



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



**MODULACION DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN UN MODELO
CARDIACO DE CARDIOMIOCITOS**
*MODULATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN A CARDIAC MODEL
OF CARDIOMYOCYTES*

Autora:

D^a. Carla Collazo Martínez

Tutoras:

**D^a. Mónica Macías Paneda, Dra. María Luisa Nieto Callejo y
Dra. Marita Hernández Garrido.**

TÍTULO: Estudio/modulación de la respuesta inflamatoria en líneas celulares
AUTOR/A: Carla Collazo Martínez

TUTOR/ES: D^a. Mónica Macías Paneda, Dra. Marita Hernández Garrido. Dra. María Luisa Nieto Callejo

ÁREA/DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

TRIBUNAL

PRESIDENTE: Dr. Eduardo Arranz Sanz (Dpto. Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia)

SECRETARIO: Dr. Javier Casas Requena (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular)

VOCAL: Dra. Marita Hernández Garrido (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular)

SUPLENTE 1: Dr. David Bernardo Ordiz (Dpto. Dpto. Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia)

SUPLENTE 2: Dra. Sara Cuesta Sancho (Dpto. Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia)

FECHA:

CALIFICACIÓN:

RESUMEN

La inflamación es un proceso biológico complejo clave en numerosas enfermedades, entre ellas las cardiovasculares. Su relevancia en el ámbito cardíaco se ha evidenciado tanto en patologías agudas como crónicas y se ha observado una fuerte asociación entre la activación de vías inflamatorias y el deterioro funcional del miocardio.

El estudio con modelos celulares es muy relevante en investigación para poder replicar las condiciones del cuerpo humano *in vitro*. Por eso en este caso se trabaja con modelos inflamatorios, observando cuál posee unas características óptimas para replicar *in vitro* las condiciones observadas en el corazón.

En estos modelos se utiliza la línea celular humana de cardiomiocitos inmortalizados AC16, ya que expresan marcadores cardiomiocíticos clave y responden a estímulos inductores de inflamación. Esto las hace aptas para el estudio de procesos como la inflamación o el estrés oxidativo. Se han probado diferentes estímulos para ver cuáles generaban respuesta en las células.

En las patologías de tipo cardiovascular los tejidos se encuentran en un microambiente inflamatorio predominante. En él las citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IFN- γ actúan sobre receptores específicos de membrana y activan cascadas intracelulares que llevan a la respuesta celular.

Finalmente, en este trabajo se explora el efecto del ácido oleanólico como posible modulador negativo de la inflamación inducida en cardiomiocitos. Este compuesto ha mostrado propiedades antiinflamatorias en diversos contextos biológicos, y su aplicación en modelos inflamatorios cardíacos podría abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas enfocadas en reducir la carga inflamatoria del tejido miocárdico y preservar su funcionalidad.

Palabras clave

Inflamación; cardiomiocitos; citoquinas, miocardio; ácido oleanólico.

ABSTRACT

Inflammation is a complex biological process that plays a key role in numerous diseases, including cardiovascular conditions. Its relevance in the cardiac field has been demonstrated in both acute and chronic pathologies, with a strong association observed between the activation of inflammatory pathways and functional deterioration of the myocardium.

The use of cellular models is highly relevant in research, as it allows replication of human body conditions in vitro. In this case, inflammatory models are used to identify which one best replicates the conditions observed in the heart in vitro.

These models utilize the human AC16 immortalized cardiomyocyte cell line, as it expresses key cardiomyocyte markers and responds to inflammation-inducing stimuli. This makes it suitable for studying processes such as inflammation and oxidative stress. Different stimuli have been tested to determine which ones elicit responses in the cells,. In cardiovascular pathologies, tissues are typically found in a predominantly inflammatory microenvironment. In such environments, proinflammatory cytokines like TNF- α and IFN- γ act on specific membrane receptors and activate intracellular cascades that drive the cellular response.

Finally, this study explores the effect of oleanolic acid as a potential negative modulator of inflammation induced in cardiomyocytes. This compound has shown anti-inflammatory properties in various biological contexts, and its application in cardiac inflammatory models could open new avenues for the development of therapeutic strategies aimed at reducing the inflammatory burden in myocardial tissue and preserving its functionality.

Keywords

Inflammation; cardiomyocytes; cytokines; myocardium; oleanolic acid.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar al equipo de investigación del laboratorio E7 del Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM), por acogerme y guiarme durante esta etapa. En especial, gracias a Mónica, por ser un apoyo y una compañera cercana en el día a día, siempre dispuesta a ayudar; a Mabel por ser una estupenda guía desde mi primer día hasta el último, aportando buenos consejos y mejor humor; y a Marita y Marisa, por su dedicación, paciencia y apoyo. Ha sido un verdadero privilegio aprender de vosotras. Gracias de corazón.

También me gustaría agradecer a todas las doctorandas/os, trabajadores/as y personal de la tercera planta del IBGM, donde siempre me he sentido bien recibida y acompañada, creando un ambiente de trabajo motivador y animado.

Gracias al Instituto de Biomedicina y Genética Molecular por brindarme la oportunidad de realizar mis prácticas en sus instalaciones. Así como a la Universidad de Valladolid y al profesorado del Grado, por su implicación y por facilitar el camino hasta aquí, haciéndolo un poquito más llevadero.

En especial quiero agradecer a mi familia, por su apoyo incondicional, a pesar de la distancia, por estar y creer siempre en mí. Y, por supuesto, a mis amigas del colegio mayor por compartir esta etapa conmigo y ser el mayor apoyo en Valladolid.

ÍNDICE

RESUMEN	4
Palabras clave.....	4
AGRADECIMIENTOS	6
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	ii
3. Introducción.....	1
3.1 La inflamación y el miocardio	1
3.2 Activación de los cardiomiocitos	2
3.6 Compuestos naturales bioactivos	6
3.7 Modelo de estudio	6
4. Hipótesis y objetivos	7
4.1 Hipótesis	7
4.2 Objetivos.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
5. Materiales y métodos.....	8
5.1 Materiales.....	8
5.2 Cultivo celular.....	8
5.3 Ensayo de viabilidad.....	9
5.4 Pretratamiento con ácido oleanólico.....	10
5.5 Western Blot	10
5.6 Inmunofluorescencia	11
5.7 Análisis	12
6. Resultados	13
6.1 Búsqueda de un modelo	13
6.1.1 Estímulos inflamatorios	13
6.1.2 Cambios en la Conexina 43 con fluorescencia	14
6.2 Viabilidad del Ácido Oleanólico.....	17
6.3 Efecto del ácido oleanólico como modulador de la inflamación.....	19
7. Discusión	20
7.1 Modelos inflamatorios	20
7.2 Conexina 43	21
7.3 Ácido oleanólico	22
Conclusiones.....	23
BIBLIOGRAFÍA	24
APÉNDICES	Error! Bookmark not defined.
CÓDIGO <i>scripts</i>	Error! Bookmark not defined.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AC: anticuerpo

BL: Buffer Laemmli

BSA: Albúmina sérica bovina, del inglés “Bovine Serum Albumin”

Cx43: conexina 43

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, "Dulbecco's Modified Eagle Media".

ECL: Electroquimioluminiscencia, del inglés "Electrochemiluminescence"

FBS: Suero bovino fetal del inglés “Fetal Bovine Serum”

h: Horas

HRP: Peroxidasa de rábano, del inglés Horseradish Peroxidase

IC: Insuficiencia Cardiaca

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular-1, del inglés “Intercellular Adhesion Molecule 1”

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IFN- γ : interferón gamma

LPS: lipopolisacárido

MTS: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)

NF- κ B: Factor Nuclear kappa B, del inglés “Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”

μ M: micromolar

°C: Grados Celsius

NLRP3: nucleotide-binding, leucine-rich-repeat, pyrin domain containing 3

nm: nanómetros

OA: Ácido oleanólico, del inglés “Oleanolic Acid”

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: Durante la noche, del inglés “overnight”

PAGE: "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis"

PBS: Solución salina tamponada con fosfato, del inglés “Phosphate-Buffered Saline”

PVDF: Polivinilideno difluoruro

RCF: fuerza centrífuga relativa o fuerza G

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno, del inglés "Reactive Oxygen Species"

RT: Temperatura ambiente, del inglés “room temperatura”

SARS-CoV2: Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus V2

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBS: solución tamponada Tris salino, del inglés “Tris Buffered Saline”

TEMED: TEtraMEtiletilenDiamina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés Tumor Necrosis Factor Alpha

TTBS: TBS-Tween-20

u.a.: Unidades arbitrarias

V: Voltios

3. Introducción

3.1 La inflamación y el miocardio

La inflamación es un proceso fisiológico complejo y altamente regulado, esencial en la defensa del organismo frente a agentes externos y daños tisulares. Es fundamental que esta respuesta se resuelva adecuadamente para restablecer el equilibrio y la homeostasis del organismo, sin embargo, una activación descontrolada o sostenida del sistema inmune puede derivar en efectos perjudiciales sobre tejidos específicos, entre ellos se encuentra el tejido cardíaco.

La inflamación es el punto clave del sistema inmune ante los estímulos que provengan tanto del exterior como del interior, dentro del sistema inmunitario existen la inmunidad innata y la adaptativa (1).

Dependiendo de la duración y características del estímulo, y de la respuesta del organismo, la inflamación puede clasificarse como aguda —cuando ocurre en un periodo corto, como horas o días— o crónica, si se mantiene en el tiempo. En muchos casos, una inflamación crónica surge de una respuesta aguda que no logró eliminar completamente el agente causante del daño. No obstante, también existen formas de inflamación crónica que no derivan de un episodio agudo (1,2).

En los últimos años, se ha consolidado la idea de que la inflamación no solo acompaña a las enfermedades cardiovasculares, sino que cumple un papel clave en su patogenia y progresión. Este fenómeno se ha observado tanto en condiciones agudas como crónicas, siendo especialmente relevante en patologías como la miocarditis, la insuficiencia cardíaca y la cardiotoxicidad inducida por fármacos, entre otras (3).

En la clasificación de miocardiopatías de la OMS de 1996, la miocarditis se define como una «enfermedad inflamatoria del miocardio asociada a disfunción cardíaca» y se incluye entre las «miocardiopatías específicas» (4).

En el miocardio, la inflamación puede desencadenarse por múltiples factores, entre ellos infecciones virales, reacciones inmunológicas o toxicidad por medicamentos; dando lugar a diferentes subtipos de la enfermedad. Por las diferentes evoluciones clínico-patológicas puede subclasificarse en: fulminante, aguda, crónica activa y crónica persistente (5). En lo que respecta a la etiología puede deberse a causas infecciosas, sobre todo virus, entre otros el SARS-CoV-2 o el virus de la influenza (gripe), así como bacterias y hongos (4). Otro origen de esta patología es el tipo autoinmune, también la exposición a sustancias tóxicas y reacciones adversas a ciertos medicamentos (6). Dentro de todos estos factores, las infecciones virales representan la causa más habitual de esta enfermedad (5).

La consecuencia más inmediata de esta patología suele ser el daño estructural de los cardiomiocitos, que puede evolucionar hacia una disfunción contráctil, remodelado ventricular y fibrosis. Desde el punto de vista clínico, se distinguen principalmente dos grandes entidades: la miocarditis aguda, que se caracteriza por una inflamación reciente del miocardio con o sin necrosis celular, y la miocardiopatía inflamatoria crónica, que implica una inflamación persistente asociada a disfunción ventricular y que puede progresar hacia formas dilatadas del órgano. Estas formas crónicas, además de comprometer la función cardíaca, presentan un riesgo elevado de arritmias y muerte súbita, especialmente en población joven (7).

3.2 Activación de los cardiomiocitos

Las cascadas de señalización dentro de la célula representan un elemento central común en todos los procesos inflamatorios. En el contexto experimental, se ha demostrado que los cardiomiocitos humanos pueden responder a estímulos proinflamatorios mediante la activación de rutas intracelulares como NF- κ B, JAK/STAT o el inflamasoma NLRP3, todas ellas asociadas a la producción de especies reactivas de oxígeno, liberación de quimiocinas, y cambios en la expresión génica que perpetúan el daño celular (6).

La enfermedad miocárdica ya hemos visto que puede dividirse en tres fases diferentes, y todas ellas tienen mismo denominador común, las citoquinas. El estado de IC se caracteriza por un desequilibrio entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. El predominio de las citocinas proinflamatorias se ha correlacionado con una mayor gravedad de la IC (8). Cuando hay un aumento en la producción de IL-1 β y TNF- α al inicio de una infección viral, puede ser suficiente para desencadenar una enfermedad autoinmune en el corazón más adelante. La severidad de la miocarditis está influenciada por el tipo de citocinas que se activan (6,9).

En condiciones basales, los dímeros de **NF- κ B** permanecen inactivos en el citoplasma, unidos a las moléculas inhibidoras I κ B. Pero cuando la célula recibe señales de activación de citoquinas o el LPS como componente de la pared bacteriana, o físicas como radiación UV, se activa el complejo IKK, que fosforila las proteínas inhibidoras I κ B para ser degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma, como se puede ver en la Figura 1 (10). Esta degradación permite que NF- κ B entre al núcleo, actuando como un factor de transcripción, activando genes relacionados con la respuesta inflamatoria, la inmunidad innata y la supervivencia celular, activando la producción de proteínas clave como citoquinas, quimiocinas, proteasas, factores angiogénicos, y otras moléculas que regulan la inflamación, el crecimiento o la muerte celular (10). La activación sostenida de estas vías puede tener consecuencias patológicas como inflamación crónica (11,12).

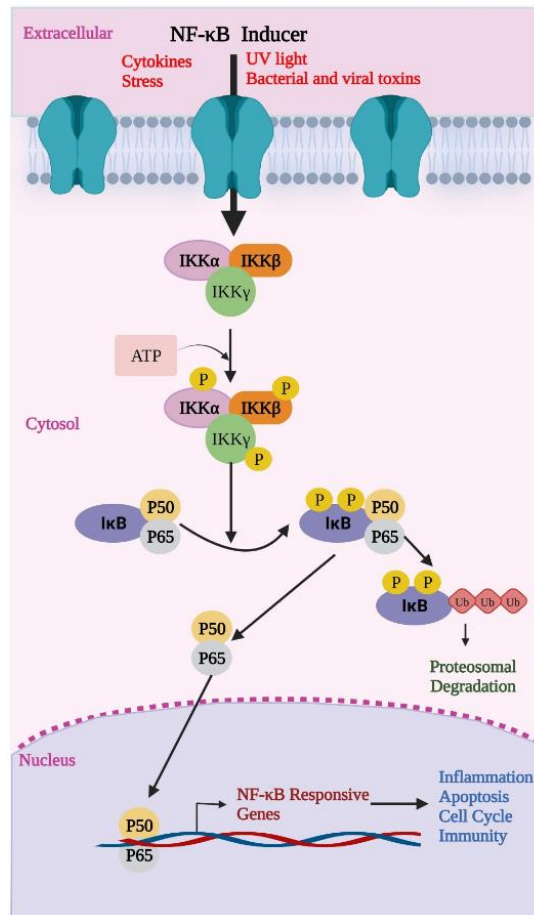


Figura 1. Representación esquemática de la vía del NF-κB (10): Muestra la vía de activación del factor de transcripción NF-κB (p65/p50). Ante estímulos como citoquinas, estrés, luz UV o toxinas bacterianas, se activa el complejo IKK, que fosforila a IκB, una proteína que normalmente mantiene inactivo al complejo NF-κB en el citoplasma. Una vez fosforilado, IκB es degradado por el proteasoma, liberando a NF-κB (p65/p50), que entra al núcleo y activa genes relacionados con inflamación e inmunidad (13).

Una de las moléculas más importantes en los procesos inflamatorios es el factor de necrosis tumoral alfa (**TNF-α**), una citocina proinflamatoria cuya producción está directamente regulada por el factor de transcripción NF-κB como se puede ver en la Figura 2 (14). TNF-α activa la vía de NF-κB y a su vez, NF-κB induce la producción de más TNF-α, creando un ciclo de retroalimentación positiva que amplifica la inflamación (15).

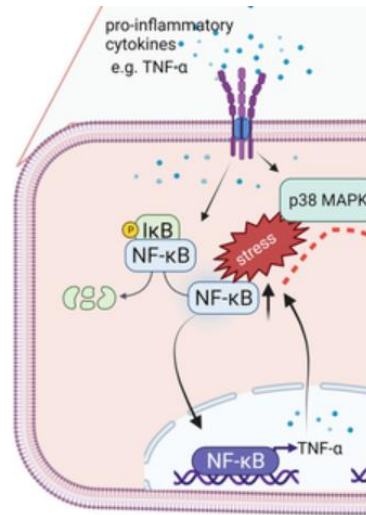


Figura 2: Ciclo de retroalimentación inflamatoria mediado por TNF- α y NF- κ B, imagen adaptada (16). Esta imagen representa un mecanismo clave en la inflamación celular, TNF- α inicia la cascada de señalización que culmina en la activación del factor de transcripción NF- κ B que amplifica la respuesta inflamatoria (16).

El IFN- γ es un tipo de interferón que se produce por la activación de factores de transcripción como STAT1 y en ciertos contextos también puede involucrar NF- κ B, a través de la activación de JAK/STAT, también puede inducir IKK y favorecer la activación de NF- κ B, que potencia la expresión de genes inflamatorios (15).

Mientras TNF- α activa principalmente NF- κ B, IFN- γ activa principalmente la vía JAK/STAT, en ciertos contextos puede activar IKK y favorecer la activación de NF- κ B (15,17).

En los procesos inflamatorios cardiacos los cardiomiocitos responden a estímulos como TNF- α o IFN- γ activando diversas vías de señalización intracelular. Aunque cada vía tiene funciones propias, todas están interconectadas, lo que se conoce como convergencia de señalización (18).

En cultivos celulares de líneas inmortalizadas, se ha demostrado que la estimulación con TNF- α o IFN- γ activa múltiples vías de señalización, entre ellas PI3K/AKT y NF- κ B. Esta convergencia da lugar a un efecto sinérgico explica por qué en contextos inflamatorios sostenidos se produce inflamación crónica o daño tisular progresivo (19).

A nivel tisular, se observa la infiltración de células del sistema inmune, especialmente de linfocitos y macrófagos, así como otras células mononucleares, que puede ir acompañada de necrosis de miocitos, alteraciones mitocondriales, producción desregulada de especies reactivas de oxígeno, y cambios en proteínas esenciales para la integridad funcional del miocardio.

Una proteína implicada en la funcionalidad del miocardio es la **Conexina 43** (Cx43), una proteína que facilita la transmisión del impulso eléctrico entre cardiomiocitos, que se ve alterada en estos procesos inflamatorios (20).

La conexina 43 (Cx43) es una proteína de membrana que participa en la formación de canales intercelulares, *gap junctions*, cada uno de ellos compuesto por dos conexones, a su vez formados por seis conexinas, estructura que se puede ver en la Figura 3. La función de esta proteína es permitir la comunicación entre células, al regular el paso de iones y segundos mensajeros.

Es la isoforma más abundante en cardiomiocitos y favorece la sincronización de la contracción cardíaca ya que participa en el acoplamiento eléctrico entre cardiomiocitos, asegurando la propagación eficiente del potencial de acción (20).

En la inflamación la localización de la Cx43 se altera, pasa de los discos intercalares hacia otras zonas de la membrana celular o incluso al citoplasma, proceso activado por citoquinas inflamatorias como el TNF- α (21).

Esta relocalización de la Cx43 afecta la sincronía contráctil y favorece la aparición de arritmias. Al aumentar la permeabilidad de la membrana, se liberan de forma excesiva segundos mensajeros, que contribuyen a una cascada inflamatoria. Esta cascada genera estrés oxidativo y altera la homeostasis iónica, con la aparición de arritmias cardíacas y a la disminución de la eficiencia contráctil del miocardio.

Además, la fosforilación de la Cx43 (particularmente en el residuo Ser368) regula su actividad y apertura de canales. Durante inflamación, esta fosforilación puede alterar, favoreciendo la apertura y afectando la comunicación entre cardiomiocitos. Estos cambios además de alterar la fisiología eléctrica del corazón, también pueden comprometer la integridad estructural del tejido cardíaco, exacerbando el daño durante condiciones como la miocarditis (20,22).

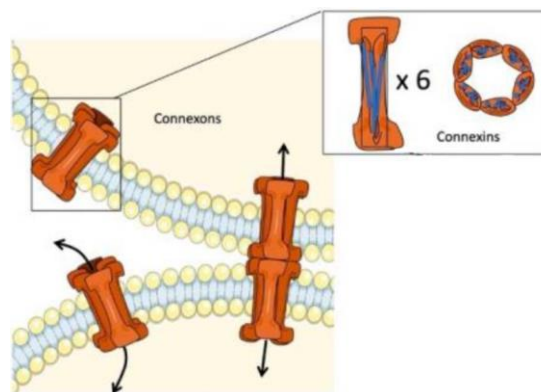


Figura 3: Uniones tipo GAP y conexina 43: Imagen en la que se esquematiza la unión de conexones formando un poro comunicante y un detalle de la organización de las seis subunidades de conexina (20).

3.6 Compuestos naturales bioactivos

Los compuestos naturales bioactivos son sustancias que, sin ser nutrientes esenciales, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud. Entre estos compuestos se incluyen los terpenoides, polifenoles, alcaloides y otros constituyentes nitrogenados, conocidos por sus propiedades antiinflamatorias. Los encontramos en una variedad de alimentos como verduras, frutas, cereales, especias y sus derivados, incluyendo el té, el aceite de oliva, jugos de frutas, vino, chocolate y cerveza (23).

El ácido oleanólico (AO) es un compuesto natural de tipo triterpeno pentacíclico que se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal. Se ha utilizado tradicionalmente tanto en plantas medicinales como en la alimentación diaria. Este compuesto puede extraerse y purificarse a partir de numerosas hierbas y vegetales, y una vez aislado, se presenta como un sólido cristalino que puede adoptar diferentes formas estructurales. En su forma libre, suele localizarse en las ceras que recubren la superficie de las plantas, donde desempeña un papel importante en la defensa frente a condiciones adversas como infecciones o cambios ambientales (24).

Desde el punto de vista farmacológico este triterpeno tienen múltiples efectos beneficiosos para la salud, debido a esas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (24), aunque su potencial aún no se ha explotado totalmente.

3.7 Modelo de estudio

Los modelos *in vitro* tienen utilidad para comprender los mecanismos patológicos, permiten evaluar posibles estrategias terapéuticas. Las líneas celulares son ampliamente utilizadas en diferentes contextos como base para el estudio de patologías. Las AC16 provienen de tejido ventricular adulto y son un modelo utilizado para el estudio de miocardio, dado que pueden diferenciar a cardiomiocitos adultos (25).

4.Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

Teniendo en cuenta que, en distintas patologías cardíacas, como la miocarditis, los cardiomiocitos sufren un entorno inflamatorio caracterizado por la acción de citocinas, este ambiente activará a los cardiomiocitos, activando la vía de señalización de NFκB y puede alterar la localización y función de la conexina 43 (Cx43).

Dado que el ácido oleanólico es un compuesto natural con reconocidas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, su aplicación en los modelos inflamatorios *in vitro* podría reducir la respuesta inflamatoria y revertir, al menos parcialmente, los efectos perjudiciales observados.

4.2 Objetivos

Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el papel del microentorno inflamatorio en cardiomiocitos humanos, empleando la línea celular humana AC16. Este modelo permitirá comprender de forma más precisa como responden los cardiomiocitos ante estímulos inflamatorios. Además, se evaluará la eficacia para disminuir la respuesta obtenida de un compuesto bioactivo de origen natural con potencial antiinflamatorio.

Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de diferentes agentes proinflamatorios sobre la morfología de las células AC16.
- Analizar la activación de NFκB por los agentes proinflamatorios en las células AC16.
- Analizar posibles cambios provocados por los estímulos proinflamatorios en la distribución y expresión de Conexina 43.
- Estudiar la viabilidad de las células AC16 en presencia de ácido oleanólico.
- Explorar el efecto del ácido oleanólico en la respuesta de las AC16 a los estímulos proinflamatorios.

5. Materiales y métodos

5.1. Materiales

5.1.A. Reactivos

H₂O₂ (30%, Merk Millipore), Human TNF- α (Thermo Fisher Scientific), Human IFN- γ (Thermo Fisher Scientific), Human IL-1 β (Thermo Fisher Scientific), LPS *E. Coli* O55:B5 Sigma-Aldrich®. Accutase® Sigma-Aldrich®. MTS (kit Promega, Cell Titer 96R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay). Human TNF- α (PreproTech). Human IFN- γ (Immuno Tools).

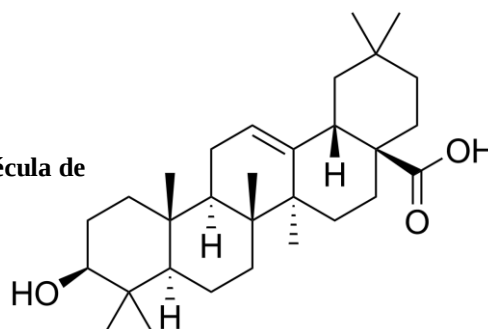
Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12) HEPES (1X) Gibco™, FBS (Suero Bovino Fetal).

MTS (kit Promega, Cell Titer 96R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)

5.1.B. Extractos Bioactivos

Se ha usado el ácido oleanólico (AO), triterpenoide pentacíclico de origen, cuya estructura química se muestra en la Figura 4. Este extracto se ha obtenido de Cayman.

Figura 4: Imagen de la molécula de



ácido oleanólico (26)

5.2 Cultivo celular

Los cardiomiocitos AC16 provienen de Cyton; son una línea celular adherente inmortalizada derivada de cardiomiocitos humano. La AC16 son células ventriculares humanas fusionadas con SV40.

Las células AC16 se mantienen en un incubador a 37 °C, con una atmosfera humidificada del 5% de CO₂, en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 HEPES suplementado con 10% de suero fetal bobino (FBS) inactivado por calor y con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomina). El subcultivo se realiza cuando las células alcanzan aproximadamente el 70–80% de confluencia. Los experimentos se realizan con las células entre los pases 4-30.

Para el subcultivo las células AC16 se lavan con PBS y se tratan con Accutase®, a temperatura

ambiente durante 8 minutos a RT.

Para los estudios de proteínas las células se sembraron en placas de cultivo P60, con medio completo, y antes de su estimulación se mantienen en medio con FBS al 1% durante 4 h. A continuación, las células se tratan durante 24 h con los estímulos y dosis siguientes:

- TNF- α , dosis de 25 ng/mL
- IFN- γ , dosis de 50 ng/mL
- LPS, dosis de 10 μ g/mL

Y diferentes combinaciones según se indica en Tabla 1. Los experimentos se repitieron hasta n=3:

Tabla 1: Distribución de estímulos en cardiomiocitos AC16.

Sin estímulo	LPS	IFN- γ	TNF- α	IFN- γ + LPS	TNF- α + LPS	IFN- γ + TNF- α
--------------	-----	---------------	---------------	---------------------	---------------------	-------------------------------

5.3 Ensayo de viabilidad

El objetivo del estudio es determinar el rango de dosis de ácido oleanólico seguras para las células AC16.

En una placa multipocillo de 96 pocillos se siembran 5,000 células por pocillo, añadiendo 200 μ L de medio DMEM/F-12 HEPES suplementado con 10% FBS. Se deja en el incubador durante 24 h a 37 °C.

Después se retira el medio y se añade medio fresco al 1% de FBS sin rojo fenol, 100 μ L por pocillo. La elección de usar un medio sin rojo fenol se debe a que se trata de un estudio colorimétrico y el rojo fenol interfiere en la medida. Posteriormente, se deja durante cuatro horas antes de proceder con el tratamiento.

Cada concentración de ácido oleanólico (5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M) se diluye en medio con 1% de FBS sin rojo fenol, y se distribuyen 100 μ L por pocillo. Cada dosis se aplica en seis pocillos independientes, es decir, con seis réplicas por condición.

A las 24 horas del tratamiento, se añade el reactivo MTS (10 μ L por pocillo) y se incuba para permitir la reacción de reducción en las células viables. Este compuesto sirve como indicador de la actividad metabólica celular. Cuando las células están metabólicamente activas reducen el MTS de color amarillo a un producto soluble de color marrón-anaranjado, formazán, por lo que, a mayor cantidad de células vivas, mayor intensidad de color.

Se realizan mediciones de la absorbancia de la placa a 490 nm con el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan SkyHigh, cada hora durante cuatro horas. Se obtienen

resultados similares, por lo que la estadística se elabora a partir de los datos con mayor tiempo de medida.

5.4 Pretratamiento con ácido oleanólico

Cuando las células alcanzan un 70-80% de confluencia se mantienen durante 4h en medio con 1% FBS. Pasado este tiempo se añade el ácido oleanólico a las placas a diferentes dosis de 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M. Tras el pre-tratamiento de 1 h, se estimula con TNF- α e IFN- γ , como se indica en la Tabla 2:

Tablas 2: Distribución de estímulos en las placas P60 para el experimento en cardiomiocitos AC16

Control 1	OA 5	OA 10	OA 20	IFN- γ + TNF- α
IFN- γ + TNF- α + OA 5	IFN- γ + TNF- α + OA 10	IFN- γ + TNF- α + OA 20	Control 2	

Este experimento también se repite un total de n=3.

5.5 Western Blot

Una vez finalizada la incubación con los estímulos, las células AC16 se lavan con PBS frío y se lisan directamente en 100 μ L de Tampón de Laemmli (BL: Buffer Laemmli, BL3X).

El lisado se recoge y se transfiere a un eppendorf. y se mantiene a 100°C durante 5 minutos. Seguidamente se utiliza una jeringuilla para completar el lisado.

Mediante la técnica de Western Blot se generan, a partir de las proteínas extraídas de las células, membranas donde se visualiza la presencia de proteínas propias de la inflamación.

La preparación proteica se realiza con una electroforesis vertical en gel SDS-PAGE: se prepara un gel del 10% de Poliacrilamida, se cargan los pocillos con 25 μ L de cada muestra. Se lleva a cabo la electroforesis a un voltaje constante de 140 V. Previamente se hierven a 100°C 5 min.

Después se transfieren las proteínas desde el gel a una membrana de PVDF, que tras la transferencia 1 h a 350 mA, se bloquea con una solución de TTBS al 2% de BSA 1 h a RT.

Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios específicos ON a 4°C.

Para este estudio se evaluó la activación de NF- κ B, analizando la presencia de p65 fosforilada (p-P65-NF κ B) e I κ B fosforilada (p-I κ B).

Tras los lavados con TBS-Tween-20 al 1% (TTBS), se incuba con el anticuerpo secundario específico para cada proteína, conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), durante 1

h.

El revelado se realiza mediante el método del ECL (0,5% de luminol + 0,22% de ácido cumárico + 10% de 1M Tris pH 8,5) + 4 μ L H₂O₂ y se expone una película fotográfica Super RX-N (FujiFilm) que se revela en una reveladora Curix 60, AGFA-Gevaert.

5.6 Inmunofluorescencia

Para el estudio de la Cx43 se usa la técnica de la inmunofluorescencia, que es capaz de detectar las proteínas a través de anticuerpos fluorescentes. En este caso se usará para la detección y localización citológica de la Cx43, mirando tanto en los controles como los cultivos estimulados con IFN- γ y TNF- α y así estudiar posibles diferencias entre ambas preparaciones.

La fluorescencia es una técnica que se basa en la capacidad de los fluoróforos para absorber luz a una determinada longitud de onda y luego emitirla a una longitud diferente.

Para la preparación del medio de montaje se constituyen las soluciones, el tampón con PBS, la solución fijadora con formaldehído al 4% en PBS y el buffer de bloqueo con PBS, 5% suero de cabra y 0.3% Tritón™ X-100.

Se siembran las células en pocillos con cristal recubierto de polilisina (5.000 células/pocillo), asegurándonos de que crezcan adheridas sobre el cristal y a las 4 h se añaden 400 μ L de medio completo.

A las 24 h se cambia el medio a medio al 1% FBS 500 μ L/pocillo. A las 3 h se realiza la estimulación de la mitad de los pocillos con IFN- γ + TNF- α . Al día siguiente se aspira el medio en el que han estado ON y se fijan con formaldehído 15 min a RT, continuando con 3 lavados de 10 min con PBS, finalmente se incuban 1 h con el buffer de bloqueo.

Para la detección de la Conexina 43 se ha preparado la dilución de anticuerpos secundarios con PBS, 1% BSA y 0.3% Tritón™ X-100, que se incuba ON a 4°C. A las 24 h se repiten los 3 lavados y se incuba 1 h a RT en oscuridad con el anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo, en este caso FITC, que se activara al ser expuesto a la luz. Para marcar los núcleos celulares se utiliza un medio de montaje con DAPI Fluoromount-G que emite fluorescencia al unirse al DNA.

De esta forma la combinación de FITC para localizar la Conexina 43 y DAPI para marcar los núcleos permite observar tanto la localización de la proteína como la distribución celular en los cardiomiocitos.

Estas preparaciones se van a mirar a través del Microscopio de Fluorescencia NIKON Eclipse 90i equipado con cámara DS-Ri1. También a través del microscopio confocal, que permite obtener imágenes con mayor resolución, funciona mediante un láser que ilumina solo un punto específico de la muestra, eliminando otras capas. De esta forma, el microscopio confocal

permite observar estructuras celulares en tres dimensiones, adquirir un eje Z que con el microscopio de fluorescencia no se alcanza.

5.7 Análisis

Para analizar los resultados del Western Blot, se realiza una densitometría cuantitativa de las bandas y se analiza con el software ImageJ de Fiji, seleccionando manualmente las bandas correspondientes a la proteína de interés con un marco rectangular, para asegurar la comparabilidad entre muestras. A partir de ahí, se genera un perfil de densidad para cada banda, midiendo el área bajo el pico que representa su intensidad, lo cual se asocia a la cantidad de proteína presente.

Posteriormente, se realiza el mismo procedimiento para una proteína de carga, normalmente β -actina, con el objetivo de normalizar los resultados. Se representan los datos de la gráfica como la media $\pm$ SEM.

Finalmente, los datos normalizados se analizan estadísticamente en GraphPad Prism, aplicando un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido del test de Bonferroni para evaluar diferencias significativas entre grupos. Los P-valores inferiores a 0,05 se tomaron como significativos. También se generan gráficos de barras con errores estándar, donde se anotan los resultados estadísticamente relevantes.

6. Resultados

6.1 Búsqueda de un modelo

6.1.1. Estímulos inflamatorios

En primer lugar, con este experimento se busca caracterizar la respuesta de los cardiomiocitos AC16 a estímulos inflamatorios. Se incubaron las células AC16 con LPS (10 µg/mL), IFN- γ (50 ng/mL) y TNF- α (25 ng/mL) o combinaciones de los estímulos como se indica en la Figura 5.

Para el análisis de la inflamación se evaluó la expresión de p-P65-NF- κ B y p-I κ B porque son tres marcadores idóneos que indican la presencia de inflamación en las células gracias a la activación de sus vías de señalización, como se ha explicado anteriormente.

En la Figura 5 se muestra el análisis por Western Blot la expresión de p-I κ B y p-P65-NF κ B, y su cuantificación. Además de la b-actina en la parte inferior, respecto a la cual se han normalizado los datos.

En la Figura 5A se muestra la presencia de p-I κ B en células AC16 previamente estimuladas con citoquinas o LPS. Se observa que el TNF- α es el compuesto que en mayor medida induce la presencia de p-I κ B y por tanto la activación de las células, tanto solo como en combinación con otros agonistas inflamatorios. Este aumento es estadísticamente significativo cuando las células que han sido estimuladas con la combinación de IFN- γ + TNF- α .

En la Figura 5.B se muestra la activación del factor de transcripción NF κ B, a través de la fosforilación de la proteína P65, p-P65-NF κ B. De nuevo las condiciones que generan una inducción de p-P65-NF κ B, y por tanto una mayor activación celular son las que tienen la citoquina proinflamatoria TNF- α , y aumento es estadísticamente significativo en el caso de la combinación de IFN- γ + TNF- α .

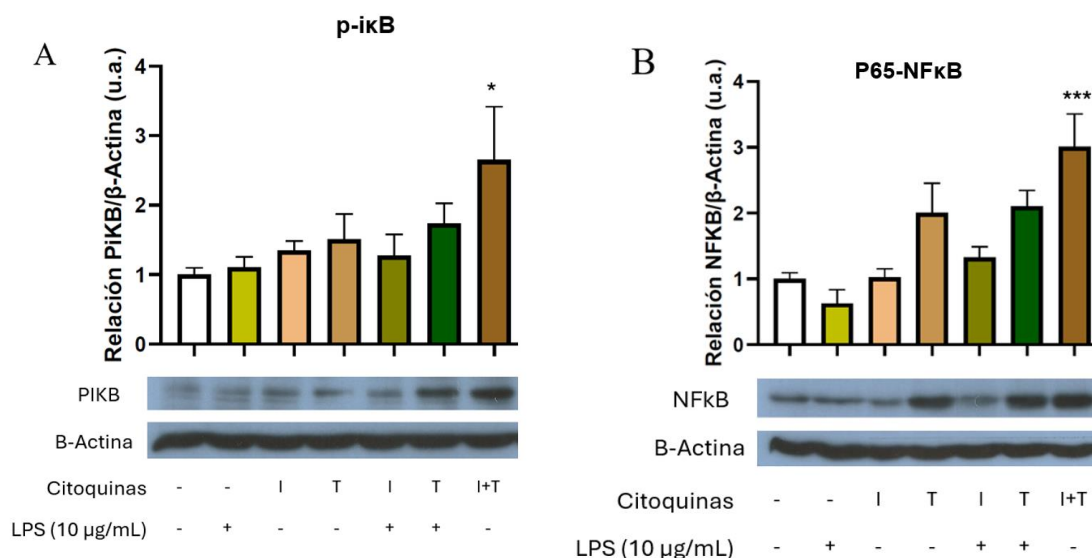


Figura 5: Expresión de p-I κ B (A) y p-P65 NF κ B (B) en cardiomiocitos AC16 estimulados con citoquinas proinflamatorias IFN- γ (I) dosis de 50 ng/mL y TNF- α (T) dosis de 25 ng/mL, además de LPS. Las células se incuban con diferentes estímulos inflamatorios y se mide su expresión a las 24 h mediante Western Blot para analizar el p-I κ B (A) y el p-P65-NF κ B (B). Se usa como control de carga y para la cuantificación de la expresión la proteína B-actina y se representan gráficamente en unidades arbitrarias (u.a.), n=3. *p<0.05, ***p<0.001 vs control

6.1.2. Modulación de la proteína Conexina 43 con fluorescencia

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA CONVENCIONAL

A través del análisis por microscopia de fluorescencia y mediante de Western Blot, se han podido estudiar los cambios que se producen en la conexina 43 en respuesta a estímulos inflamatorios en los cardiomiocitos AC16. Se puede observar en la Figura 6, los cambios que se producen en la localización de la Conexina 43: se puede ver como en el control hay una mayor presencia de señal fluorescente verde, FITC, que corresponde con la tinción del anticuerpo que se une a la Conexina 43. Por otro lado, las señales azules corresponden a los núcleos celulares, el DAPI se une fuertemente al ADN por lo que se puede visualizar la cantidad y la disposición de los núcleos celulares y su morfología. De este modo, vemos que hay una disminución de la señal verde en las Figuras 6C y 6D que corresponden a las estimuladas con IFN- γ + TNF- α , respecto a las Figuras 6A y 6B, que son los controles. Esta señal fluorescente verde es FITC, que se excita a 495 nm, se acopla a anticuerpos secundarios, en este caso a la Conexina 43, por lo que cuando estos anticuerpos se unen a su diana se observa la señal verde bajo el Microscopio de Fluorescencia. También se puede ver una clara disminución en la morfología en las imágenes de fluorescencia.

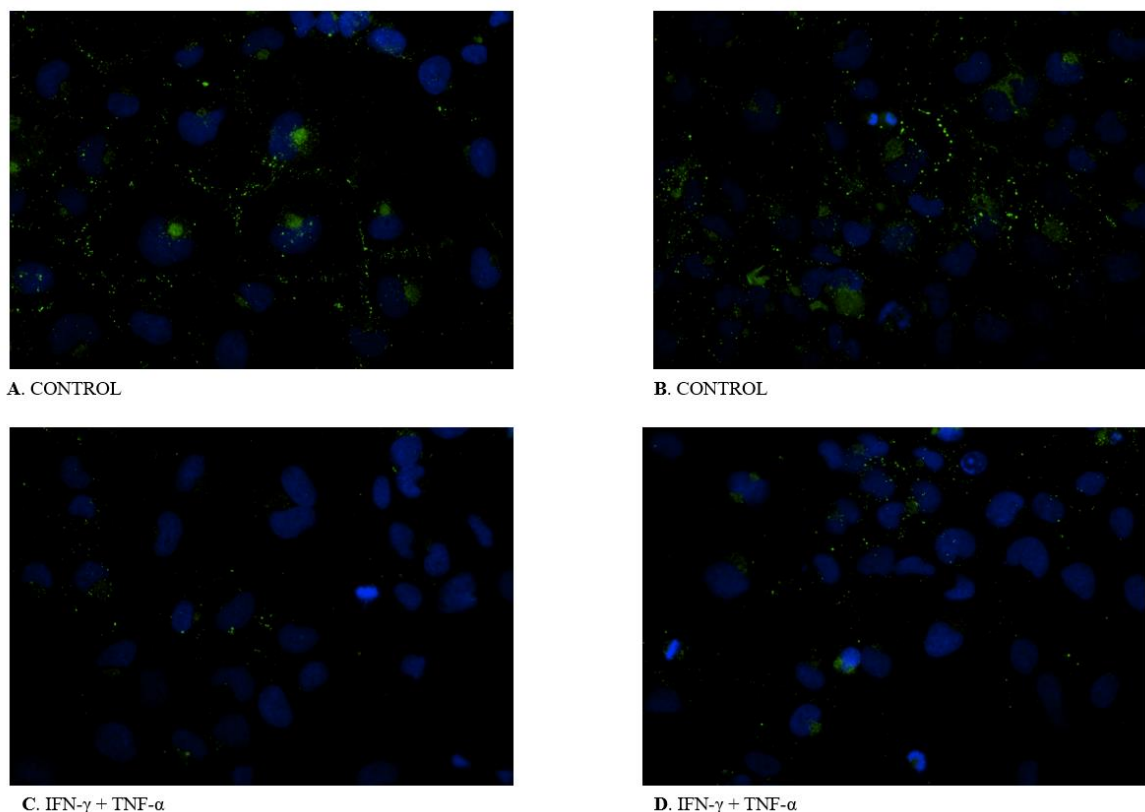


Figura 6: Expresión de Conexina 43 en AC16 estimulados con IFN- γ + TNF- α . Las células AC16 se incubaron en presencia de 50 ng/mL IFN- γ y 25 ng/mL TNF- α durante 24 h. La conexina 43 se visualizó empleando un anticuerpo específico Anti-Conexina 43 con FITC (verde). Se utilizó el DAPI para visualizar los núcleos (azul). Imágenes representativas del microscopio de fluorescencia tomadas con el objetivo de 40x.

MICROSCOPIO CONFOCAL

Con el microscopio confocal se pueden tomar imágenes con mayor resolución y nitidez. Esta técnica mediante el uso de un láser permite eliminar la luz desenfocada y mejorar la calidad de la imagen, generando reconstrucciones tridimensionales de las estructuras. En este caso recoge la presencia de conexina 43 en todos los planos de la célula y los junta en una imagen, generando una reconstrucción 3D de la estructura celular, lo que permite la localización y visualización más precisa. Las imágenes de la Figura 7 se han tomado todas con el aumento 60x, y luego se han juntado los canales del verde y el azul. Mediante el programa Image J se han juntado la fluorescencia del eje Z en un solo plano para proceder a su cuantificación.

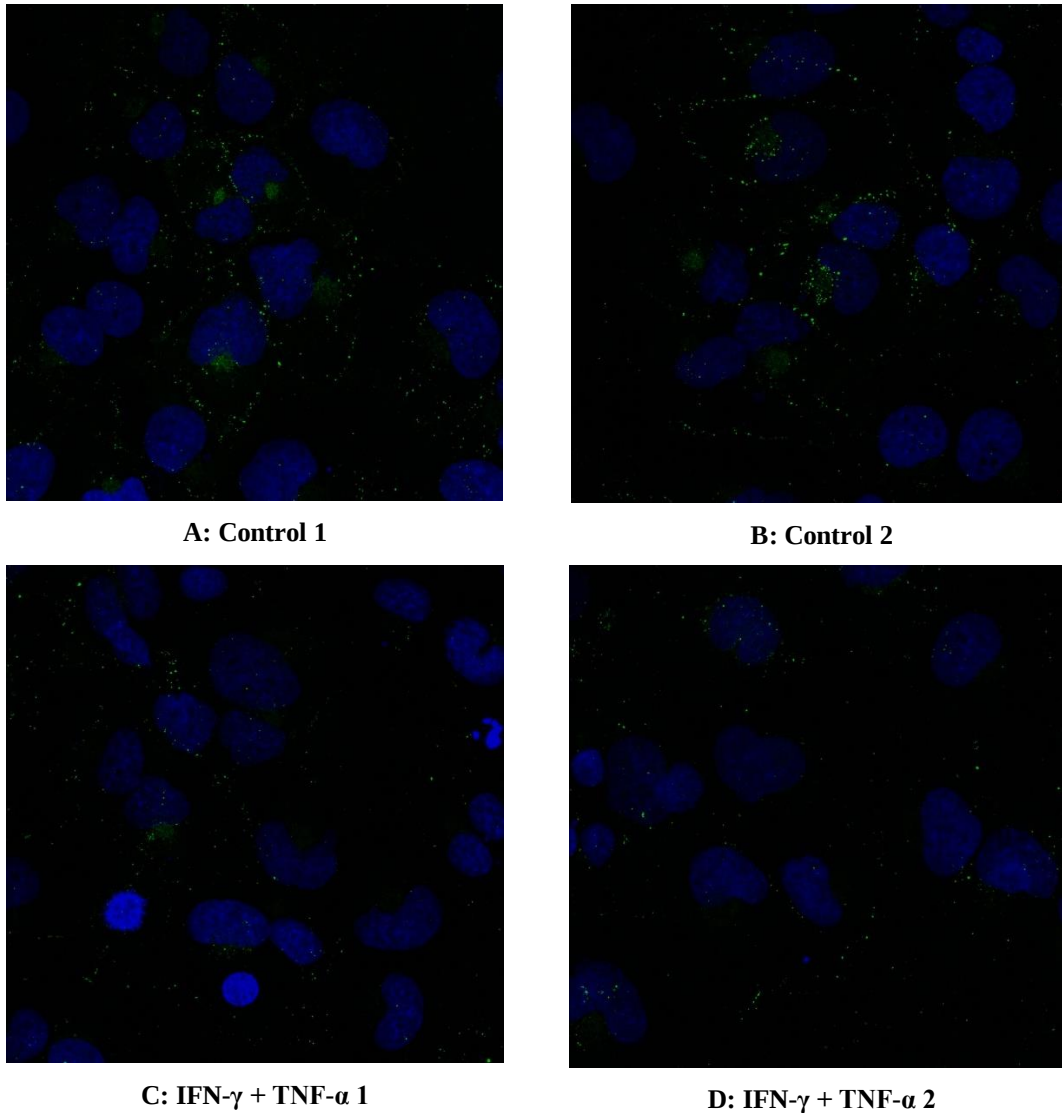


Figura 7: Expresión de Conexina 43 en cardiomiocitos AC16 estimulados con IFN- γ + TNF- α . Las células AC16 se incubaron en presencia de 50 ng/mL IFN- γ y 25 ng/mL TNF- α durante 24 h. La conexina 43 se visualizó empleando un anticuerpo específico Anti-Conexina 43 con FITC (verde) y se utilizó DAPI para visualizar los núcleos (azul). Imágenes representativas del microscopio confocal con el objetivo 60x.

A continuación, en la Figura 8 se representa una gráfica donde se ha cuantificado la intensidad de la fluorescencia del FITC en todos los planos Z respecto al número de células que hay en cada plano gracias a los núcleos con el DAPI.

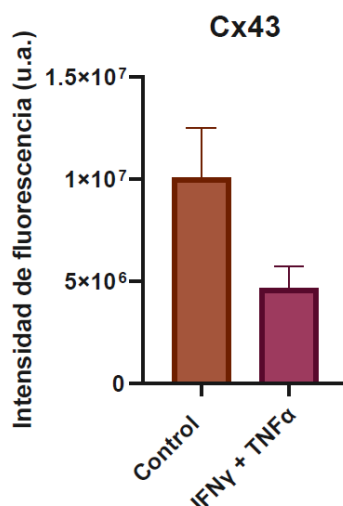


Figura 8: Gráfica de cuantificación del FITC correspondiente con la Conexina 43 normalizado respecto al número de células.

6.2 Viabilidad del Ácido Oleanólico

Se realiza un estudio de la viabilidad en los cardiomiocitos AC16 en presencia de diferentes dosis de ácido oleanólico, mediante un ensayo MTS. Las células se sembraron en placas de 96 y se trataron según se explica en la Tabla 3. En la Figura 9A y 9B vemos imágenes de la placa multipocillo y observamos cómo el MTS va virando de color en función de la actividad de las células en cada pocillo. Cuando más oscuro el tono de marrón, mayor viabilidad, ya que la mitocondria celular estará metabolizando más el compuesto MTS, generando un nuevo componente coloreado, formazán, que podemos cuantificar midiendo la absorbancia.

Tabla 3: Disposición de las filas de estímulos en la placa multipocillo

Filas 1 y 2	Control
Fila 3	Dosis 5 μ M
Fila 4	Dosis 10 μ M
Fila 5	Dosis 20 μ M
Fila 6	Dosis 30 μ M
Fila 7	Dosis 40 μ M
Fila 8	Dosis 50 μ M

A simple vista en la Figura 9A vemos como al administrar el MTS, en el tiempo 0 es de un color amarillento, mientras que a medida que va siendo metabolizando al pasar el tiempo se va volviendo marrón como se puede ver en la Figura 8B. Este compuesto soluble en agua se agrega al medio de cultivo de las células, y las que son metabólicamente activas reducen el MTS gracias a la acción de las enzimas mitocondriales, como las deshidrogenasas, adquiriendo un

color marrón-anaranjado. La intensidad del color es proporcional al número de células viables (27).

En la Figura 9B se puede ver un cambio progresivo de color a medida que aumenta la dosis de OA en los pocillos, siendo amarillo completamente en la dosis de 50 μM y anaranjado en la de 40 μM . mientras que en las demás dosis se aprecia un cambio de color completo al marrón, que va virando primero con el paso de las horas en los controles y las dosis más bajas, que se ven con mayor intensidad de color, y de ultimo en las dosis de 20 μM y 30 μM .

En la Figura 9C se muestran la cuantificación de las medidas. Se midió a una longitud de onda de 490 nm la absorbancia de cada uno de los pocillos, teniendo $n = 6$ para cada condición.

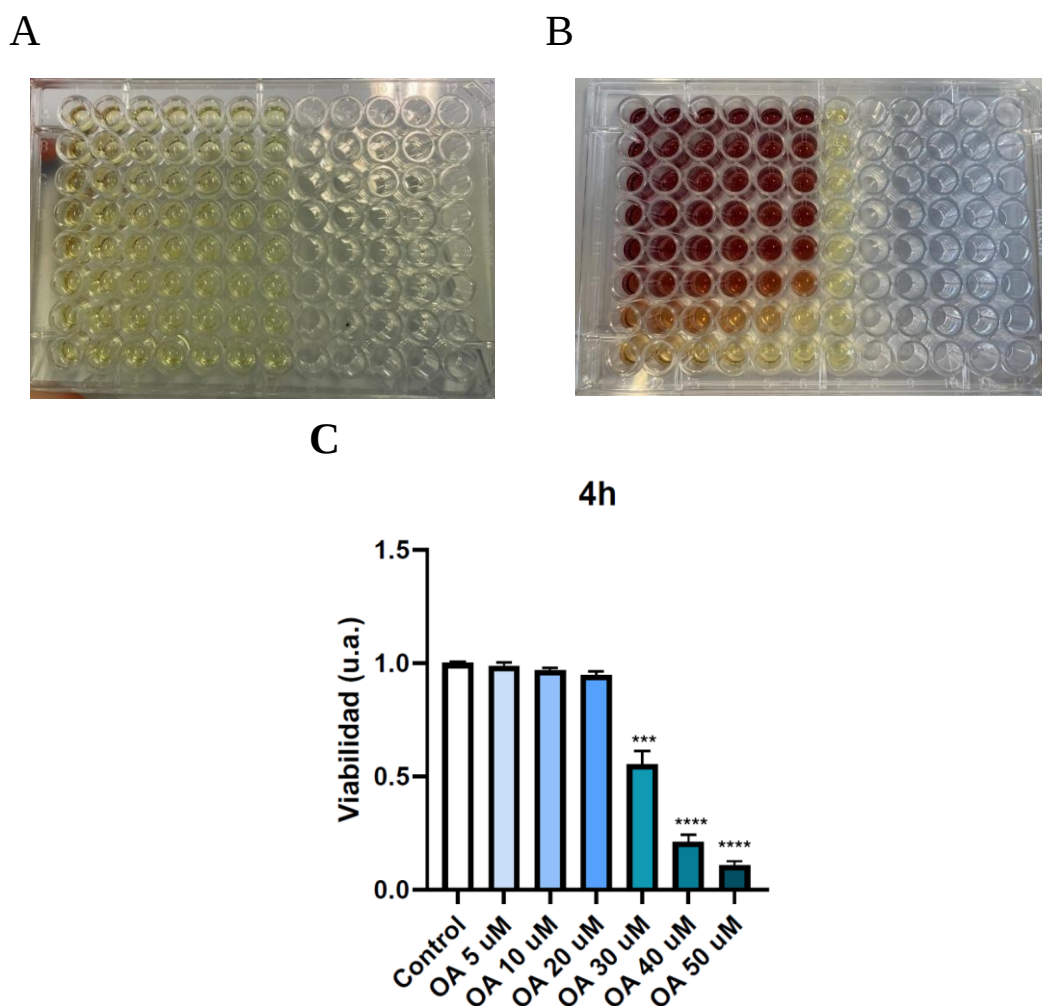


Figura 9: Análisis de la Viabilidad tras la aplicación de MTS a las placas multipocillo con cardiomiocitos AC16 expuestos a diferentes dosis de ácido oleanólico durante 24 h. mediante ensayo MTS. A) Placa multipocillo justo al aplicar 10 μL de MTS en cada pocillo, tiempo 0. B) Placa multipocillo a las 4h de la aplicación del MTS. C) Cuantificación. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. Ácido oleanólico, OA. *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ vs control

Como se observa en la Figura 9, la viabilidad celular se mantiene sin cambios significativos en las concentraciones de 5 μM , 10 μM y 20 μM , hasta 30 μM , que presenta una disminución del metabolismo celular estadísticamente significativo ($***p < 0.001$).

6.3 Efecto del ácido oleanólico como modulador de la activación de cardiomiocitos

Una vez se ha generado un modelo inflamatorio válido en los cardiomiocitos AC16 *in vitro*, se procede a la búsqueda de una estrategia mediante la cual disminuir dicha respuesta de forma eficaz. En este caso, como ya se ha explicado anteriormente, se va a usar el ácido oleanólico, con el objetivo de probar este compuesto natural como posible antiinflamatorio en los cardiomiocitos. Experimentalmente se realiza la técnica de Western Blot con las proteínas extraídas de placas incubadas con IFN- γ + TNF- α , con y sin OA a las diferentes dosis viables en este tipo celular. Las membranas obtenidas se incuban con anticuerpos frente a p-I κ B y p-P65-NF κ B. Se pueden ver en la Figura 10 las gráficas, obtenidas tras densitometrar las películas de revelado y cuantificando el área bajo la curva. Se obtiene la estadística al analizar los datos, además se muestra la b-actina en la parte inferior, respecto a la cual se han normalizado los datos.

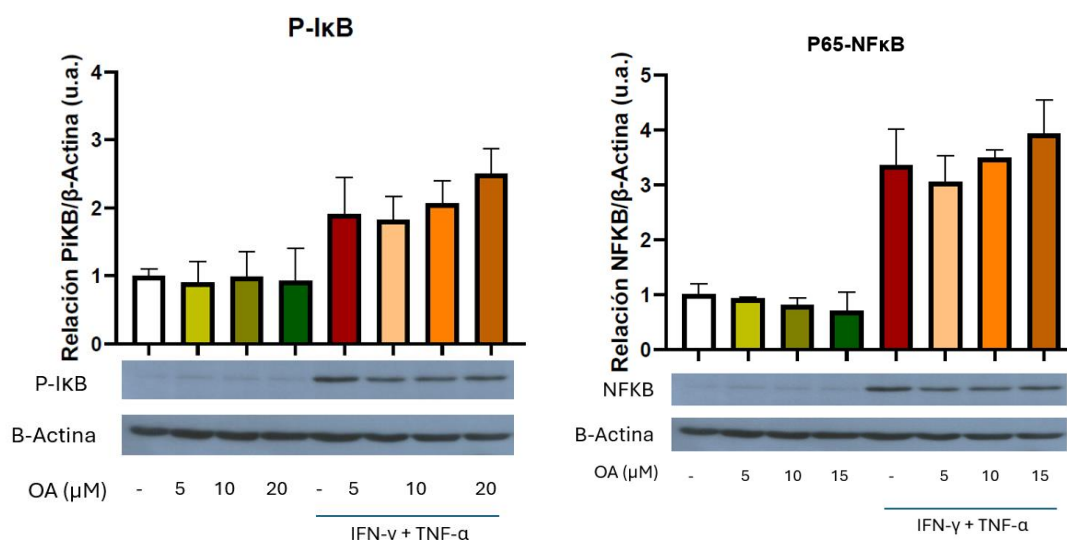


Figura 10: El ácido oleanólico no modula la respuesta a estímulos inflamatorios de las AC16. Las células se incubaron durante 1 h con OA y se estimularon con IFN- γ + TNF- α , se analizó la presencia de proteínas de las cascadas de inflamación p-I κ B y p-P65-NF κ B

En la cuantificación de la Figura 10 se puede ver cómo la respuesta producida en el modelo inflamatorio no se modula de una forma estadísticamente significativa con el uso de OA..

11. Discusión

11.1 Modelos inflamatorios

Este estudio ha conseguido establecer las condiciones para el estudio de la respuesta de los cardiomiocitos a un entorno inflamatorio utilizando la línea celular humana AC16. Se ha visto que el LPS, lipopolisacárido bacteriano no produce un aumento significativo de la inflamación a través de la cascada de señalización del p-I κ B y NF κ B, eso quiere decir que para esta línea celular la señal química bacteriana, representada en este caso con el LPS, no logra activar el complejo IKK para que fosforile las I κ B, por lo que no se degradan y no se introduce el P65-NF κ B al núcleo celular. Tampoco el LPS en combinación con citoquinas proinflamatorias, como el IFN- γ o el TNF- α , logran producir un aumento de la inflamación suficientemente significativo en los cardiomiocitos como para activar la vía del NF κ B y generar inflamación.

Por otro lado, la estimulación proinflamatoria con citoquinas sí que genera mayor inflamación en los cardiomiocitos, concretamente la estimulación con TNF- α . El IFN- γ por sí solo no produce una inflamación estadísticamente significativa y tampoco el TNF- α de forma individual, sino que es la combinación de IFN- γ + TNF- α . Este es el estímulo que induce mayor inflamación, evidenciado por el aumento significativo en la expresión de los marcadores p-I κ B y p-P65-NF- κ B (Figura 3A y 3B), aunque el TNF- α por sí solo también produzca inflamación es la combinación de ambos la que produce un aumento en la inflamación más eficaz y estadísticamente significativo.

El TNF- α activa principalmente la vía del NF- κ B, mientras que el IFN- γ activa la vía JAK/STAT, pero como se ha indicado en la introducción estas vías están interconectadas y hay cruce entre ellas, lo que se conoce como convergencia de señalización (18). El hecho de que el aumento significativo de la inflamación en las AC16 se produzca cuando se estimula conjuntamente con IFN- γ + TNF- α demuestra que esta convergencia da lugar a un efecto sinérgico, dando lugar a la conocida como convergencia de señalización de las cascadas de PI3K/AKT y NF- κ B.

Además, se ve que la inflamación es mayor en todos los casos con el estímulo TNF- α que con el IFN- γ , esto concuerda con el hecho de que el TNF- α activa directamente la vía de NF- κ B y a su vez, NF- κ B induce la producción de más TNF- α , creando un ciclo de retroalimentación positiva que amplifica la inflamación. Mientras que el IFN- γ activa la vía JAK/STAT, no la NF- κ B directamente, por eso el efecto proinflamatorio es mayor con el TNF- α que con el IFN- γ cuando se comparan de forma independiente. Sin embargo, está demostrado que el mayor aumento de inflamación se produce con la sinergia IFN- γ + TNF- α al generar un ciclo que se retroalimenta a sí mismo, cuando el TNF- α activa la vía de NF- κ B y el NF- κ B induce la producción de más TNF- α , amplificando así la inflamación, por lo tanto, concluimos que este modelo es útil para

investigaciones sobre inflamación cardíaca humana *in vitro*, y puede ser empleado para estudiar mecanismos patológicos, o evaluar fármacos antiinflamatorios o protectores cardiovasculares.

11.3 Conexina 43

Como se ha expuesto en los resultados, se ha observado un cambio en la localización y en la intensidad de la señal de la Conexina 43 (Cx43) en cardiomiocitos AC16 sometidos a un modelo *in vitro* de inflamación, mediante la estimulación con TNF- α e IFN- γ .

En las imágenes de inmunofluorescencia (Figuras 6 y 7), los controles (6A y 6B, 7A y 7B) presentan una intensa señal verde (FITC) correspondiente a la Cx43, mientras que las células estimuladas con citoquinas inflamatorias (6C y 6D) muestran una disminución significativa de dicha señal. Estos resultados concuerdan tanto en las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia convencional como en el microscopio confocal. Estos resultados indican que en presencia de inflamación se produce un cambio en la localización subcelular de la Cx43, además de que disminuye mucho la densidad de conexina presente en inflamación respecto al control, como se puede observar bien en la Figura 6. Como se comentó en la introducción la conexina suele encontrarse en las uniones tipo *gap* entre células, que en cardiomiocitos constituye un elemento clave en la comunicación eléctrica rápida y en transporte de iones en las uniones entre células. Esto lleva a pensar que durante la inflamación las Cx43 pueden ser reguladas de forma negativa mediante mecanismos como la fosforilación en residuos específicos (como Ser368), lo que reduce su apertura y, por tanto, la comunicación intercelular, lo que disminuiría su funcionalidad afectando a la patología cardíaca inflamatoria.

Por otro lado, la disminución de la expresión y localización de la conexina que se observa en los resultados (Figuras 6 y 7), concuerda con el hecho de que las citoquinas, entre ellas el TNF- α inducen cambios en la localización, distribución y expresión de la conexina en diferentes tipos celulares. Además de verlo en las imágenes el cambio en la intensidad y distribución, a través de la gráfica de la Figura 8 se ve una clara disminución de la presencia de FITC, correspondiente con la conexina 43, en el caso de TNF- α + IFN- γ respecto al control. Se sabe que la presencia de inflamación en los cardiomiocitos puede favorecer la internalización de Cx43 o su redistribución desde las uniones *gap* intercelulares hacia el citoplasma, lo que compromete la conectividad eléctrica entre cardiomiocitos y puede facilitar la aparición de arritmias (20,22).

En diferentes artículos también se describe un cambio en la liberación de ATP por parte de los cardiomiocitos influido por la relocalización de la Cx43, en el entorno inflamatorio. Esto afecta a la homeostasis tisular cardíaca y también a la respuesta inmune local, no solo una menor expresión de la proteína, sino también un cambio funcional hacia una respuesta celular alterada, con menos capacidad de comunicación intercelular y mayor vulnerabilidad frente al daño inflamatorio.

Concluimos que este cambio observado en los resultados de la localización de la Cx43 desde una localización en los espacios intercelulares hacia el citoplasma refleja no solo la inflamación celular, sino también un posible cambio en la funcionalidad de las células, que pasan a tener una respuesta celular alterada con menor capacidad de comunicación entre ellas y estar más vulnerables frente a la inflamación. Los hallazgos en este trabajo concuerdan con el hecho de que la inflamación modula la expresión y localización de la conexina 43, y añaden que este suceso también se cumple en cardiomiocitos AC16 en modelos celulares *in vitro*.

No se ha establecido una estadística, porque el experimento solo se ha realizado en estas condiciones una vez por falta de tiempo, para obtener resultados estadísticamente significativos habría que repetirlo por lo menos hasta $n = 3$. Sin embargo, dado que los resultados de confocal y del microscopio de fluorescencia son coherentes, cabría esperar un resultado en la misma línea.

11.4 Ácido oleanólico

Tras el análisis experimental de los modelos inflamatorios con el ácido oleanólico se comprueba que no se produce una disminución estadísticamente significativa de la inflamación con el uso de OA en los cardiomiocitos estimulados con $\text{TNF-}\alpha + \text{IFN-}\gamma$.

En otros artículos se logra disminuir las citocinas proinflamatorias plasmáticas como el $\text{TNF-}\alpha$ y el $\text{IL-1}\beta$ con la aplicación del OA en ratas (28), o también se ha visto la disminución de citocinas proinflamatorias $\text{TNF-}\alpha$ y IL-4 estudiando el $\text{p-I}\kappa\text{B}$ y el $\text{NF}\kappa\text{B}$ (29).

Por lo que esto podría indicar que el OA no es capaz de disminuir la inflamación causada por $\text{TNF-}\alpha + \text{IFN-}\gamma$ en cardiomiocitos ya que no se consigue disminuir la inflamación a través de las vías de señalización $\text{NF}\kappa\text{B}$ y PIKB/Akt .

Se comprueba con estos resultados que en esta línea celular cardíaca AC16 el Ácido oleanólico a las dosis no tóxicas de 5 μM , 10 μM y 20 μM , no disminuye de forma estadísticamente significativa la inflamación causada por las citoquinas proinflamatorias $\text{TNF-}\alpha$ y $\text{IFN-}\gamma$. Aunque existen artículos en los que el OA ha conseguido disminuir la inflamación causada por citoquinas proinflamatorias, en este caso con los cardiomiocitos AC16 a estas dosis eso no es así. En nuestro caso, el OA presenta citotoxicidad a 30 μM , lo cual limita su uso potencial como agente terapéutico en este modelo.

Conclusiones

Las conclusiones que se han obtenido tras la realización de este trabajo son las siguientes:

- I. La combinación de citoquinas IFN- γ + TNF- α produce una respuesta en los cardiomiocitos AC16 a través de la activación de la vía del NF- κ B.
- II. El LPS no es un estímulo inflamatorio robusto para generar inflamación en los cardiomiocitos AC16.
- III. La cantidad de Conexina 43 en los cardiomiocitos AC16 disminuye con los estímulos inflamatorios y su localización se modifica, pasando de las uniones tipo *gap* al citoplasma.
- IV. Las dosis adecuadas del extracto de ácido oleanólico empleados para realizar experimentos en la línea celular de cardiomiocitos AC16 son 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M.
- V. El ácido oleanólico es tóxico para los cardiomiocitos AC16 a dosis mayores de 30 μ M.
- VI. El ácido oleanólico no es útil en cardiomiocitos AC16 a dosis de 5 μ M, 10 μ M o 20 μ M, ya que no disminuye de forma significativa la activación producida por las citoquinas IFN- γ + TNF- α .

Algunas de estas conclusiones necesitarían de mayor número de experimentos para poder generar una estadística sólida que respalde de forma adecuada las afirmaciones aquí recogidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell*. 24 de abril de 2014;54(2):281-8.
2. Hannoodde S, Nasuruddin DN. Acute Inflammatory Response. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [citado 11 de junio de 2025]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>
3. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. agosto de 2011;1812(8):1007-22.
4. Basso C, Calabrese F, Angelini A, Carturan E, Thiene G. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev*. 1 de noviembre de 2013;18(6):673-81.
5. Lieberman EB, Hutchins GM, Herskowitz A, Rose NR, Baughman KL. Clinicopathologic description of myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. diciembre de 1991;18(7):1617-26.
6. Rose NR. Critical Cytokine Pathways to Cardiac Inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. octubre de 2011;31(10):705-10.
7. Tschöpe C, Ammirati E, Bozkurt B, Caforio ALP, Cooper LT, Felix SB, et al. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. *Nat Rev Cardiol*. marzo de 2021;18(3):169-93.
8. Boulet J, Sridhar VS, Bouabdallaoui N, Tardif JC, White M. Inflammation in heart failure: pathophysiology and therapeutic strategies. *Inflamm Res*. 2024;73(5):709-23.
9. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 1 de septiembre de 2008;112(5):1557-69.
10. ResearchGate [Internet]. [citado 9 de junio de 2025]. Potential role of nutraceuticals via targeting a Wnt/ β -catenin and NF- κ B pathway in treatment of osteoarthritis. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/363866652_Potential_role_of_nutraceuticals_via_targeting_a_Wntb-catenin_and_NF-kB_pathway_in_treatment_of_osteoarthritis
11. Torrealba N, Vera R, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Paniagua R, Royuela M. TGF- β /PI3K/AKT/mTOR/NF- κ B pathway. Clinicopathological features in prostate cancer. *Aging Male Off J Int Soc Study Aging Male*. diciembre de 2020;23(5):801-11.
12. Karin M. NF- κ B and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog*. junio de 2006;45(6):355-61.
13. Hayden MS, Ghosh S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*. 8 de febrero de 2008;132(3):344-62.
14. Coope A, Pascoal LB, da Silva FAR, Botezelli JD, Ayrizono M de LS, Milanski M, et al. Transcriptional and Molecular Pathways Activated in Mesenteric Adipose Tissue and Intestinal Mucosa of Crohn's Disease Patients. *Int J Inflamm*. 2017;2017:7646859.
15. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2 de enero de 2012;26(3):203-34.

16. ResearchGate [Internet]. [citado 11 de junio de 2025]. Exercise reduces intramuscular stress and counteracts muscle weakness in mice with breast cancer. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/358641910_Exercise_reduces_intramuscular_stress_and_counteracts_muscle_weakness_in_mice_with_breast_cancer
17. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 29 de junio de 2007;129(7):1261-74.
18. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 14 de julio de 2017;2(1):1-9.
19. Ahn D ho, Crawley SC, Hokari R, Kato S, Yang SC, Li JD, et al. TNF-alpha activates MUC2 transcription via NF-kappaB but inhibits via JNK activation. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2005;15(1-4):29-40.
20. Kameritsch P, Pogoda K. The Role of Connexin 43 and Pannexin 1 During Acute Inflammation. *Front Physiol*. 2020;11:594097.
21. Sáez JC, Contreras-Duarte S, Gómez GI, Labra VC, Santibañez CA, Gajardo-Gómez R, et al. Connexin 43 Hemichannel Activity Promoted by Pro-Inflammatory Cytokines and High Glucose Alters Endothelial Cell Function. *Front Immunol*. 2018;9:1899.
22. Barreto BC, Neves MVG das, Cardoso CMA, Meira CS, Daltro PS, Figueira CP, et al. The effects of inflammation on connexin 43 in chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Front Immunol*. 2024;15:1440662.
23. Sorrenti V, Burò I, Consoli V, Vanella L. Recent Advances in Health Benefits of Bioactive Compounds from Food Wastes and By-Products: Biochemical Aspects. *Int J Mol Sci*. 19 de enero de 2023;24(3):2019.
24. Castellano JM, Ramos-Romero S, Perona JS. Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity. *Nutrients*. 31 de enero de 2022;14(3):623.
25. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L, et al. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. julio de 2005;39(1):133-47.
26. Ácidooleanólico. En: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2023 [citado 21 de junio de 2025]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/ácido_oleanólico#/media/Archivo:Oleanolic_acid.png
27. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. En: Markossian S, Grossman A, Baskir H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editores. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [citado 13 de junio de 2025]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
28. Gamede M, Mabuza L, Ngubane P, Khathi A. Plant-derived oleanolic acid ameliorates markers of subclinical inflammation and innate immunity activation in diet-induced pre-diabetic rats. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 27 de julio de 2020;11:2042018820935771.
29. Kim YY, Lee S, Kim MJ, Rho MC, Jang YH, Kim SH. Oleanolic Acid Acetate Inhibits Mast Cell Activation in Ovalbumin-Induced Allergic Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res*. marzo de 2023;15(2):214-30.

