de PRR. Modificado a partir de (18,19)

La IC está asociada con una función epitelial intestinal alterada, lo que deriva en un aumento de la permeabilidad epitelial y una reducción de la absorción, permitiendo que bacterias y endotoxinas como el LPS se transloquen a la circulación sistémica, induciendo o agravando el estado de inflamación crónica asociado a IC, afectando indirectamente la función de los cardiomiocitos y derivando en una disfunción cardíaca irreversible. Se ha observado que los pacientes con IC tienen una mayor cantidad de bacterias fecales patógenas y una mayor densidad de bacterias adheridas a la mucosa del colon, lo que se asocia con la permeabilidad intestinal. (21)

El LPS es un componente tóxico e inmunogénico de las bacterias Gram-negativas que entra en la circulación sistémica a través del tracto intestinal y es uno de los PAMPs que puede activar los PRR. (15). La activación de TLR4 por LPS induce la puesta en marcha

de varias vías que participan en la producción de factores inflamatorios que, a su vez, actúan sobre los cardiomiocitos. (15,22–24)

Los niveles de LPS en sangre se correlacionan directamente con la inflamación sistémica en pacientes con IC descompensada y disminuyen una vez se ha compensado. (20) Existe una evidencia considerable de que la sepsis inducida por LPS altera la integridad endotelial y la homeostasis vascular. (25) Múltiples estudios han demostrado que los niveles circulantes de LPS se incrementan con la edad probablemente debido a una disfunción de la barrera intestinal. (26)

El TNF α es una de las principales citocinas inflamatorias, tiene efectos bidireccionales en función de sus receptores, impide la apoptosis de los cardiomiocitos induciendo señales cardioprotectoras o puede empeorar el pronóstico y desarrollo, por lo que se hipotetiza que ejerce un efecto funcional distinto a través de sus dos receptores, TNFR1 y TNFR2. (27) La sobreproducción de citocinas proinflamatorias, como TNF α o IL6 puede derivar en muerte de los cardiomiocitos y por consiguiente disfunción miocárdica. (20) El TNF α induce hipertrofia de los cardiomiocitos, activa metaloproteinasas y neutraliza los inhibidores de estas, lo que resulta en fibrosis miocárdica. (15) Se han observado valores elevados de TNF α en el plasma de pacientes con insuficiencia cardíaca, lo que sugiere que las citocinas inflamatorias podrían estar involucradas en la fisiopatología del síndrome.(28)

ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Numerosos estudios han demostrado que la IC se caracteriza por una inflamación sistémica persistente de causa desconocida, aunque se han propuesto numerosos mecanismos para justificarla, entre los que se encuentra el estrés oxidativo. Ensayos clínicos y experimentales proporcionan evidencia sólida que el estrés oxidativo y la isquemia están involucrados en el desarrollo y progresión de la IC, ya que inducen citocinas inflamatorias como TNF α , a través de la producción de ROS con activación secundaria del factor de transcripción NF κ B. (2,11,29)

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) llevan a cabo funciones de señalización y mantenimiento de la homeostasis en el corazón sano, pero una producción excesiva y desregulada de estas moléculas puede promover el estrés oxidativo y por consiguiente daño en los cardiomiocitos. (30) El estrés oxidativo se puede definir como la producción excesiva de ROS/RNS en relación con los mecanismos antioxidantes de defensa. (31) El exceso de ROS produce disfunción celular, peroxidación de lípidos y proteínas, daños en el ADN, y puede derivar en un daño irreversible y muerte celular. ROS activa una red de quinasas de señalización de hipertrofia y factores de transcripción que participan en la apoptosis. (2) Además, ROS induce un déficit energético al afectar la función de las proteínas implicadas en el metabolismo energético. (31)

La hemo-oxigenasa 1 (HO-1), es una enzima inducible por numerosos estímulos, entre los que se encuentran oxidantes, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, metales pesados y causas físicas como la isquemia o la hipoxia y es especialmente sensible a estímulos prooxidantes. Varios estudios clínicos han confirmado que HO-1 protege a las células del estrés oxidativo y la inflamación y mantiene la integridad y función mitocondrial promoviendo la supervivencia celular. Además, debido a la regulación del metabolismo del hierro, HO-1 también desempeña un papel relevante en la ferroptosis, como se puede apreciar en la **Figura 2**. (32–34)

RELACIÓN INFLAMACIÓN-OXIDACIÓN EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La inflamación y el estrés oxidativo son dos mecanismos estrechamente relacionados en la IC. La lesión por isquemia aumenta la producción de ROS que a su vez activa la respuesta inflamatoria, activando diversas vías metabólicas celulares y promoviendo la expresión de mediadores inflamatorios, produciendo un estado inflamatorio que favorece la remodelación cardíaca y la IC. Debido a su estado proinflamatorio intrínseco, la IC se caracteriza por elevados niveles de mediadores inflamatorios circulantes como $TNF\alpha$. La sobreexpresión de esta proteína daña el ADN mitocondrial e inhibe los factores antioxidantes aumentando así la producción de ROS. (30,35) Además, estos dos procesos metabólicos están muy relacionados con procesos de muerte celular.

Se ha demostrado que la ferroptosis está altamente relacionada con la muerte de cardiomiocitos. La ferroptosis es una de las formas de muerte celular dirigida, regulada de manera ROS-dependiente asociada con dos características bioquímicas principales, la acumulación de hierro y la peroxidación lipídica (36–38) Las ROS inducidas por estrés oxidativo producen la activación de peroxidación lipídica, lo que deriva en muerte celular por ferroptosis, que resulta en la producción de DAMPs por parte de las células dañadas, lo que promueve una inflamación estéril que deriva en la activación de $NF\kappa B$. Por otro lado, GPX4, actúa como regulador principal de la ferroptosis, inhibiendo este proceso por inhibición de la oxidación del ácido araquidónico e inhibiendo las rutas inflamatorias que se han activado. Además, los procesos de isquemia/reperfusión están acompañados de disfunción mitocondrial, peroxidación lipídica e inflamación, además de muerte celular ferroptótica, que resulta en daño tisular, daño neurológico y fallo cardíaco que puede ser reducido por inhibición de ferroptosis aumentando los niveles de GSH, GPX o quelantes de hierro. (39) **Figura 2.**

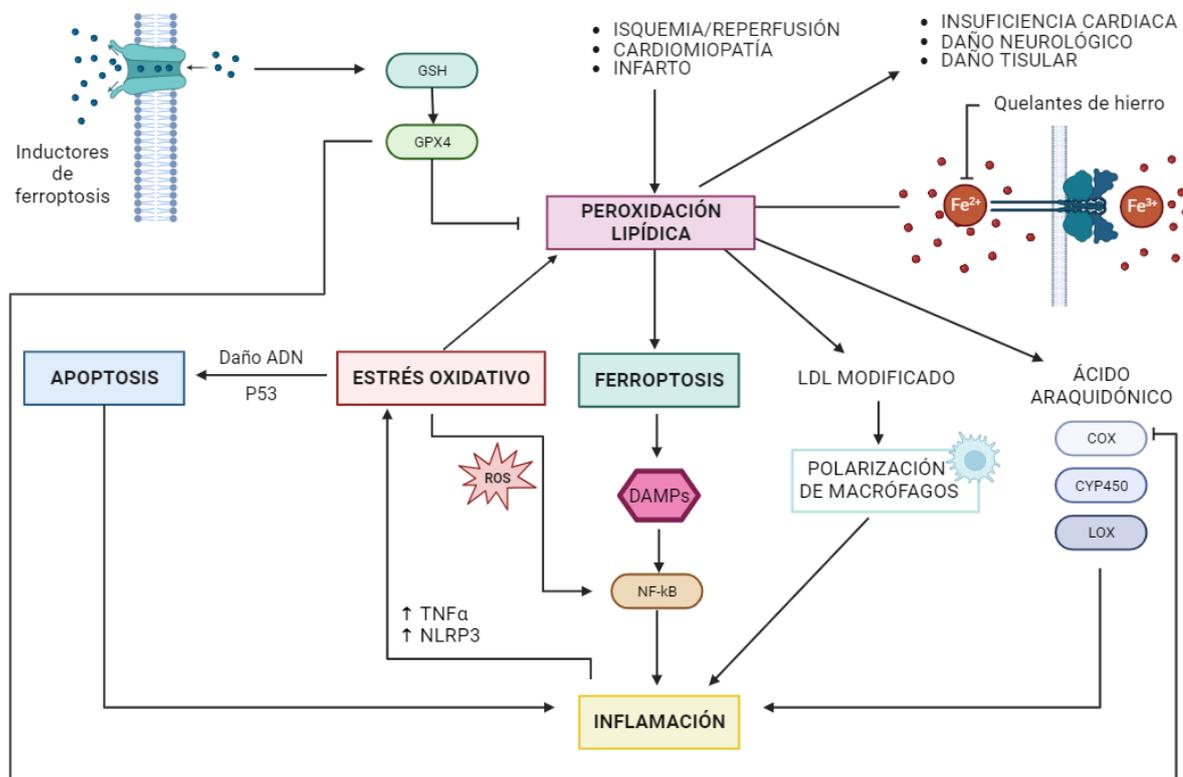


Figura 2. Esquema de la relación de las vías de inflamación y estrés oxidativo con distintos tipos de muerte celular. Modificado a partir de (30,40).

Además de ferroptosis, la inflamación y el estrés oxidativo derivan en otro tipo de muerte celular, la apoptosis. La apoptosis o muerte celular programada es el proceso altamente conservado por el cual una célula deja de crecer y dividirse y entra en un proceso que finaliza con la muerte controlada de la célula, sin expulsar su contenido al medio extracelular, es un proceso asociado a un conjunto de cambios bioquímicos y físicos que involucran el citoplasma, el núcleo y la membrana plasmática. (40). **Figura 3.**

El comienzo de este proceso depende de la activación en respuesta al daño celular de una cascada de proteasas denominadas caspasas, que resulta en la fragmentación del ADN por activación de endonucleasas que destruyen proteínas nucleares y el citoesqueleto. (41,42). El estrés oxidativo puede inducir la apoptosis de los cardiomiocitos por activación de la vía extrínseca, contribuyendo a la hipertrofia cardíaca y a la disfunción contráctil. (30)

Para detectar el daño producido en el ADN podemos utilizar γ -H2AX como biomarcador. H2AX es un factor clave en el proceso de reparación del ADN dañado, en presencia de este, es fosforilado en el residuo de serina 139 y es cuando pasa a denominarse γ -H2AX. (43)

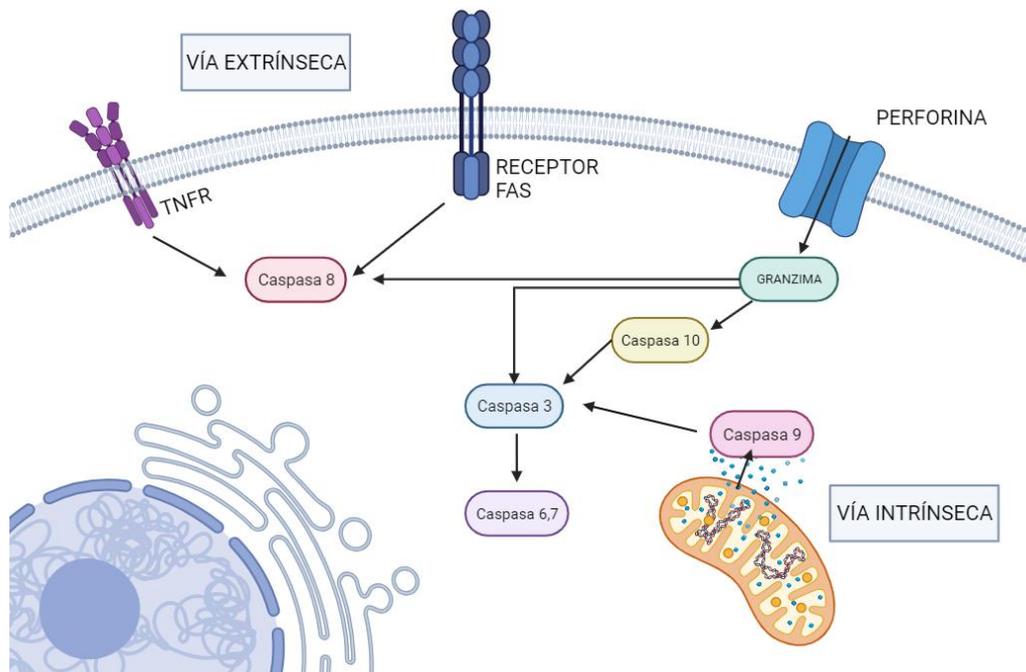


Figura 3. Vías de señalización de la apoptosis y cascada de caspasas. Modificado a partir de(44).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los procesos inflamatorios y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la insuficiencia cardíaca, por ello en esta investigación trabajamos en la optimización del cultivo de la línea celular H9c2 para desarrollar un modelo *in vitro* capaz de emular condiciones de inflamación y estrés oxidativo en células cardíacas mediante la estimulación de estas con CoCl₂, LPS y TNF α .

OBJETIVOS

Considerando esta información, los objetivos de este estudio son:

- Estudio del efecto de diversos estímulos en la expresión de proteínas pertenecientes a rutas relacionadas con la inflamación, el estrés oxidativo y la apoptosis en cardiomioblastos H9c2.
- Estudio del funcionamiento de la línea celular H9c2 en condiciones de estrés oxidativo.
- Estudio de posibles alteraciones del citoesqueleto al someter a los cardiomioblastos a condiciones de inflamación y estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Anticuerpos

Anticuerpo primario	Referencia	Casa comercial	Concentración
Caspasa-3	9664S	Cell Signaling	1:1000
HO-1	Spc-112	Stress marq	1:1000
NF-κB-p65	Sc-8008	Santa Cruz	1:1000
Paxilina	610051	BD Transduction Laboratories™	1:1000
Phosphohistone	H2AX-S139	ABclonal	1:1000
β-actina	A5441	Sigma	1:30000

Anticuerpo secundario	Referencia	Casa comercial	Concentración
Anti-Mouse	NA9310	Cytiva	3,5 µl en 5 mL de TTBS
Anti-Rabbit	NA9340	Cytiva	3,5 µl en 5 mL de TTBS
Alexa fluor 546 anti-mouse	A21123	Thermo fisher	10 µg/mL

Reactivos

Reactivos	Referencia	Casa comercial	Técnica
BSA	A3059	SIGMA	Western Blot
DMEM	15-013-CV	CORNING	Cultivos celulares
Faloidina FITC	D5282	Sigma-Aldrich	Microscopía de fluorescencia
FBS	-	Gibco	Cultivos celulares
H ₂ O ₂	-	Merk Milipore	Western Blot
TBS	SC-2333	SANTA CRUZ	Western Blot
TEMED	T-8133	SIGMA	Western Blot
Tripsina/EDTA	25200-072	Gibco	Cultivos celulares

Estímulos

Estímulos	Referencia	Casa comercial	Dosis
CoCl ₂	C8661	SIGMA	600 µM 800 µM
LPS	L2630	SIGMA	5 µg/mL 10 µg/mL
TNFα	13343016	INMUNOTOOLS	20 ng/mL 40 ng/mL

Software

- BioRender
- GraphPad Prism 8.3.0
- Image J
- Microsot Excel
- Word
- Zotero

MÉTODOS

Cultivo celular. Línea celular. H9c2.

H9c2 es la primera línea celular derivada de corazón establecida mediante pases en serie de células del ventrículo cardiaco de corazón embrionario de rata (*Rattus norvegicus*) en la década de 1970. (45). En esta investigación trabajamos con el subclon H9c2(2-1) (Elabscience, Catalog No.: CL-0089 Lote: L860324022014), mioblastos de miocardio adherentes de gran tamaño, mononucleares, planos y fusiformes. **Figura 4.**

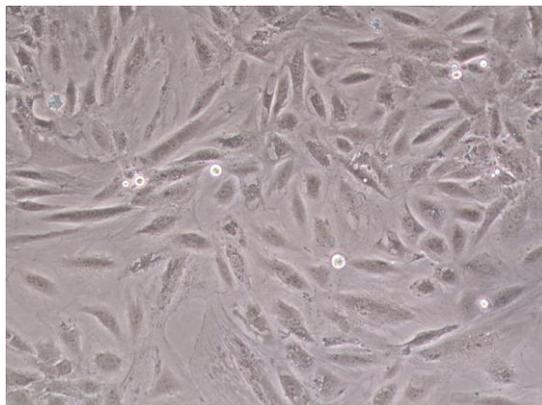


Figura 4. Línea celular H9c2.

Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo de 75 cm² en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con L-glutamina 1%, glucosa 4.5g/L y piruvato sódico (1%), y fue suplementado adicionalmente con Suero Bovino Fetal (FBS) 10% inactivado por calor, y una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (P/S) (10000 U/mL) al 1%. Las células fueron incubadas en aire humidificado en atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C. El medio de cultivo se reemplazó cada 2-4 días, cuando las células alcanzaron una confluencia de entre el 70-80%, para ello, se añaden 3 mL de Tripsina/EDTA 0.25% para despegar las células del frasco de cultivo, cuando se observa que se han levantado se pasan a un nuevo frasco de cultivo de 75 cm² entre 1:2 o 1:4 de los 3 mL de tripsina (0,6-1,5). Los experimentos se llevaron a cabo con células entre los pases 3-26. Para la realización de los experimentos, una vez obtenida la confluencia celular deseada, el medio es reemplazado por medio DMEM sin suero o con 1% de FBS, según el experimento, para 4h después estimular las células y dejar *overnight* (ON) en el incubador.

Extracción de proteína

Las células H9c2 se sembraron en placas de cultivo de 60mm (P60) con 3 mL de medio DMEM completo por placa, y se incubaron hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 70-80%, una vez obtenida esta confluencia se reemplazó el medio por 2 mL de medio DMEM con FBS 1% durante 2-4h. Transcurrido este tiempo se añaden los estímulos: LPS (5 µg/mL, 10 µg/mL), TNF α (20 ng/mL, 40 ng/mL), o CoCl₂ (600 µM, 800 µM) y se deja ON en el incubador.

Recogemos 1 mL de sobrenadante que se utilizará en ensayos ELISA. Las células se lavaron dos veces con tampón PBS frío, y se extrajeron utilizando RIPA con un cóctel de inhibidores de proteasas (10 µL/mL PFSF, 0,2 µL/mL AP, 1 µL/mL LP, 20 µL/mL NaF, 5 µL/mL Na₃VO₄ y 4 µL/mL EDTA) al que posteriormente se añade Buffer Laemmli 5x. Se hierve 5 minutos a 100°C y se pasa dos veces por una jeringuilla de insulina para romper el ADN. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Cuantificación de proteína por BCA

Utilizamos el Kit Pierce TM BCA Protein Assay (Thermo Scientific), este ensayo de colorimetría permite determinar de forma precisa la concentración de proteína presente en las muestras respecto a una curva patrón. Trabajamos siguiendo las indicaciones del fabricante. Cuantificamos midiendo la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro en el lector de microplacas VersaMaxTM Microplate Reader from Molecular Devices.

Western Blot

El Western Blot (WB), inmunoblot o electrotransferencia, es un procedimiento de inmunodetección de proteínas específicas post-electroforesis en extractos proteicos, lisados celulares y muestras de sangre o tejido. (46) **Figura 5.**

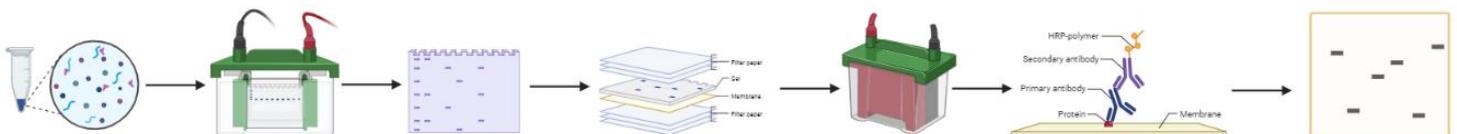


Figura 5. Pasos que realizar en un Western blot De izquierda a derecha, extracción de proteína, electroforesis, transferencia, adición de anticuerpos tras el bloqueo, revelado y visualización.

Esta técnica requiere el uso de una electroforesis vertical (SDS-PAGE) para separar las proteínas de la muestra en función de su peso (KDa). Para ello preparamos geles de poli(acrilamida de dodecilsulfato de sodio) del 10-15%. Cargamos en cada pocillo del gel la cantidad de proteína correspondiente según lo calculado con los resultados obtenidos en el ensayo de BCA (en torno a 30µg por pocillo). La electroforesis se lleva a cabo a voltaje constante (140V) hasta que el frente sale del gel por la parte inferior.

El segundo paso del WB es la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), previamente hidratada.

Secamos las membranas (30 minutos) y las rehidratamos con metanol 100% y H₂O. Sumergimos las membranas en solución de bloqueo (TTBS, azida y BSA al 5% o leche dependiendo de si trabajamos con proteínas fosforiladas o no respectivamente) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Incubamos con anticuerpo primario ON a 4°C en balancín. Realizamos diversos lavados con TTBS e incubamos 1h a RT con un anticuerpo 2° correspondiente a la especie del primario. Tras los lavados, incubamos 1 minuto a RT con 4 mL de ECL (0.5% luminol, 0.22% ácido p-cumárico, y 10% Tris pH 8.5) y 4 µL de H₂O₂ por membrana. Revelamos las películas fotográficas (Super RX-N) utilizando la procesadora automática Curix 60 que sumerge las películas en líquido revelador, agua y fijador.

Cuantificamos las bandas utilizando el software de análisis de imagen Image J. Se utilizó la β-actina como proteína constitutiva de referencia. Los resultados fueron normalizados relacionando la banda con la proteína de interés frente a la banda correspondiente a la β-actina.

Estudio del citoesqueleto mediante microscopía de fluorescencia.

En una placa de 4 pocillos se cultivan 1000 células en 100 μ l de medio DMEM completo en un cristal de polilisina por cada pocillo. Tras unas 4 horas aproximadamente se observa si las células se han adherido adecuadamente, en caso afirmativo se añaden 400 μ l de medio completo por cada pocillo y lo dejamos incubando a 37°C ON. Se cambia el medio por medio sin suero y se estimulan con diversas dosis de LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), TNF α (20 ng/mL, 40 ng/mL), o CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M) y se deja ON a 37°C. A continuación, se fijan con 4% (p/v) PFA y se permeabilizan con TritónX-100 0.1% en PBS. Seguidamente se bloquean con 1% PBS-BSA durante 5 minutos a 37°C y se incuban con faloidina-FITC y el anticuerpo anti-Paxilina 1 hora a 37°C en oscuridad. Tras 3 lavados, se incubarán con anticuerpo 2º IgG marcado con AlexaFluor 546 (10 μ g/mL) en oscuridad durante 1 hora a 37°C. Seguidamente se incuban con DAPI (0.3 μ g/mL) y tras 2 lavados, se observan en microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i equipado con cámara DS-Ri1. Se ajustan los parámetros de tiempo de exposición y la ganancia analógica.

Ensayo ELISA

El principio fundamental que rige la realización de un inmunoensayo o *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), es la unión de un anticuerpo a un antígeno específico para formar un complejo antígeno-anticuerpo exclusivo, sirve para la detección de un antígeno concreto a partir de un anticuerpo enlazado a una enzima o a un anticuerpo secundario con una enzima capaz de producir un cambio de color que permite la medición indirecta por espectrofotometría de la cantidad de antígeno de la muestra.

En este estudio se utilizan para determinar los niveles de factor inflamatorio interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Para realizar estos ensayos se utilizaron los kits: IL-6 (DY506-05 R&D Systems) y TNF α (DY510-05 R&D Systems) siguiendo las instrucciones del proveedor. Medimos la absorbancia a 450 nm y 540 nm en el espectrofotómetro (VersaMax™ Microplate Reader from Molecular Devices).

Kit de nitritos

Utilizamos el Kit de ensayo colorimétrico de nitritos (MAES0072 AssayGenie) para estudiar variaciones en la concentración de nitritos de nuestras muestras respecto del control. Seguimos el protocolo indicado en el Kit.

Cinética de estrés oxidativo

Se siembran 7500 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, una vez se han fijado a la base cambiamos el medio por DMEM sin suero y sin rojo fenol y lo dejamos ON a 37°C. Añadimos la sonda DCFH-DA (10 μ M). Tras 30 minutos, estimulamos y medimos en el Cytation (BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader) cada 15 minutos durante 6 horas.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, todos los datos cuantitativos son expresados como la media \pm SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism versión 8 (La Jolla, CA, USA). Se utilizó un análisis de varianza (one-way ANOVA) seguido del test de Tuckey. Se consideraron los P>0.05 como significativos.

RESULTADOS

En este trabajo estudiamos la acción de los estímulos CoCl_2 , LPS y $\text{TNF}\alpha$ sobre la línea celular de cardiomioblastos H9c2 y observamos su influencia en la activación de vías inflamatorias estudiando variaciones de p-P65, IL-6, y $\text{TNF}\alpha$, o en vías oxidativas, observando si se producen cambios en los niveles de nitritos o de HO-1, y estudiamos si se produce activación de la respuesta apoptótica mediante el estudio de la caspasa 3 y $\gamma\text{-H2AX}$. Además, estudiamos la estructura del citoesqueleto mediante microscopía de fluorescencia para comprobar si alguna de estos estímulos se produce en cambios estructurales en la célula.

Estudio de activación de vías inflamatorias por el CoCl_2 , LPS y $\text{TNF}\alpha$ en células H9c2.

- **Estudio del efecto de diversos estímulos en la inducción de p-P65**

El factor de transcripción NF- κ B tiene un papel importante en la modulación de la transcripción de citocinas y proteínas relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo. Por ello, estudiamos si existe una alteración de la presencia de p-P65 en las células al ser estimuladas con CoCl_2 (600 μM , 800 μM), LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/mL , 40 ng/mL) durante 24 h.

Como podemos ver en la **Figura 6**, ninguno de los estímulos produce alteraciones significativas en la concentración de esta proteína.

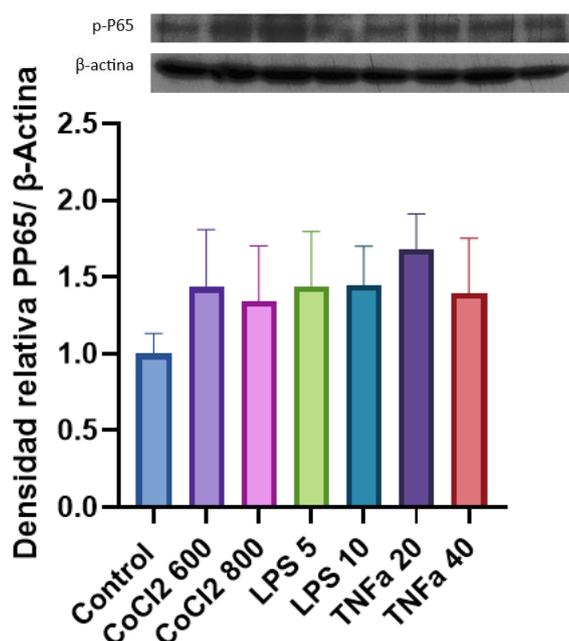


Figura 6. Efecto del CoCl_2 , LPS y $\text{TNF}\alpha$ en la activación de p-P65 en células H9c2. La línea celular de cardiomioblastos H9c2 se estimuló con CoCl_2 (600 μM , 800 μM), LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/mL , 40 ng/mL) y se incubaron ON a 37°C. Además, se utilizó una muestra no estimulada como control. A continuación, se midió la expresión de p-P65 mediante WB, utilizando β -actina como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína. Los datos de la gráfica se han representado considerando la densidad relativa de p-P65 respecto de la β -actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=3) ($p > 0.05$).

- **Efecto de CoCl₂, LPS y TNF α en la inducción de IL-6 y TNF α en células H9c2**

TNF α e IL-6 son citocinas con acción proinflamatoria, por lo que el aumento de estas proteínas indica que se han activado rutas inflamatorias. Para estudiar si se producen modificaciones en estas citocinas realizamos dos ELISAS, uno para IL-6 con los tres estímulos y otro para TNF α en el que estudiamos CoCl₂ y LPS. **Figura 7.**

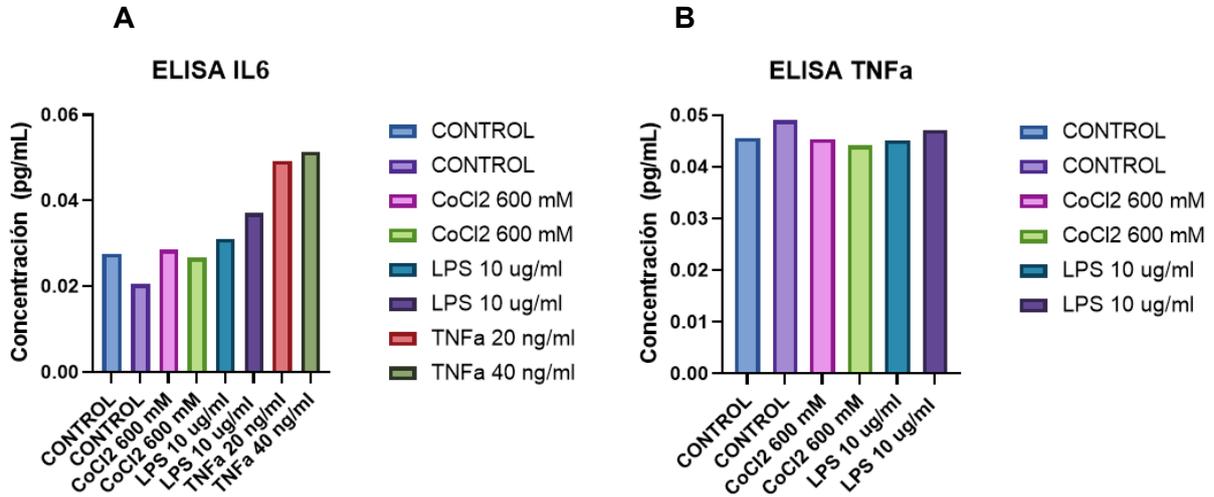


Figura 7. Efecto de CoCl₂, LPS y TNF α en la inducción de IL-6 y TNF α en cardiomioblastos. La línea celular de cardiomioblastos H9c2 se estimuló con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (20 ng/mL, 40 ng/mL) y se utilizó una muestra no estimulada como control. Se incubaron ON a 37°C. Se midió la expresión de **A**) IL6 de CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (5ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL) **B**) CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL) de los sobrenadantes de las distintas muestras mediante dos pruebas ELISA. (n=1)

Estudio de activación de vías apoptóticas por el CoCl₂, LPS y TNF α en células H9c2.

- **Estudio de la activación de la caspasa 3**

La caspasa 3 es un zimógeno clave en la apoptosis celular que se activa una vez se ha iniciado el flujo apoptótico, por lo que es un interesante marcador de muerte celular por apoptosis. Estudiamos mediante WB la presencia del fragmento activo de la caspasa-3 en las células al ser estimuladas con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (5ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL) durante 24 h. **Figura 8.**

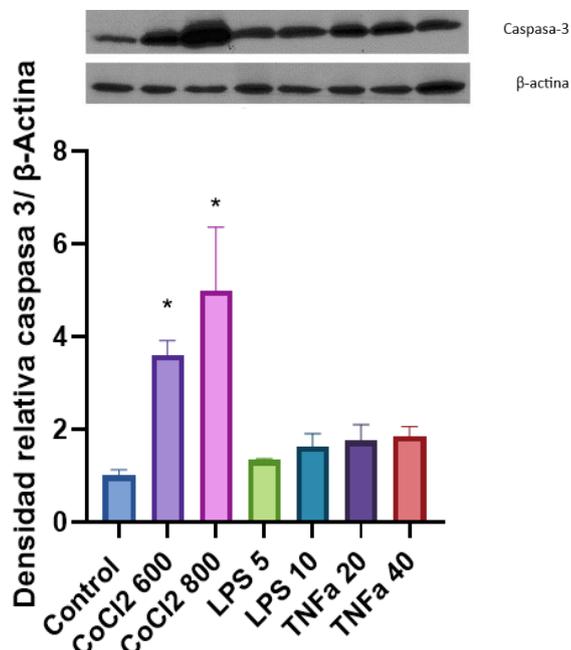


Figura 8. Efecto del CoCl₂, LPS y TNF α en la inducción de caspasa-3 activa en células H9c2. La línea celular de cardiomioblastos H9c2 se estimuló con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (1 μ g/mL, 3 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (5ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL) y se incubaron ON a 37°C. Además, se utilizó una muestra no estimulada como control. A continuación, se midió la expresión de caspasa-3 activa mediante WB, utilizando β -actina como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína. Los datos de la gráfica se han representado considerando la densidad relativa de caspasa-3 activa respecto de la β -actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=3) (p>0.05)

- **Estudio del efecto de diversos estímulos en la inducción de γ -H2AX**

La histona γ -H2AX participa en el mantenimiento de la estabilidad del genoma mediante la señalización de regiones dañadas en el ADN y como base para el ensamblaje de focos de reparación cuando se encuentra fosforilada, por ello estudiamos mediante Western blot si hay alteraciones en su expresión en células tratadas con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (5ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL) durante 24h para determinar si se está produciendo muerte celular.

Como podemos observar en la **Figura 9** existe mucha variabilidad de la respuesta encontrada y no se obtienen resultados significativos.

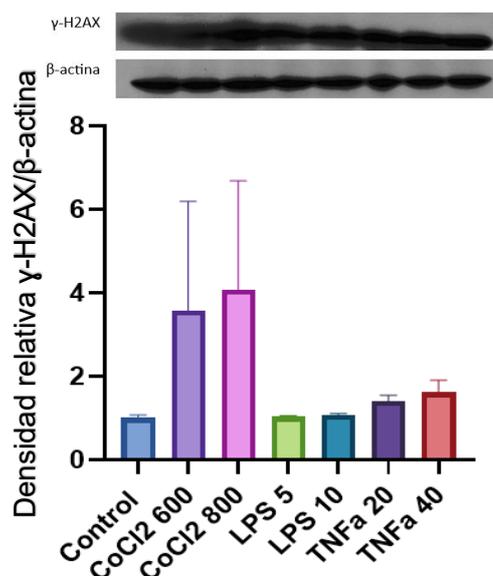


Figura 9. Efecto del CoCl₂, LPS y TNF α en la inducción de γ -H2AX en células H9c2. La línea celular de cardiomioblastos H9c2 se estimuló con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (5ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL) y se incubaron ON a 37°C. Además, se utilizó una muestra no estimulada como control. A continuación, se midió la expresión de γ -H2AX mediante WB, utilizando β -actina como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína. Los datos de la gráfica se han representado considerando la densidad relativa de γ -H2AX respecto de la β -actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=3) (p>0.05)

Estudio de activación de vías oxidativas por el CoCl₂, LPS y TNF α en células H9c2.

- **Inducción de HO-1**

Un mecanismo importante en la defensa contra el estrés oxidativo es la activación de la ruta que implica a la proteína HO-1, por ello estudiamos mediante WB variaciones en esta proteína en las células al ser estimuladas con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (5ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/ml) durante 24 h. **Figura 10.**

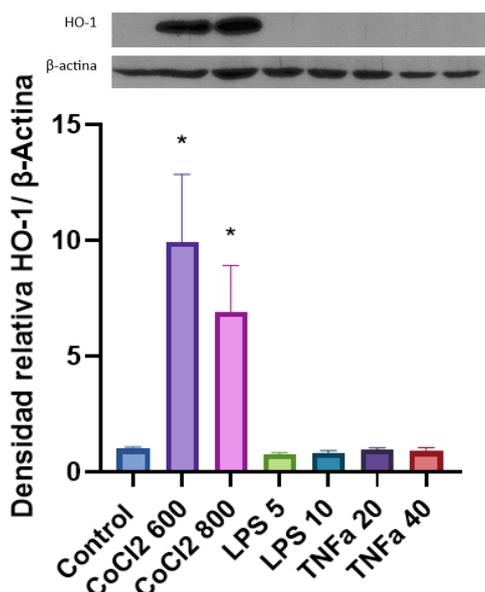


Figura 10. Efecto del CoCl₂, LPS y TNFα en la inducción de HO-1 en células H9c2. La línea celular de cardiomioblastos H9c2 se estimuló con CoCl₂ (600 μM, 800 μM), LPS (5 μg/ml, 10 μg/ml), y TNFα (20 ng/ml, 40 ng/ml) y se incubaron ON a 37°C. Además, se utilizó una muestra no estimulada como control. A continuación, se midió la expresión de HO-1 mediante WB, utilizando β-actina como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína. Los datos de la gráfica se han representado considerando la densidad relativa de HO-1 respecto de la β-actina. Los resultados se muestran como la media ± SEM (n=3) (p>0.05)

- **Estudio en la producción de nitritos por H9c2 estimuladas con CoCl₂, LPS y TNFα**

Un aumento en la producción de nitritos puede derivar de un aumento en el estrés oxidativo en la célula, por ello estudiamos si se produce una variación en la concentración de nitritos al estimular las células con CoCl₂ (600 μM, 800 μM), LPS (5 μg/mL, 10 μg/mL), y TNFα (20 ng/mL, 40 ng/mL) durante 24 h. **Figura 11.**

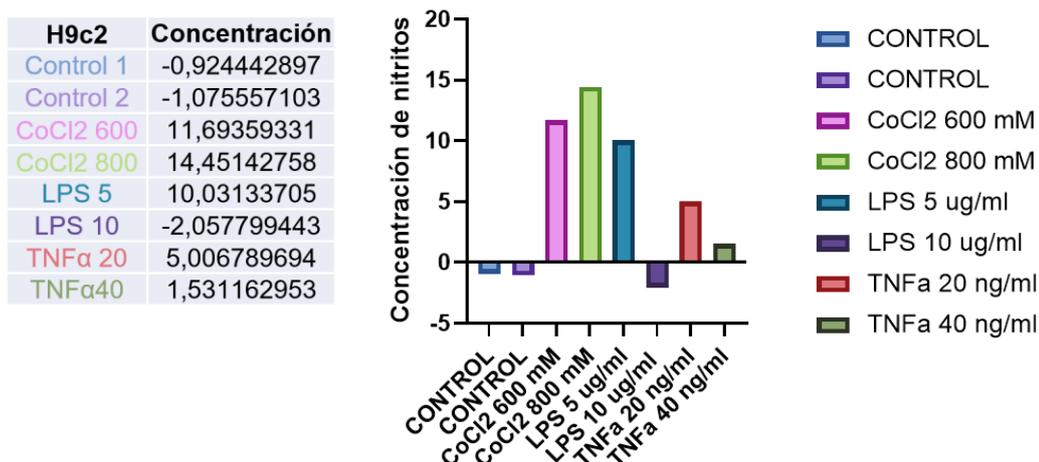


Figura 11. Efecto del CoCl₂, LPS y TNFα en la inducción de nitritos en células H9c2. La línea celular de cardiomioblastos H9c2 se estimuló con CoCl₂ (600 μM, 800 μM), LPS (5 μg/mL, 10 μg/mL), y TNFα (20 ng/mL, 40 ng/mL) y se incubaron ON a 37°C. Además, se utilizó una muestra no estimulada como control. Cuantificamos por colorimetría los nitritos producidos. (n=1)

- **Estudio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células estimuladas con CoCl₂, LPS y TNF α expuestas a distintos tiempos.**

Estudiamos el efecto de los estímulos indicados sobre la producción de especies reactivas de oxígeno y obtenemos la cinética que se puede observar en la **figura 12**.

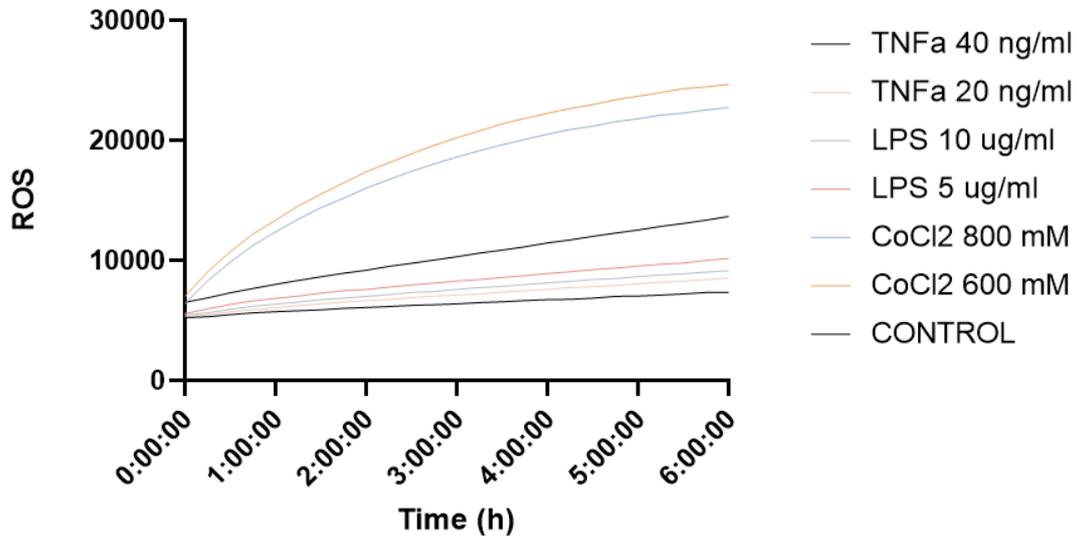
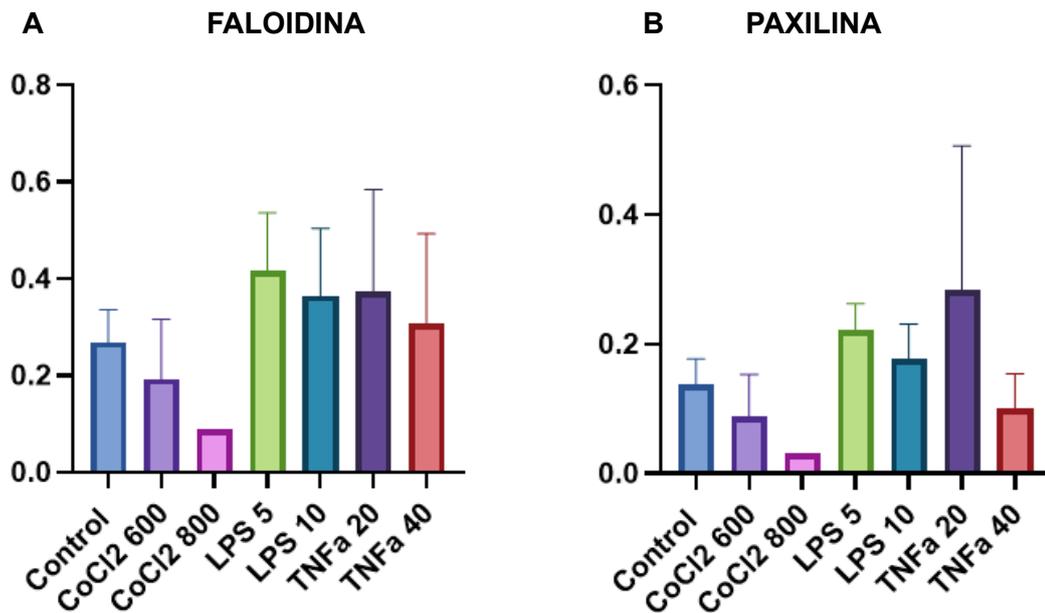


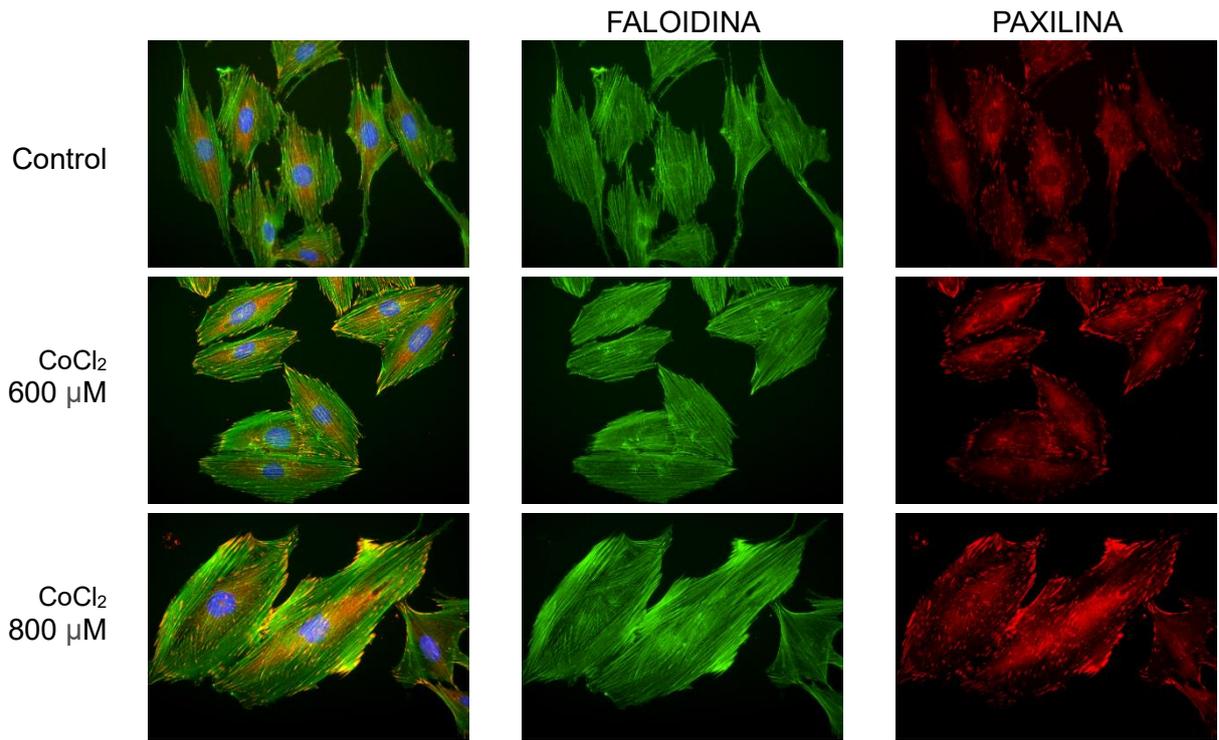
Figura 12. Cinética de ROS inducidas por diversos estímulos. Estimulamos H9c2 con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (20 ng/mL, 40 ng/mL) y se incuban ON a 37°C. Utilizamos una muestra no estimulada como control. Realizamos mediciones cada 15 minutos durante 6 horas. (n=1)

Estudio de la estructura de citoesqueleto de células H9c2 estimuladas con CoCl₂, LPS y TNF α .

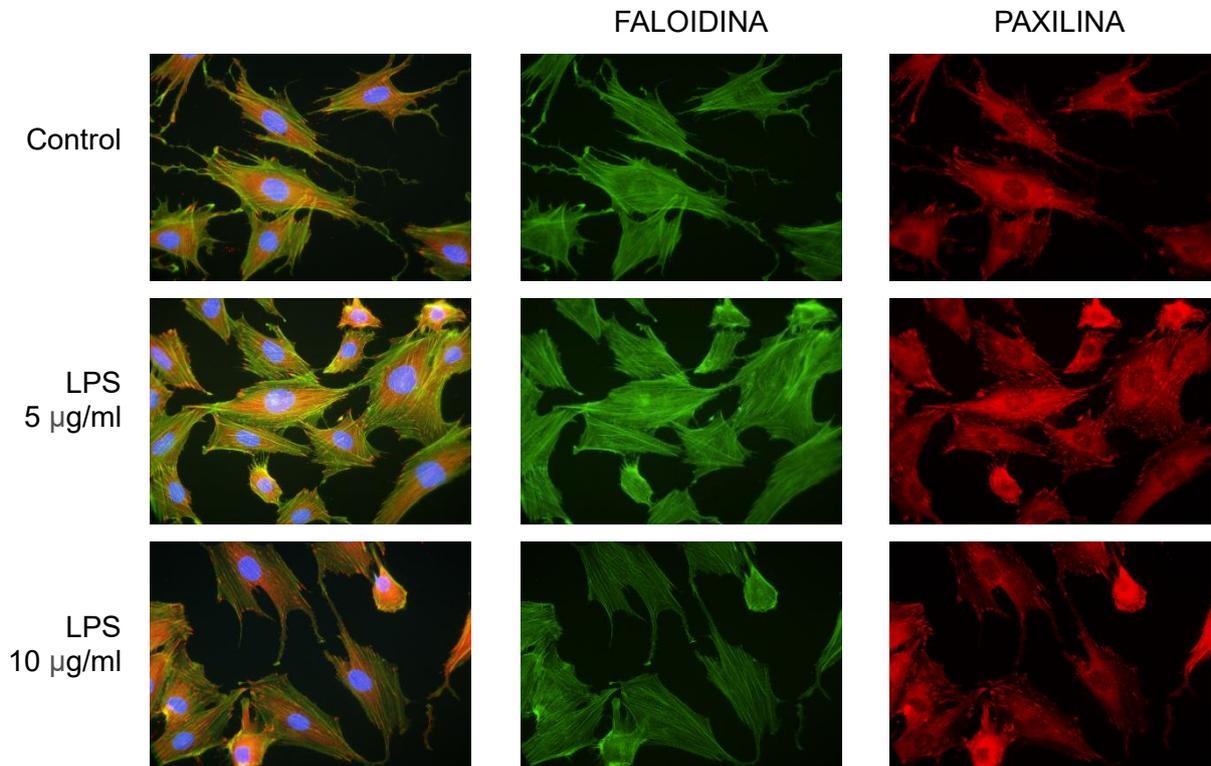
Estudiamos posibles cambios estructurales en el citoesqueleto de las H9c2 al ser estimuladas con CoCl₂ (600 μ M, 800 μ M), LPS (5 μ g/mL, 10 μ g/mL), y TNF α (20 ng/mL, 40 ng/mL). **Figura 13.**



C



D



E

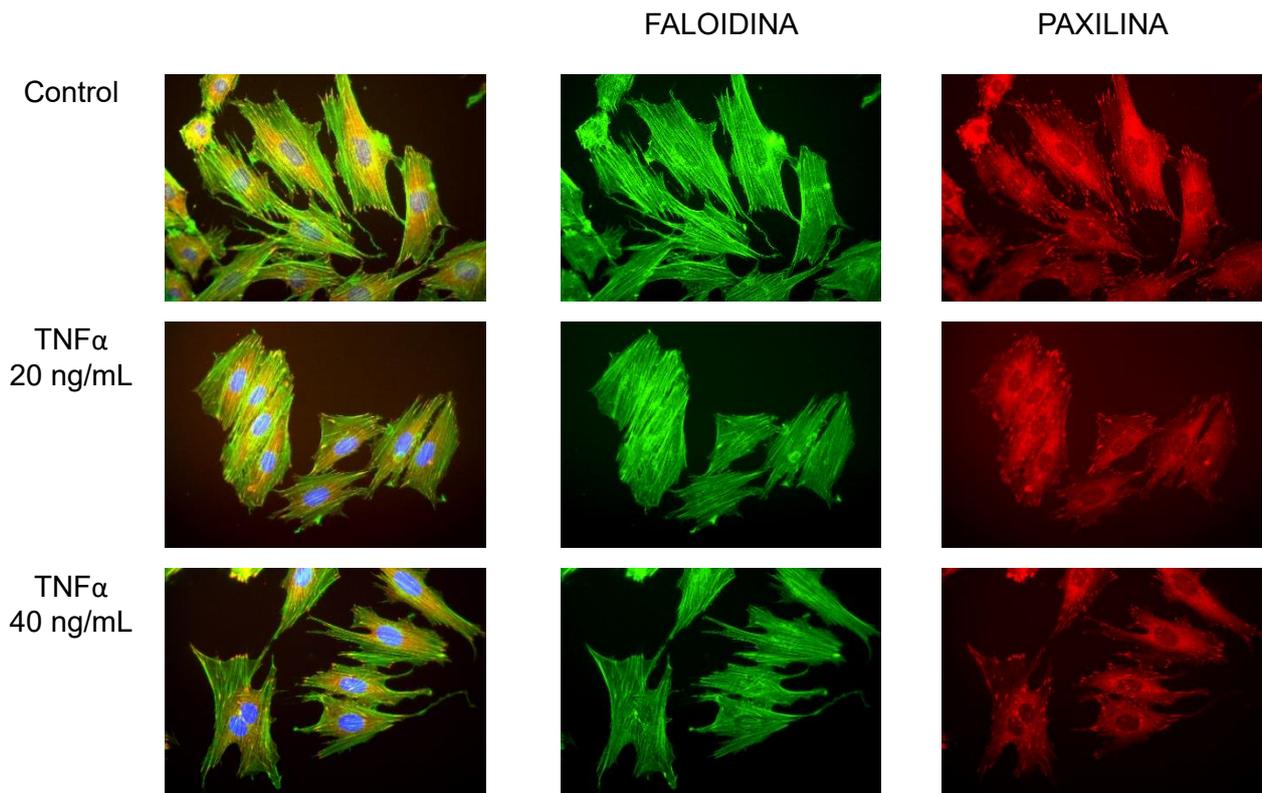


Figura 13. Estudio del citoesqueleto de H9c2 estimuladas con CoCl_2 , LPS y $\text{TNF}\alpha$.
A) Cuantificación de faloidina **B)** Cuantificación de paxilina. **C)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células H9c2 estimuladas con distintas dosis de CoCl_2 . 40x **D)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células H9c2 estimuladas con distintas dosis de LPS. 40x **E)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células H9c2 estimuladas con distintas dosis de $\text{TNF}\alpha$. 40x.

DISCUSIÓN

La insuficiencia cardiaca es causa importante de mortalidad y morbilidad a nivel global. La IC se caracteriza por una inflamación sistémica persistente, que podría estar relacionada con el estrés oxidativo. (11) Además, varios estudios prueban que existen procesos de muerte celular vinculados tanto con la inflamación como con el estrés oxidativo. (30,36,38,39,48)

En este trabajo se busca caracterizar un modelo *in vitro* en la línea celular H9c2 que emule estas condiciones de inflamación y estrés oxidativo, mediante el estudio de diversos estímulos (CoCl₂, LPS y TNF α) para estudiar mecanismos que se producen en la insuficiencia cardiaca. De tal forma que pueda utilizarse más adelante poder estudiar inhibidores, moduladores y tratamientos.

En primer lugar, tratamos de inducir inflamación celular utilizando LPS y TNF α a distintas dosis, según la bibliografía (49–53). Para estudiar si se produce esta inflamación, se estudia la activación de p-P65 mediante Western Blot, y, como se observa en los resultados, no se producen variaciones significativas. Además, también se observa si se mediante ELISAS para IL-6 y TNF α , y en ellos tampoco se observa una respuesta por parte de las células estimuladas. Esto nos lleva a concluir que ni el LPS ni el TNF α son estímulos válidos para producir respuesta inflamatoria bajo nuestras condiciones.

Tampoco se encuentran respuestas relevantes en el estudio del perfil de estrés oxidativo, lo que nos hacer plantearnos seriamente el uso de este estímulo, a pesar de que es mencionado en numerosos estudios como estímulo inflamatorio ((49,54,55)).

Quizá se requeriría un barrido más amplio de dosis de los estímulos y/o de tiempos, aunque las dosis y tiempos utilizados corresponden a los que se han observado en otros estudios. (54,56,57) Además, los experimentos se han llevado a cabo utilizando dos lotes diferentes de células, uno de ellos recién adquirido, así como diferentes lotes de LPS, sin obtener una respuesta diferente. Explorando la literatura, tendríamos que contemplar también la posibilidad señalada por el artículo de Yang *et al.* (58), donde se encuentran en esta misma situación de falta de respuesta, que difiere de lo que en el pasado ellos mismos obtenían. En su caso llaman la atención sobre la composición del suero de ternera fetal del medio en el que se estimulan las células, encontrando diferencias en el CD14, necesario para que se produzca la respuesta del LPS a través del TLR4. Más experimentos serían necesarios para confirmar esta situación e intentar obtener una activación inflamatoria en este modelo.

Estudiamos la producción de condiciones similares a las de la hipoxia producidas por CoCl₂. Para ello analizamos la expresión de la HO-1, una proteína sensible a estímulos prooxidantes, con cualidades protectoras contra el estrés oxidativo y varios tipos de muerte celular. (32–34,59) La estimulación con CoCl₂ en las células produjo un aumento significativo de la expresión de HO-1, así como la producción de ROS a lo largo del tiempo, y obtenemos que las muestras estimuladas con CoCl₂ presentan un aumento rápido de ROS, por lo que se perfila como un buen modelo para estudiar qué ocurre a las células en situaciones de isquemia con un mimético de hipoxia. (60,61)

La presencia de nitritos en las células es un indicador de estrés oxidativo, por ello estudiamos si se producen al ser estimuladas. Los resultados no son concluyentes, debido al bajo número de experimentos, pero esta tendencia de aumento en presencia de CoCl₂ tendría que ser confirmada.

Otro de los aspectos estudiados es la muerte celular, ya que tanto la apoptosis como la ferroptosis se encuentran relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo. (30,36,38,39,48) La apoptosis está dirigida por las caspasas, una familia de proteasas que se encuentran en las células sanas como zimógenos inactivos, pero cuando se estimulan sufren escisión autolítica y se activan. (62,63) La caspasa 3 es responsable de gran parte de la proteólisis durante la apoptosis y, por lo tanto, la detección de caspasa-3 activa se considera un marcador de apoptosis. En los resultados se puede observar que en las muestras estimuladas con CoCl_2 se produce activación de esta proteasa. Esto puede deberse a la relación existente entre el estrés oxidativo y la muerte celular (39,64). También estudiamos si se produce daño en el ADN realizando un WB para detectar activación de $\gamma\text{-H2AX}$. (43). Dada la dispersión de datos en estos resultados se observan tendencias no significativas para ambas dosis de CoCl_2 .

Los cardiomiocitos pueden responder a un estímulo mediante modificaciones del citoesqueleto(65); estudiamos si se producen cambios en presencia de los estímulos inflamatorios o miméticos de hipoxia en la F-actina, marcando con faloidina, y en las adhesiones focales, estudiando la paxilina. No se observan variaciones significativas en los niveles de paxilina y faloidina.

CONCLUSIONES

A continuación, se enumeran las distintas conclusiones derivadas de los distintos resultados obtenidos en este trabajo:

- Las dosis empleadas de LPS y TNF α no dan lugar a la modulación de rutas inflamatorias, apoptóticas ni de estrés oxidativo en células H9c2 en nuestros experimentos
- El CoCl₂ produce un aumento del estado de oxidación en células H9c2.
- El CoCl₂ induce la muerte celular de forma dosis-dependiente, mientras que los otros dos estímulos no desencadenan procesos apoptóticos.
- Ninguno de estos tres estímulos produce modificaciones en el citoesqueleto en células H9c2 en las condiciones estudiadas.

En algunos casos se requeriría la realización de más experimentos para obtener resultados estadísticamente justificados y sacar conclusiones, además de perfilar las condiciones para que el LPS sea un verdadero estímulo inflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Savarese G, Becher PM, Lund LH, Seferovic P, Rosano GMC, Coats AJS. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. *Cardiovasc Res.* 18 de enero de 2023;118(17):3272-87.
2. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. 2011;301.
3. Roger VL. Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res.* 30 de agosto de 2013;113(6):646-59.
4. Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail.* agosto de 2020;22(8):1342-56.
5. Epidemiology of Heart Failure [Internet]. [citado 25 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/CIRCRESAHA.121.318172>
6. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* [Internet]. 3 de mayo de 2022 [citado 15 de septiembre de 2023];145(18). Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000001062>
7. Orso F, Fabbri G, Maggioni AP. Epidemiology of Heart Failure. En: Bauersachs J, Butler J, Sandner P, editores. *Heart Failure* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 9 de agosto de 2023]. p. 15-33. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 243). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/164_2016_74
8. Emmons-Bell S, Johnson C, Roth G. Prevalence, incidence and survival of heart failure: a systematic review. *Heart.* septiembre de 2022;108(17):1351-60.
9. Sicras-Mainar A, Sicras-Navarro A, Palacios B, Varela L, Delgado JF. Epidemiología y tratamiento de la insuficiencia cardiaca en España: estudio PATHWAYS-HF. *Rev Esp Cardiol.* 1 de enero de 2022;75(1):31-8.
10. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 21 de septiembre de 2021;42(36):3599-726.
11. Yndestad A, Kristian Damås J, Øie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Systemic inflammation in heart failure – The whys and wherefores. *Heart Fail Rev.* marzo de 2006;11(1):83-92.
12. Caporizzo MA, Prosser BL. The microtubule cytoskeleton in cardiac mechanics and heart failure. *Nat Rev Cardiol.* junio de 2022;19(6):364-78.
13. Goldblum RR, McClellan M, White K, Gonzalez SJ, Thompson BR, Vang HX, et al. Oxidative stress pathogenically remodels the cardiac myocyte cytoskeleton via structural alterations to the microtubule lattice. *Dev Cell.* 9 de agosto de 2021;56(15):2252-2266.e6.

14. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 24 de julio de 2008;454(7203):428-35.
15. Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL. Inflammation in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. marzo de 2020;75(11):1324-40.
16. Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, et al. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis*. mayo de 2016;7(5):e2234.
17. Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 15 de mayo de 2020;17(5):269-85.
18. Padron J, Saito-Reis C, Kendal-Wright C. The Role of Danger Associated Molecular Patterns in Human Fetal Membrane Weakening. *Front Physiol*. 14 de mayo de 2020;11.
19. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther*. 21 de septiembre de 2020;5(1):209.
20. Tousoulis D, Guzik T, Padro T, Duncker DJ, De Luca G, Eringa E, et al. Mechanisms, therapeutic implications, and methodological challenges of gut microbiota and cardiovascular diseases: a position paper by the ESC Working Group on Coronary Pathophysiology and Microcirculation. *Cardiovasc Res*. 29 de diciembre de 2022;118(16):3171-82.
21. Sata Y, Marques FZ, Kaye DM. The Emerging Role of Gut Dysbiosis in Cardio-metabolic Risk Factors for Heart Failure. *Curr Hypertens Rep*. mayo de 2020;22(5):38.
22. Zhang Y, Wang Y, Ke B, Du J. TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. *Transl Res*. febrero de 2021;228:109-25.
23. Sroka N, Rydzewska-Rosołowska A, Kakareko K, Rosołowski M, Głowińska I, Hryszko T. Show Me What You Have Inside—The Complex Interplay between SIBO and Multiple Medical Conditions—A Systematic Review. *Nutrients*. 24 de diciembre de 2022;15(1):90.
24. Qian B, Zhang K, Li Y, Sun K. Update on gut microbiota in cardiovascular diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 10 de noviembre de 2022;12:1059349.
25. Li Q, Zhang M, Zhao Y, Dong M. Irisin Protects Against LPS-Stressed Cardiac Damage Through Inhibiting Inflammation, Apoptosis, and Pyroptosis. *Shock*. diciembre de 2021;56(6):1009.
26. Zhang Y, Zhang S, Li B, Luo Y, Gong Y, Jin X, et al. Gut microbiota dysbiosis promotes age-related atrial fibrillation by lipopolysaccharide and glucose-induced activation of NLRP3-inflammasome. *Cardiovasc Res*. 21 de febrero de 2022;118(3):785-97.
27. Halade GV, Lee DH. Inflammation and resolution signaling in cardiac repair and heart failure. *EBioMedicine*. 8 de abril de 2022;79:103992.
28. Felker GM, Mann DL, editores. Heart failure: a companion to Braunwald's heart disease [Internet]. Fourth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020 [citado 13 de

29. Saadaoui I, Bounnit T, Mraiche F, Joseph JM, Cherif M, Al-Jabri H. Asterarcys quadricellulare (Chlorophyceae) protects H9c2 cardiomyoblasts from H₂O₂-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 1 de septiembre de 2023;478(9):1915-25.
30. Aimo A, Castiglione V, Borrelli C, Saccaro LF, Franzini M, Masi S, et al. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Eur J Prev Cardiol.* marzo de 2020;27(5):494-510.
31. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* abril de 2019;21(4):425-35.
32. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:3221-47.
33. Chiang SK, Chen SE, Chang LC. The Role of HO-1 and Its Crosstalk with Oxidative Stress in Cancer Cell Survival. *Cells.* 13 de septiembre de 2021;10(9):2401.
34. Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. *Oncotarget.* 10 de septiembre de 2015;6(27):24393-403.
35. Qiu Z, He Y, Ming H, Lei S, Leng Y, Xia Z yuan. Lipopolysaccharide (LPS) Aggravates High Glucose- and Hypoxia/Reoxygenation-Induced Injury through Activating ROS-Dependent NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in H9C2 Cardiomyocytes. *J Diabetes Res.* 17 de febrero de 2019;2019:1-12.
36. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology, and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* abril de 2021;22(4):266-82.
37. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res.* febrero de 2021;31(2):107-25.
38. Fang X, Ardehali H, Min J, Wang F. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(1):7-23.
39. Yu Y, Yan Y, Niu F, Wang Y, Chen X, Su G, et al. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases. *Cell Death Discov.* 26 de julio de 2021;7:193.
40. Lawen A. Apoptosis?an introduction. *BioEssays.* septiembre de 2003;25(9):888-96.
41. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* junio de 2019;43(6):582-92.
42. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol.* mayo de 2021;18(5):1106-21.
43. Kuo LJ, Yang LX. γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo.* 2008;

44. La célula. Ampliaciones. Apoptosis. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/8-apoptosis.php>
45. Lenčo J, Lenčová-Popelová O, Link M, Jirkovská A, Tambor V, Potůčková E, et al. Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Exp Cell Res*. 10 de diciembre de 2015;339(2):174-86.
46. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 1 de abril de 2006;38(4):283-93.
47. Tomasoni D, Adamo M, Lombardi CM, Metra M. Highlights in heart failure. *ESC Heart Fail*. 29 de enero de 2020;6(6):1105-27.
48. Tang WHW, Li DY, Hazen SL. Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure. *Nat Rev Cardiol*. marzo de 2019;16(3):137-54.
49. Baradaran Rahim V, Khammar MT, Rakhshandeh H, Samzadeh-Kermani A, Hosseini A, Askari VR. Crocin protects cardiomyocytes against LPS-Induced inflammation. *Pharmacol Rep PR*. diciembre de 2019;71(6):1228-34.
50. Baradaran Rahimi V, Rahmanian Devin P, Askari VR. *Boswellia serrata* inhibits LPS-induced cardiotoxicity in H9c2 cells: Investigating role of anti-inflammatory and antioxidant effects. *Toxicol*. 15 de junio de 2023;229:107132.
51. Li PC, Tien YC, Day CH, Pai P, Kuo WW, Chen TS, et al. Impact of LPS-induced cardiomyoblast cell apoptosis inhibited by earthworm extracts. *Cardiovasc Toxicol*. abril de 2015;15(2):172-9.
52. El-Ani D, Zimlichman R. TNF α stimulated ATP-sensitive potassium channels and attenuated deoxyglucose and Ca uptake of H9c2 cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci*. diciembre de 2003;1010:716-20.
53. Chen Y, Decker KF, Zheng D, Matkovich SJ, Jia L, Dorn GW. A Nucleus-targeted Alternately Spliced Nix/Bnip3L Protein Isoform Modifies Nuclear Factor κ B (NF κ B)-mediated Cardiac Transcription. *J Biol Chem*. 31 de mayo de 2013;288(22):15455-65.
54. Cai ZL, Shen B, Yuan Y, Liu C, Xie QW, Hu TT, et al. The effect of HMGA1 in LPS-induced Myocardial Inflammation. *Int J Biol Sci*. 2020;16(11):1798-810.
55. Baradaran Rahimi V, Momeni-Moghaddam MA, Chini MG, Saviano A, Maione F, Bifulco G, et al. Carnosol Attenuates LPS-Induced Inflammation of Cardiomyoblasts by Inhibiting NF- κ B: A Mechanistic in Vitro and in Silico Study. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 4 de mayo de 2022;2022:7969422.
56. Mukherjee R, Tetri LH, Li SJ, Fajardo G, Ostberg NP, Tsegay KB, et al. Drp1/p53 interaction mediates p53 mitochondrial localization and dysfunction in septic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. abril de 2023;177:28-37.
57. Shen YL, Shi YZ, Chen GG, Wang LL, Zheng MZ, Jin HF, et al. TNF- α induces Drp1-mediated mitochondrial fragmentation during inflammatory cardiomyocyte injury. *Int J Mol Med*. 1 de abril de 2018;41(4):2317-27.
58. Yang N, Sin DD, Dorscheid DR. Various factors affect lipopolysaccharide sensitization in cell cultures. *BioTechniques*. agosto de 2020;69(2):126-32.

59. Ryter SW. Heme Oxygenase-1, a Cardinal Modulator of Regulated Cell Death and Inflammation. *Cells*. 28 de febrero de 2021;10(3):515.
60. Pang Z, Wang T, Li Y, Wang L, Yang J, Dong H, et al. Liraglutide ameliorates COCl₂-induced oxidative stress and apoptosis in H9C2 cells via regulating cell autophagy. *Exp Ther Med*. junio de 2020;19(6):3716-22.
61. Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*. 2019;39(4):556-70.
62. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. febrero de 1999;6(2):99-104.
63. Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 1 de noviembre de 2016;2016(11).
64. Xiang M, Lu Y, Xin L, Gao J, Shang C, Jiang Z, et al. Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6614009.
65. Gong G, Kam H, Tse Y, Lee SM. Cardiotoxicity of forchlorfenuron (CPPU) in zebrafish (*Danio rerio*) and H9c2 cardiomyocytes. *Chemosphere*. 1 de noviembre de 2019;235:153-62.