

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Departamento de Sistemas Biológicos**  
**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

**Título del proyecto:**

**Efecto del NaHS sobre el estrés oxidante en cardiomiocitos sometidos a  
hipoxia/reoxigenación**

**Presenta:**

**Christopher Koen Rivas Juárez**

**Asesores:**

**Dra. María de la Luz Ibarra Lara**

**Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha**

**Lugar de realización:**

**Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

# Índice

## 1.0 Introducción

## 2.0 Marco teórico

2.1 Epidemiología de enfermedades cardiovasculares

2.2 Isquemia-reperfusión cardiaca

2.3 Hipoxia-reoxigenación en cardiomiocitos

2.4 Estrés oxidativo

2.5 Especies reactivas de oxígeno

2.6 Fuentes de especies reactivas de oxígeno

2.7 Moléculas antioxidantes

2.8 Sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S)

## 3.0 Justificación

## 4.0 Aporte a la sociedad

## 5.0 Objetivo general

## 6.0 Objetivos específicos

## 7.0 Metodología

7.1 Materiales

7.2 Métodos

7.2.1 Animales de laboratorio

7.2.2 Cultivo de miocitos

7.2.3 Hipoxia-reperfusión

7.2.4 Viabilidad celular

7.2.5 Microscopía electrónica

7.2.6 Malondialdehído (MDA)

7.2.7 8-Hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-2-dG)

7.2.8 Expresión de eNOS, eNOS-p, SOD-Cu<sup>2+</sup> /Zn<sup>2+</sup>, SOD-Mn<sup>2+</sup>, Catalasa, NOX-4, p47 phox.

## 8.0 Resultados

8.1 Evaluación de HIF1 $\alpha$

- 8.2 Evaluación de la Viabilidad Celular
- 8.3 Evaluación de la Ultraestructura de los Cardiomiocitos
- 8.4 Evaluación del Efecto Antioxidante
- 8.5 Evaluación de la Expresión de las Subunidades de la Enzima NADPH Oxidasa
- 8.6 Evaluación de Indicadores de Estrés Oxidante
- 8.7 Evaluación de Indicadores de Daño Nuclear
- 8.8 Evaluación de la Expresión de eNOS y eNOS Ser<sup>1177</sup>
- 8.9 Evaluación de la Expresión de PPAR $\alpha$
- 9.0 Conclusiones
- 10.0 Bibliografía

## **1. Introducción**

Las enfermedades cardiovasculares son una de las causas de muerte más frecuentes a nivel mundial, siendo las más usuales el infarto al miocardio; en México, para 2016 se reportaron tan solo 177 mil muertes por enfermedades vasculares, las cuales son causadas principalmente por las condiciones de vida del mexicano promedio. Estas afecciones cardíacas toman una gran importancia debido a que generan secuelas que repercuten la calidad de vida humana, siendo una de estas la isquemia-reperusión cardíaca.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar si el tratamiento con NaHS: (1) disminuye la producción de estrés oxidante, (2) aumenta la expresión de enzimas involucradas en la regulación del estado redox y (3) mejora la viabilidad y ultraestructura de los cardiomiocitos específicamente la mitocondria todo esto en un en un modelo de cardiomiocitos sometidos a HR (2 horas hipoxia / 1 hora de reoxigenación, también conocido como reperusión). Para ese propósito, los cultivos de cardiomiocitos se dividieron en 3 grupos principales: (1) Grupo control y (2) Grupo sometido a H/R 3) Grupo H/R+NaHS (100  $\mu$ M). La H/R (se realizó a través de bolsas gaspack); Los resultados indican que la viabilidad celular disminuye en los grupos de cardiomiocitos sometidos a H/R, mientras que el tratamiento con NaHS mejora la viabilidad celular. Al evaluar a la NADPH oxidasa principal (fuente de EROs), se observó que en H/R, la expresión de las subunidades de esta enzima aumenta, mientras que el tratamiento con NaHS disminuye su expresión. Las enzimas antioxidantes SODCu<sup>2+</sup> / Zn<sup>2+</sup> y SODMn<sup>2+</sup> y la capacidad antioxidante se incrementan en los cardiomiocitos tratados

con NaHS, mientras que en H/R disminuye su expresión. Debido al alto estrés oxidante, las macromoléculas importantes en el cardiomiocito como el ADN y los lípidos de las membranas celulares se dañan; el tratamiento con NaHS protege de su degradación a estas macromoléculas. Al realizar la técnica de microscopía electrónica se observó que la H/R altera la ultraestructura del cardiomiocito principalmente la mitocondria y el núcleo; el NaHS atenúa los daños ocasionados a la ultraestructura del cardiomiocito. Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que el tratamiento con NaHS protege al cardiomiocito del estrés oxidativo producido por H/R, mejorando con ello la viabilidad y la ultraestructura.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Epidemiología de enfermedades cardiovasculares**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, anualmente se registran alrededor de 17 millones de muertes a causa de enfermedades cardiovasculares, donde se incluye el infarto al miocardio; y se estima que para el año 2030, el número aumente hasta 23.6 millones de muertes al año. En México, la Secretaría de Salud reportó 177 mil muertes por enfermedades cardiovasculares, siendo una de las principales causas de muerte en el país; esto derivado de las condiciones de vida en las que vive un mexicano promedio y la alta exposición a factores de riesgo tales como el tabaquismo, presión elevada alta, colesterol elevado y diabetes no controlada (Sánchez et al., 2016).

### **2.2 Isquemia-reperfusión cardiaca**

La isquemia es un trastorno que se caracteriza por la deficiencia en el transporte de oxígeno a los tejidos celulares, este tipo de trastorno se presenta cuando existe una afección cardiaca como un infarto al miocardio; ocasionado por obstrucciones en las arterias pericárdicas, lo que da lugar a la reducción del flujo coronario y conduciendo a la isquemia miocárdica. Cuando el miocardio sufre una isquemia, se lleva a cabo un proceso de reperfusión sanguínea, lo que generalmente genera un daño mayor que cuando solo se presenta la isquemia (Moreu y Macaya, 2007).

### **2.3 Hipoxia-reoxigenación en cardiomiocitos**

Los procesos de isquemia- reperfusión se conocen como hipoxia-reoxigenación (reperfusión) para el caso de los medios de cultivo de cardiomiocitos. La hipoxia se define como la disminución en el aporte de nutrientes y oxígeno a los tejidos celulares, donde el consumo de estos se vuelve dependiente del proceso, a esto se le conoce como deuda de oxígeno; por otro lado, la reperfusión se conoce como el restablecimiento de oxígeno para evitar o disminuir el daño celular en el tejido afectado (Sanabria, 2000). Ambos procesos repercuten de manera negativa en los cardiomiocitos, debido a que desencadenan respuestas de estrés oxidativo dando lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno.

#### **2.4 Estrés oxidante (EOx)**

Es un proceso el cual se caracteriza por un desequilibrio químico entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) con respecto a la cantidad de antioxidantes presentes en el medio tisular; está implicado en el proceso de homeostasis del organismo debido a que genera daños a nivel celular, tisular y sistémico (Rosado, 2007). Actualmente, se ha asociado el EOx con enfermedades crónico-degenerativas tales como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, el cáncer, insuficiencia hepática, entre otras (Elejalde, 2001).

#### **2.5 Especies reactivas de oxígeno (EROs)**

Las EROs oxígeno, también conocidas como radicales libres (RL); son átomos o moléculas que en su última capa energética presentan un electrón no apareado, lo que le confiere una actividad altamente reactiva e inestable. Esto puede generar complicaciones a nivel de la fisiología celular debido a que pueden reaccionar con diferentes tipos de biomoléculas, tales como lípidos membranales, carbohidratos, proteínas o incluso el propio ADN; esto lo hacen tomando la densidad electrónica de la molécula más cercana dejando esa molécula inestable químicamente. Algunos de los principales EROs producidos por el organismo son: el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) y el radical peróxido ( $\text{ROO}^\cdot$ ) (Konigsberg, 2008).

#### **2.6 Fuentes de especies reactivas de oxígeno**

Las EROs se pueden generar a nivel tanto intracelular como extracelular, que pueden provenir de fuentes enzimáticas y no enzimáticas. En el caso de las fuentes enzimáticas, involucran la presencia de moléculas como las de transferencia de electrones a nivel

mitocondrial y a nivel retículo endoplásmico; enzimas oxidantes como la xantina oxidasa y NADPH oxidasa (NOX), y las enzimas presentes en los peroxisomas como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; y en el caso de las fuentes no enzimáticas, involucran moléculas como las flavinas reducidas, tioles y moléculas pequeñas tales como hidroxiquinonas, catecolaminas y tetrahidropterinas (Cadenas, 2018).

El incremento del estrés oxidativo puede resultar de un aumento en la producción de EROs, estos a su vez pueden interactuar con una variedad de moléculas y producir daños celulares; de las cuales se incluyen membranas fosfolipídicas, proteínas y ácidos nucleicos. En el caso de la interacción con ácidos nucleicos, las bases púricas son las más susceptibles a sufrir daños debido a su estructura molecular, la cual permite la fácil extracción de H por parte de la EROs; las modificaciones más frecuentes suelen darse en la guanina, lo que da lugar a la 8- hidroxí-2-deoxiguanosina (8-OHdG), la relación de concentraciones entre 8-OHdG/dG se considera un marcador por excelencia del daño oxidativo causado por los RL sobre el ADN. Por otro lado, la interacción de EROs con lípidos en especial con ácidos grasos insaturados permite la acumulación de hidroperóxidos que finalmente se descomponen en una gran variedad de productos terminales en donde principalmente se encuentra el malondialdehído (MDA), la cual modifica la permeabilidad membranal y la fluidez de esta (Konigsberg, 2008).

Otra molécula de importancia es el óxido nítrico (NO), un radical libre gaseoso que actúa como un mensajero intracelular y transcelular, puede ser producido por prácticamente todas las células del corazón, actuando como regulador paracrino, autocrino e intracrino de la función cardíaca a través de acciones directas sobre los cardiomiocitos. Su síntesis se encuentra estrictamente regulada en condiciones fisiológicas por una familia de enzimas conocidas como NO sintasas (NOS), las cuales se encuentran presentes en condiciones fisiológicas en el endotelio (*eNOS* o *NOS3*) y las neuronas (nNOS o *NOS1*), la principal regulación postranscripcional de eNOS tiene lugar a través de la fosforilación de la Ser1177, que aumenta su actividad (Rang et al., 2016).

## **2.7 Moléculas antioxidantes**

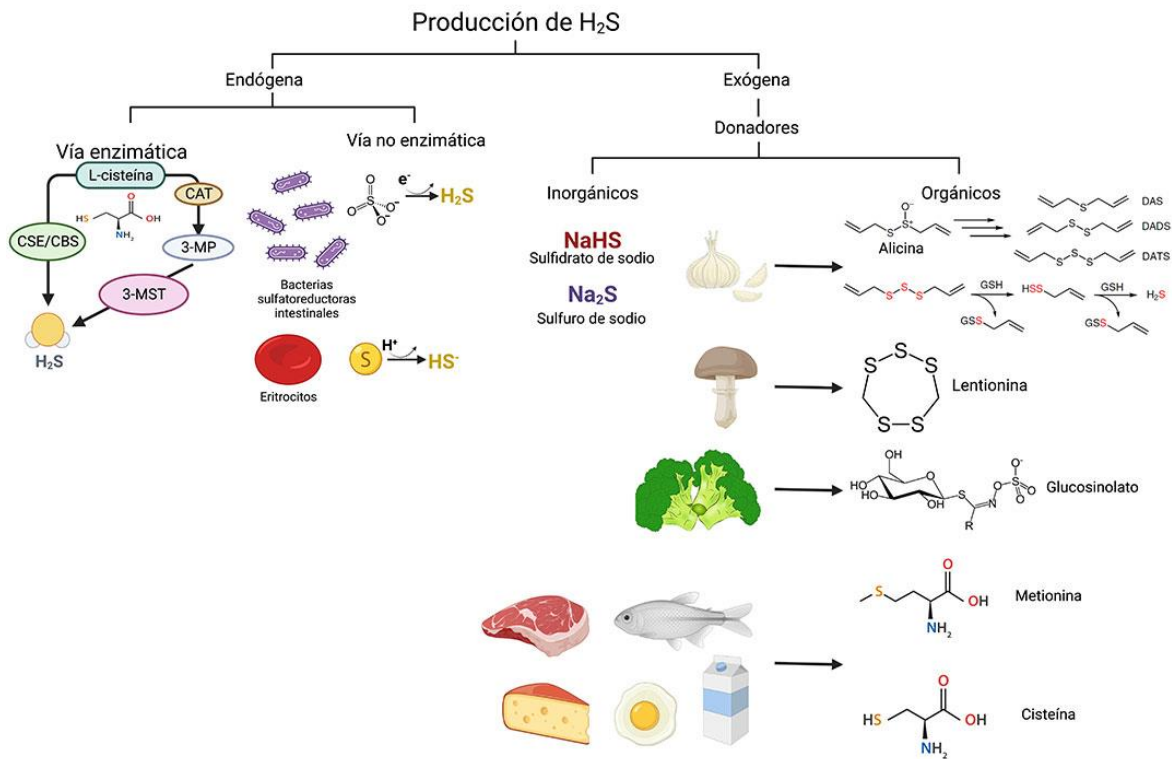
Una molécula se considera como antioxidante cuando su afinidad hacia las EROs es mayor en comparación a otras especies moleculares, su mecanismo básicamente consiste en ceder

densidad electrónica a la ERO donde ocurre una reacción REDOX, dando lugar a un RL débil y no tóxico. Algunos de los antioxidantes más importantes son el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el Nrf2; que actúan como primera línea de defensa ante el estrés oxidante en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (M.R., 2010).

## **2.8 Sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S)**

Es un gas con actividades biológicas y de naturaleza lipídica, lo que le da una buena permeabilidad membranal, su principal función es la de señalización celular de diversos tejidos producido a partir de aminoácidos como cisteína y homocisteína. Se ha reportado que posee diversos efectos biológicos, siendo los más destacables los de neuromodulador y la función vascular (Powell, 2018).

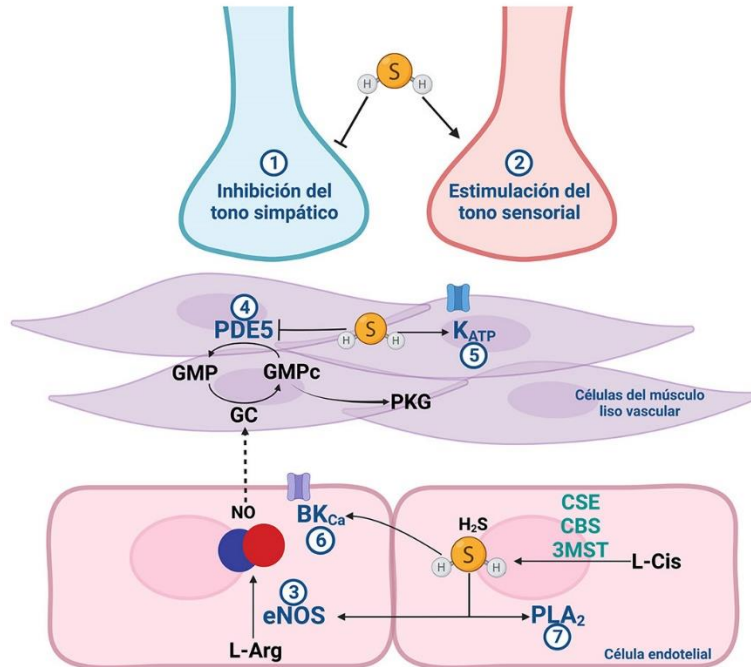
A la fecha, el H<sub>2</sub>S se sintetiza endógenamente por: (1) vías no enzimáticas en células propias de nuestro organismo y bacterias de la microbiota a través del metabolismo de la glucosa, polisulfuros y aminoácidos que contienen grupos sulfuro, y (2) vías enzimáticas que incluyen a la cistationin- $\gamma$ -liasa (CSE), cistationin- $\beta$ -sintetasa (CBS), y 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST) (**Figura 1**). Para mantener un balance de los niveles endógenos, el H<sub>2</sub>S es metabolizado a través de 3 rutas que incluyen reacciones de oxidación en la mitocondria, la metilación (adición de un grupo metilo) por acción de la enzima tiol-S-metiltransferasa, y la unión a la hemoglobina.



**Figura 1.-** Producción de H<sub>2</sub>S endógena y exógena.

El H<sub>2</sub>S inhibe el sistema nervioso autónomo simpático y estimula el sistema nervioso sensorial. Además, el H<sub>2</sub>S activa a la eNOS para promover la liberación de NO. El NO difunde hacia las células del músculo liso vascular donde activa a la enzima GC y genera GMPc que impulsa la actividad de la enzima PKG para producir relajación. El GMPc es degradado por la enzima PDE5, el H<sub>2</sub>S al inhibir a la PDE5 potencia la relajación inducida por el NO. El H<sub>2</sub>S regula KATP en las células del músculo liso vascular para provocar relajación, y al BKCa en las células endoteliales para promover la generación de NO. Por último, el H<sub>2</sub>S modula la vía del ácido araquidónico a través de la enzima PLA2 (Abe & Kimura, 1996).





**Figura 2.-** Inhibición del sistema nervioso simpático y estimulación del sistema nervioso sensorial en presencia de H<sub>2</sub>S.

En concentraciones fisiológicas, induce la relajación del tejido aórtico y la reducción de la presión arterial en respuesta a la estimulación directa de los canales K<sub>ATP</sub> y la hiperpolarización del músculo liso vascular.

Para el estudio de los efectos del H<sub>2</sub>S se suelen utilizar derivados orgánicos o inorgánicos del mismo, uno de los más utilizados es el hidrosulfuro de sodio (NaHS) ya que en solución tiene la capacidad de unirse a los H<sup>+</sup> proporcionados por el agua y formar H<sub>2</sub>S, llevando a cabo una reacción inmediata que da lugar a altos picos de concentraciones de H<sub>2</sub>S de manera muy rápida, que a su vez declinan muy rápido debido las propiedades físicas del mismo (Papapetropoulos et al., 2015).

Los productos naturales capaces de liberar H<sub>2</sub>S pueden actuar como donadores exógenos de H<sub>2</sub>S. Los compuestos comúnmente aislados de los productos naturales de azufre son los polisulfuros sustituidos con alilo (principalmente en forma de disulfuros, trisulfuros y tetrasulfuros), haciéndolos potenciales liberadores de persulfuros o H<sub>2</sub>S.

En alimentos del género *Allium* (ajos, cebollas, puerros, echalotes, entre otros), se han identificado y aislado diversos productos que contienen polisulfuros, principalmente trisulfuros y tetrasulfuros. Estos polisulfuros orgánicos proporcionan una fuente de azufre que puede convertirse en H<sub>2</sub>S tras su reducción. Particularmente, en el ajo se ha encontrado la presencia de alicina, una molécula que al descomponerse forma una variedad de combinaciones ricas en azufre, incluidos el sulfuro de dialilo (DAS), el disulfuro de dialilo (DADS) y el trisulfuro de dialilo (DATS), los cuales liberan H<sub>2</sub>S en presencia de glutatión reducido (GSH). Esto ha hecho que a estos alimentos se les atribuyan actividades vasoactivas importantes que contribuyen a tener impactos positivos en la amortiguación de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares (Moore y Whiteman, 2015).

### **Efectos del H<sub>2</sub>S en el corazón**

El corazón posee tres propiedades funcionales que permiten su correcto funcionamiento: inotropismo (contractilidad), cronotropismo (automatismo) y dromotropismo (conductibilidad). En años recientes, al H<sub>2</sub>S se le han atribuido efectos de cardioprotección y cronotropismo e inotropismo negativos por medio de la activación de canales K<sub>ATP</sub>. Además, diversos estudios destacan el papel del H<sub>2</sub>S en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular en condiciones patológicas que incluyen la isquemia miocárdica, insuficiencia e hipertrofia cardíaca. Las concentraciones endógenas de H<sub>2</sub>S se encuentran disminuidas durante la hipertrofia Cardíaca (HC). De hecho, en modelos animales se observa que la Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC) que se desarrolla en respuesta a la hipertensión arterial es mayor en los ratones que carecen de la enzima CSE, y que la administración de un donador de H<sub>2</sub>S disminuye la HC y la fibrosis cardíaca. Adicionalmente, el H<sub>2</sub>S mejora la función cardíaca en modelos de ICC mediante la supresión de respuestas inflamatorias. Asimismo, disminuye el tamaño del infarto en el ventrículo izquierdo y la mortalidad asociada con la isquemia miocárdica en modelos animales (Wang, 2012).

### **3.- Justificación**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que anualmente 17 millones de personas fallecen a causa de enfermedades cardiovasculares; lo que para el año 2030 se

estima que el número aumente a 23.6 millones de personas. En México, solamente para el año 2021 se presentaron alrededor de 177 mil muertes por enfermedades cardiovasculares, derivado de factores de riesgo tales como el tabaquismo, presión elevada alta, colesterol elevado y diabetes no controlada; estos factores de riesgo los se expresan en una gran parte de la población mexicana debido a las condiciones de vida en las que vive el mexicano promedio, donde influyen tanto factores culturales, sociales y ambientales como el estilo de vida, la alimentación y ejercicio.

Estas afecciones cardiacas generan trastornos celulares a nivel del miocardio, siendo una de estas la hipoxia/reperfusión, lo que subsecuentemente puede generar daños perjudiciales al corazón, debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno, afectando la funcionalidad de este de manera permanente o desgastando su actividad fisiológica aceleradamente.

El presente trabajo de investigación busca evaluar la actividad del NaHS ante el efecto hipoxia/reperfusión en cardiomiocitos sometidos a tales condiciones; para dar paso en un futuro a tratamientos con NaHS que coadyuven al tratamiento del infarto agudo al miocardio.

#### **4. Aporte a la sociedad**

El conocer la actividad antioxidante del NaHS para proponer nuevas terapias farmacológicas que coadyuven en el tratamiento del infarto agudo al miocardio en pacientes que padezcan esta enfermedad.

#### **5. Objetivo general**

Evaluar la actividad farmacológica del NaHS en cardiomiocitos sometidos a hipoxia/reperfusión.

#### **6. Objetivos específicos**

- I. Evaluar la viabilidad celular en cardiomiocitos sometidos a hipoxia/reperfusión y tratados con NaHS.
- II. Determinar el efecto del NaHS sobre marcadores de daño celular.
- III. Evaluar si el NaHS disminuye la expresión de subunidades de la NADPH oxidasa principal productor de especies reactivas de oxígeno.
- IV. Determinar si el tratamiento con NaHS en cardiomiocitos sometidos a

- V. hipoxia/reperfusión aumenta la participación de enzimas antioxidantes como (SOD-Cu<sup>2+</sup> /Zn<sup>2+</sup>, SOD-Mn<sup>2+</sup> y catalasa, en cultivos de cardiomiocitos.
- VI. Determinar ultraestructural mente el efecto del NaHS sobre el daño mitocondrial en cardiomiocitos sometidos a hipoxia/reperfusión.

## **7. Metodología**

### **7.1 Materiales**

Los siguientes materiales se obtuvieron de BioRad: acrilamida, beta mercaptoetanol, bis-acrilamida, glicina, leche descremada, glutaraldehído, marcador de peso molecular SDS-PAGE, SDS, TEMED, Tris base; de Sigma se obtuvieron: albúmina sérica bovina, fenofibrato, EDTA, etanol absoluto, glicerol, HCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, tris-HCl, tritón X-100, tween20, tetraóxido de osmio, cacodilato, EPON 812, acetato de uranilo; de roche daignostics: complete (inhibidor proteasas); de Merck: rojo de fenol, éter etílico; de técnica química: KCl; de Calbiochem: metanol absoluto; de J.T.Baker: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaCl, NaF, manitol, hidróxido de sodio, persulfato de amonio; de Delmed: solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%; de Gibco: medio F-10 (1X), 0.25% tripsina (1X), anti-anti (100X) antibiótico-antimicótico HI FBS suero fetal bovino, d-glucose USP (dextrosa); de Biopack; ácido tricloroacético; de Fischer scientific: azul de tripán, metanol.

### **7.2 Métodos**

#### **7.2.1 Animales de laboratorio**

Para la realización del presente trabajo se utilizaron ratas neonatas Wistar, tanto machos como hembras, de aproximadamente 1 a 3 días de nacidas; las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos del comité de bioética, así como con lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

#### **7.2.2 Cultivo de miocitos**

Se seleccionaron aleatoriamente 35 ratas neonatas Wistar de 1 a 3 días de nacidas, las cuales se sumergieron en alcohol al 70%, y se decapitaron para realizar una toracotomía para extraer el corazón, el cual se sumergió en 5 ml de una solución de PBS completo. Una vez obtenidos todos los corazones, se limpiaron las cajas Petri y se llevaron a la campana de flujo laminar. Cada pedazo de corazón se cortó en fracciones muy finas y se lavaron de 5 a 6 veces con PBS completo. El tejido se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 20 mL, se le adicionaron 10 mL de tripsina y se removió durante 15 minutos con un agitador. Se repitió de 3 a 5 veces, las dos primeras agitaciones se desecharon, mientras que las agitaciones posteriores se recolectaron en un tubo con 2 mL de PBS completo y 5 mL de medio de cultivo completo frío. Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos; se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de medio completo; se dejó reposar durante 1 hora en la incubadora y posteriormente se sembraron las células.

Los cultivos celulares se dividieron en los siguientes grupos experimentales para determinar la viabilidad celular: grupo 1: control (sham), grupo 2: control (sham) tratado con PBS (vehículo del NaHS), grupo 3: control (sham) tratado con NaHS (100  $\mu$ M), grupo 4: control tratado con manitol, grupo 5: hipoxia reperfusión, grupo 6: hipoxia reperfusión tratado con NaHS (100  $\mu$ M). El PBS y el NaHS se administraron 60 minutos antes de someter el cultivo a hipoxia reperfusión.

### **7.2.3 Hipoxia-Reperfusión**

La hipoxia en los cultivos de miocitos se produjo colocando el cultivo en una bolsa Gas Pack EZ (El sistema de bolsa GasPak EZ BD ofrece la conveniencia de una bolsa integrada a un kit completo con todo lo necesario para generar un ambiente anaeróbico, microaerofílico o CO<sub>2</sub> entorno enriquecido para cajas de cultivo) durante 2 horas y se reperfundió por 1 hora (retirando el cultivo de la bolsa).

### **7.2.4 Viabilidad Celular**

La viabilidad celular se calculó como el número de células viables dividido por el número total de células dentro de las cuadrículas de la cámara de Neubauer. Si las células tomaron el azul tripán, se considerarán inviables. Se agregaron 0.1 mL de la solución stock de azul de tripán a 1 mL de células, se cargaron la cámara de Neubauer y se examinaron a un aumento

de 10x. Se contó el número de células teñidas de azul y el número total de células. La viabilidad celular deberá ser al menos del 95% para considerar un cultivo sano en fase-logarítmica. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el número de células viables por ml de cultivo: % células viables =  $[1.00 - (\text{Número de células azules} \div \text{Número de células totales})] \times 100$ .

### **7.2.5 Microscopía Electrónica**

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

### **7.2.6 Malondialdehído (MDA) indicador de daño nuclear**

Se desprotonó una suspensión de cardiomiocitos con metanol frío en proporción 1:1; y se centrifugó a 16'000xg durante 15 minutos, después, se filtró con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ ; el sobrenadante se diluyó 1:10 con hidróxido de sodio 0.1 M frío y se analizó directamente por electroforesis capilar con el sistema P/ACE TM MDQ de Beckman Coulter, al cual se agregó solución 0.1 M de hidróxido de sodio durante 10 minutos; agua destilada por espacio de 10 min y finalmente el amortiguador de corrida (boratos 10 mM + CTAB 0.5 mM a pH 9.0) durante 10 minutos, las muestras se inyectaron bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi/10 s; la separación se realizó a -25 kV durante 4 min a 267 nm; la concentración de MDA se expresó en  $\mu\text{M}$  y se determinó mediante una curva estándar.

### **7.2.7 8-Hidroxi-2-Deoxiguanosina (8-OH-2-dG), indicador de daño nuclear.**

La muestra de suspensión de miocitos se desprotonó con ácido tricloroacético al 20% en proporción 10:1. Se centrifugó a 16'000xg durante 15 minutos y se filtró con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ ; se diluyó 1:10 con hidróxido de sodio 2 M y se

analizó directamente por electroforesis capilar de zona y detección UV por arreglo de diodos, con el sistema P/ACE TM MDQ de Beckman Coulter, el cual se le agregó una solución 2 M de hidróxido de sodio durante 30 min, agua desionizada por espacio de 30 min y finalmente el amortiguador de corrida (boratos 10 mM a pH 9.0) durante 30 min. La muestra se inyectó bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi/10 s; la separación se realizó a 20 kV durante 8 min a 200 nm, los resultados se expresaron en pmoles/ml. La concentración de la 8-OH-2dG se determinará mediante una curva estándar.

### **7.2.8 Expresión de HIF-1 $\alpha$ , eNOS, eNOS-p, SOD-Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>, SOD-Mn<sup>2+</sup>, Catalasa, NOX-4, p47 phox.**

La separación de proteínas en las muestras se llevó a cabo mediante electroforesis con Miniprotean II de BioRad.

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

Gel de corrida poliacrilamida 12.5% para SOD-Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>, SOD- Mn<sup>2+</sup>: 5250  $\mu$ L agua desionizada, 3750  $\mu$ L de Tris-Cl/SDS pH 8.8, 6000  $\mu$ L de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%, 50  $\mu$ L de perisulfato de amonio 10%, 10  $\mu$ L de TEMED.

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

Se preparó el gel de corrida y se completó el volumen de la cámara con SDS al 1%, se niveló la cámara y se dejó polimerizar el gel de 30 a 40 minutos. 5 minutos antes, se inició la preparación del gel concentrador. Una vez listo el gel de corrida, se retiró el SDS (1%) y se enjuagó con agua desionizada, se secó con un papel filtro. Se insertó el peine y después de 10 a 15 minutos se retiró. Se colocaron suspensiones de miocitos en 50  $\mu$ L de solución buffer de carga con concentración de proteína de 30-80  $\mu$ g.

Se corrió la electroforesis usando buffer de corrida de Tris-Glicina-SDS pH 8.3, a 100 mV durante 2 horas. Se usarán marcadores de peso molecular prestained SDS-PAGE Standard, high range, y BioRad. Posteriormente, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa

(PVDF) con el sistema Trans-Blot SD Semydry Transfer Cell de BioRad. Se prehumedeció la membrana de PVDF en metanol absoluto por 1 minuto aproximadamente y después en buffer de transferencia por otros 5 minutos. Después, se llevó a cabo la transferencia a 110 mA por una hora. Al finalizar, se dejó la membrana con solución bloqueadora de PBS-leche al 5% por 1 hora. Después, se incubó con el anticuerpo primario según lo muestra la siguiente tabla (**tabla 1**):

**Tabla 1.-** Incubación de anticuerpos primarios y las diluciones que se llevaron a cabo.

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>
eNOS (anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%
SOD Mn <sup>2+</sup> (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:50 en PBS-leche 1%
SOD Cu <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup> (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%
NOX-4 (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%
HIF 1 $\alpha$ (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%
p47phox (Anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz Biotechnology)	1:100 en PBS-leche al 1%

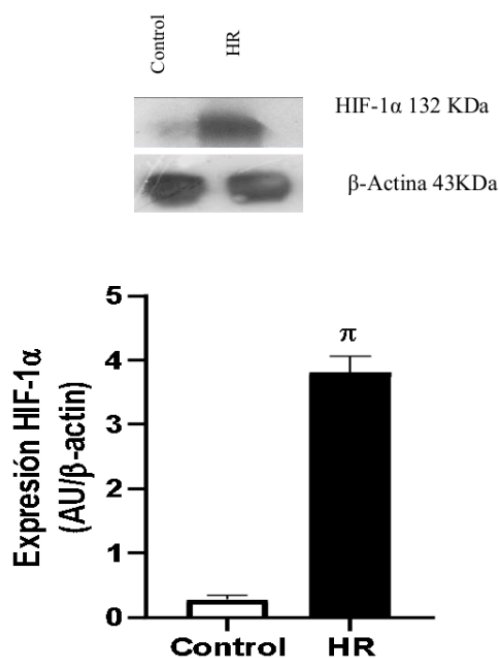
La incubación se llevó a cabo por 12 horas a 4°C, posteriormente; se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (1%) por 15 minutos cada uno, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1.3000 en PBS-leche al 1% por 1 hora, se lavó 3 veces con PBS-Tween (0.05%) por 15 minutos cada uno. El revelado se llevó a cabo usando quimioluminiscencia de acuerdo con el protocolo del fabricante (Immobilon Western chemiluminescent HPR substrate, Millipore). Utilizando una película kodak MXB durante 1 minuto. Se reveló la película y se llevó a cabo la cuantificación de la proteína existente por densitometría, utilizando el sistema KODAK EDAS 120 system.



## 8.- Resultados

### 8.1 Evaluación de HIF1- $\alpha$ como marcador de la presencia de hipoxia

Para asegurar que las condiciones de hipoxia-reperfusión en los cardiomiocitos fuera exitosa, se evaluó la presencia de los factores inducibles por hipoxia (HIF's), la expresión de estos factores se muestra en la **figura 3**, donde se observa que en el grupo control hay baja presencia de estos, y en el caso del grupo HR se observa una mayor presencia del gen.



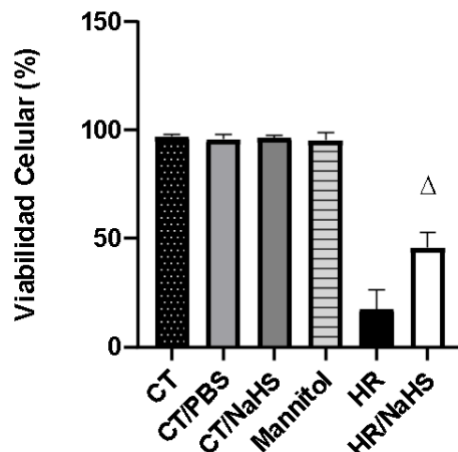
**Figura 3.-**Expresión de HIF1 $\alpha$  en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia/reperfusión. La detección de los niveles de la expresión se realizó a través de Western Blot.

Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M) de 5 experimentos diferentes.

### 8.2 Evaluación de la viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular para cada grupo de cardiomiocitos, donde se observa que los grupos CT, CT/PBS, CT/NaHS y Mannitol presentan una viabilidad celular de aproximadamente 100%, y para los grupos HR se observa una baja viabilidad celular, con un 20% mientras que el grupo tratado con NaHS aumenta su viabilidad celular. Por lo que las

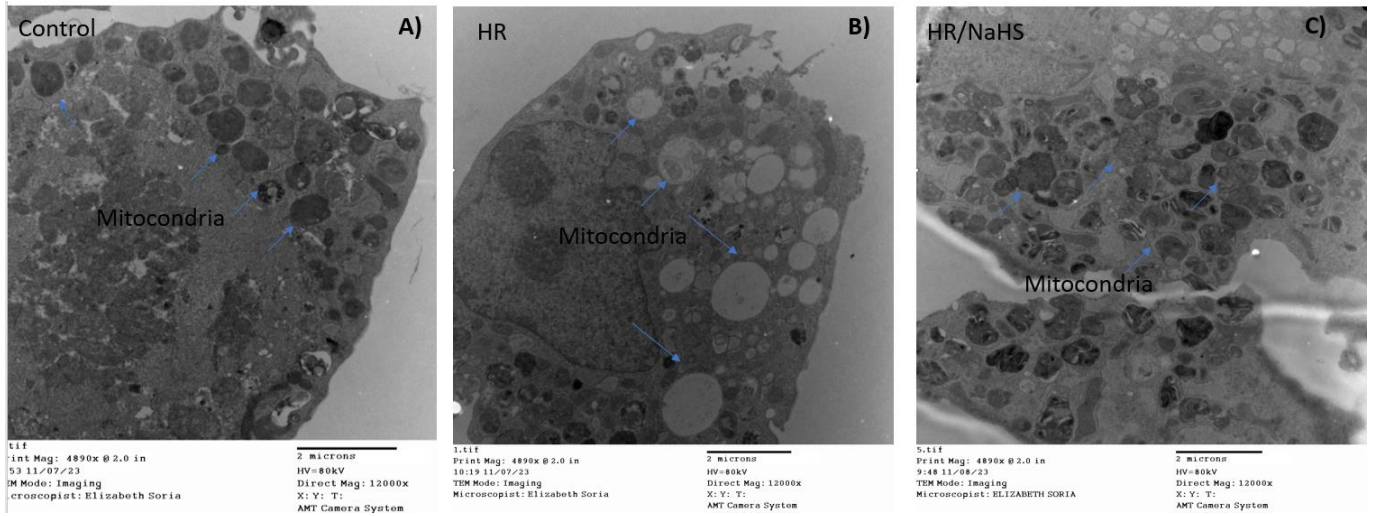
condiciones de HR afectan drásticamente la viabilidad celular de los cardiomiocitos, y que el NaHS ayuda a que la viabilidad celular no se vea afectada de manera significativa. Los resultados se presentan gráficamente en la **figura 4**.



**Figura 4.-** El NaHS disminuyó la muerte celular en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia/reperfusión (HR). La viabilidad se realizó con azul de tripán. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de una vía, pos hoc de Tukey  $\blacktriangle$   $p < 0.001$ .

### 8.3 Evaluación de la ultraestructura de los cardiomiocitos

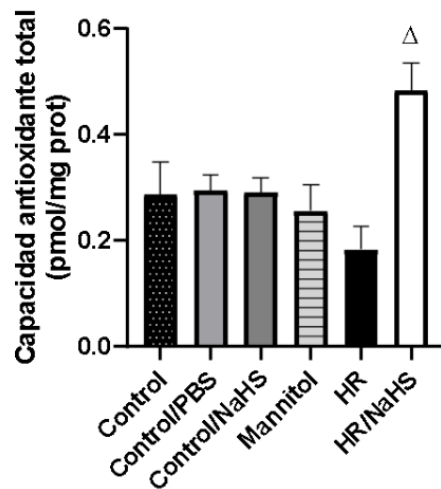
Por medio de microscopía electrónica 12000x, se evaluó la ultraestructura de la mitocondria en los grupos en estudio (**fig. 5**), donde se observa que en el grupo control las mitocondrias no presentan daño alguno ya que aún conservan su forma redonda y con contenido mitocondrial; para el caso de los cardiomiocitos sometidos a HR, se observa que existe un daño mitocondrial, ya que estas presentan deformidades en su estructura y además de la ausencia del contenido mitocondrial; por último, se observa que los cardiomiocitos sometidos a HR y tratados con NaHS presentan menor daño mitocondrial que los grupos HR, ya que las estructuras mitocondriales aunque algunas se observa deformes, aún conservan su contenido por lo que se muestra un menor daño.



**Figura 5.-** El NaHS atenuó el daño a la ultraestructura de las mitocondrias en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusión (HR). Detalles de la ultraestructura por microscopía electrónica a 12000X. A) Control, B) hipoxia reperfusión, C) Hipoxia reperfusión NaHS. Las imágenes son representativas de 6 experimentos por grupo.

#### 8.4 Evaluación del efecto antioxidante

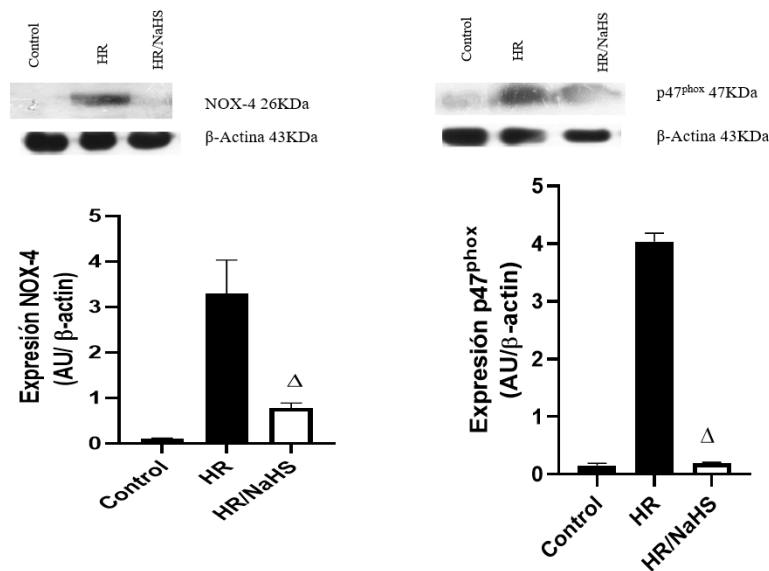
En la siguiente gráfica de barras (**Fig. 6**) se observa el efecto oxidante que presentan los grupos evaluados, siendo el caso del grupo de HR/NaHS donde se observa un efecto antioxidante de aproximadamente de 0.5 pmol/mg prot, siendo el mayor efecto en comparación con los otros grupos; en contraste, se observa que el grupo HR presenta el menor efecto antioxidante, esto debido a la mayor presencia de EROs.



**Figura 6.-** Efecto del NaHS sobre la capacidad antioxidante total en cultivo primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusión (HR). La concentración de la capacidad antioxidante total se midió por espectrofotometría visible a 572nm (pmol/mg prot). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de una vía, pos hoc de Tukey  $\blacktriangle$   $p < 0.001$ .

### 8.5 Evaluación de la expresión de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa

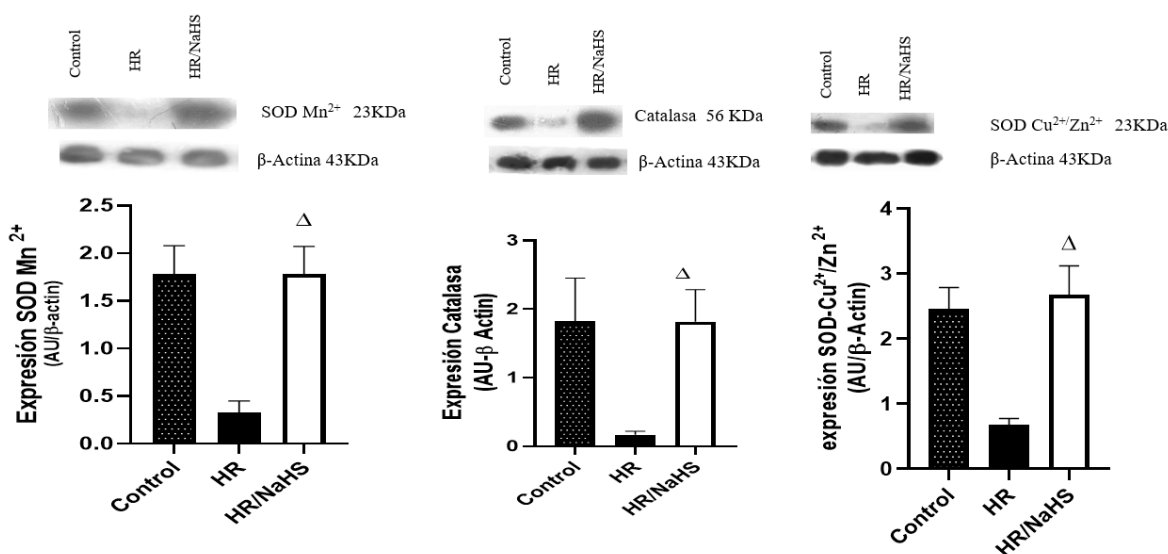
En el caso de la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa, se evaluó la presencia de las subunidades NOX-4 y p47<sup>phox</sup>; en ambos casos, se observa que la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa tanto citosólicas como membranales, se expresan mayoritariamente en el grupo de HR, mientras que tanto en el grupo HR/NaHS como el grupo control, se ve disminuida la actividad de estas subunidades, dando a entender que el NaHS disminuye la expresión de estas subunidades produciendo una menor cantidad de radical superóxido.



**Figura 7.-** El NaHS disminuyó la expresión de las subunidades citosólicas y membranales de la NADPH oxidasa en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperfusión (HR). La detección de los niveles de expresión de las subunidades se llevó a cabo por Western Blot. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de una vía, pos hoc de Tukey  $\blacktriangle$   $p < 0.001$

## 8.6 Evaluación de enzimas antioxidantes

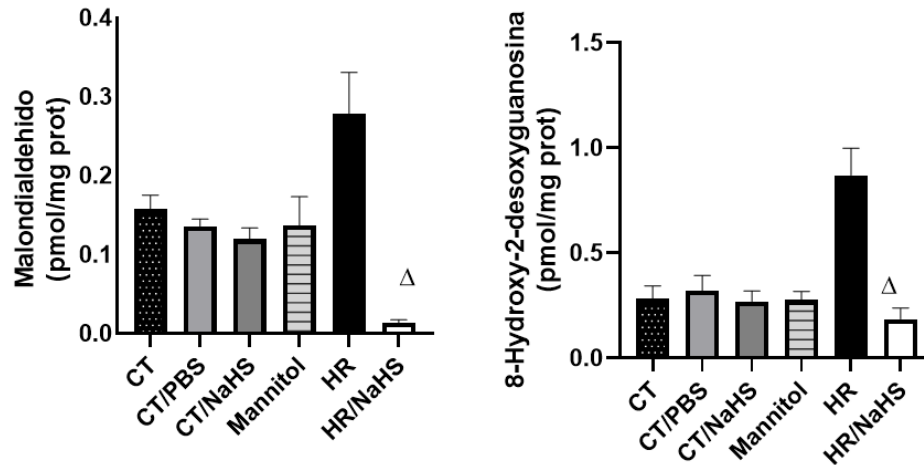
Para evaluar en efecto antioxidante del NaHS, se cuantificó la expresión de las enzimas antioxidantes SOD-Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>, SOD Mn<sup>2+</sup> y catalasa (**fig. 8**). Se observó que el grupo HR/NaHS aumenta la expresión de estas enzimas antioxidantes, mientras que la HR disminuye su expresión. Por lo tanto, el NaHS favorece un ambiente antioxidante en el cardiomiocito.



**Figura 8.-** El NaHS aumentó la defensa antioxidante en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia/reperfusión (HR). La detección de los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes se llevó a cabo por Western Blot. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de una vía, pos hoc de Tukey  $\blacktriangle p < 0.001$ .

## 8.7 Evaluación de indicadores de daño nuclear

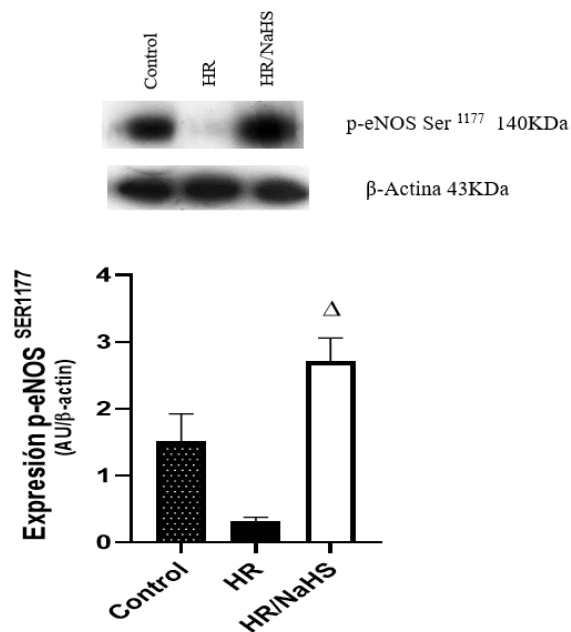
Para evaluar la presencia de las condiciones de hipoxia/reperfusión, se cuantificó la presencia de marcadores de daño molecular, el malondialdehído y la 8-hidroxi-2-desoxigunosina. Se observa que en el grupo HR aumentan la expresión de estos marcadores en comparación con el grupo CT, lo que indica que las condiciones fueron idóneas para la hipoxia/reperfusión; por otro lado, en el grupo HR/NaHS se observa la presencia de ambos marcadores, aunque en menor concentración en comparación al grupo HR; lo que indica que el NaHS favorece un efecto protector del núcleo celular.



**Figura 9.-** El NaHS disminuyó la concentración de marcadores de daño nuclear en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperusión (HR). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de una vía, pos hoc de Tukey  $\blacktriangle$   $p < 0.001$ .

### 8.8 Evaluación de la expresión de eNOS y eNOS ser<sup>1177</sup>

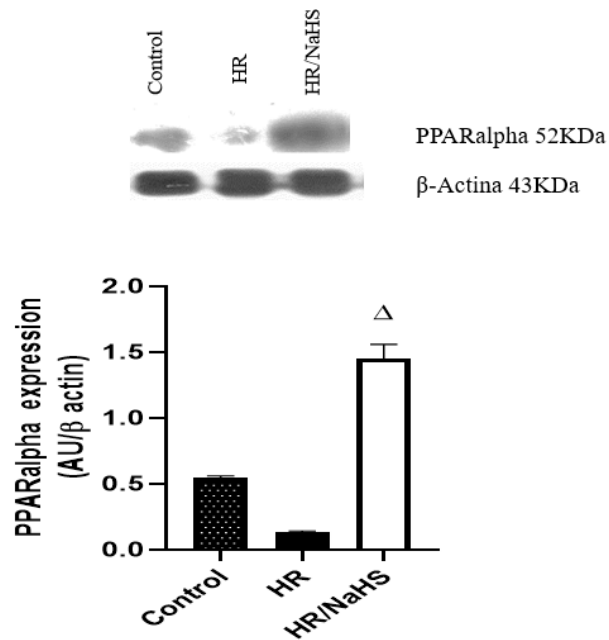
Para la evaluación de la expresión de eNOS ser<sup>1177</sup> se observó que la expresión de la eNOS SER 1177 se encuentra disminuida en HR mientras que el tratamiento con el fármaco favorece significativamente su expresión. Lo que indica que el tratamiento con NaHS favorece un ambiente vasodilatador en el cardiomiocito.



**Figura 10.-** El NaHS aumentó la expresión de la eNOS Ser<sup>1177</sup> en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperusión (HR). La detección de los niveles de expresión de eNOS Ser<sup>1177</sup> se llevó a cabo por Western Blot. Los valores representan la media ± el error estándar de la media (S.E.M) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de una vía, pos hoc de Tukey ▲p<0.001.

### 8.8 Evaluación de la expresión de PPARα

Se evaluó la expresión de PPARα en donde se observa que en el grupo HR significativamente disminuyó la expresión de PPARα, mientras que el tratamiento con el fármaco aumento significativamente su expresión. Este aumento en la expresión favorecería un ambiente antioxidante ya que es bien sabido que la expresión de los PPARα favorece la expresión de enzimas antioxidantes y disminuye la producción del radical superóxido.



**Figura 11.-** El NaHS aumentó la expresión de PPAR $\alpha$  en cultivos primarios de cardiomiocitos sometidos a hipoxia reperusión (HR). La detección de los niveles de expresión de PPAR $\alpha$  se realizó por la técnica de Western Blot. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M) de 6 experimentos diferentes. ANOVA de una vía, pos hoc de Tukey ▲  $p < 0.001$ .

## 9.- Conclusiones

En el presente trabajo, se demostró que el empleo del gasotransmisor NaHS *in vitro* favorece un ambiente antioxidante, estimulando la expresión de enzimas antioxidantes disminuyendo el estrés oxidativo generado por la hipoxia reperusión. Esto en conjunto contribuye a la atenuación del daño ocasionado en la ultraestructura de las mitocondrias y sobre la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos, indican que la hipoxia reperusión (HR) genera estrés oxidante en el cardiomiocito lo que trae consigo daño a macromoléculas importantes en la célula como lípidos, ADN y proteínas. Además, esto lleva a una disminución en la viabilidad celular y daño ultraestructuralmente a las mitocondrias, organelos se suma importancia para generar energía en el cardiomiocito. El tratamiento con NaHS mejora la ultraestructura de las mitocondrias dañadas por la HR con lo que se mejora la viabilidad celular y se disminuyen las vías que favorecen la producción de radical superóxido; favoreciéndose un estado antioxidante en el cardiomiocito.



En nuestra sociedad, los productos naturales capaces de liberar  $H_2S$  pueden actuar como donadores exógenos de  $H_2S$ . Los compuestos comúnmente aislados de los productos naturales de azufre son los polisulfuros sustituidos con alilo (principalmente en forma de disulfuros, trisulfuros y tetrasulfuros), haciéndolos potenciales liberadores de persulfuros o  $H_2S$ . En alimentos del género *Allium* (ajos, cebollas, puerros, echalotes, entre otros), se han identificado y aislado diversos productos que contienen polisulfuros, principalmente trisulfuros y tetrasulfuros. Estos polisulfuros orgánicos proporcionan una fuente de azufre que puede convertirse en  $H_2S$  tras su reducción. Particularmente, en el ajo se ha encontrado la presencia de alicina, una molécula que al descomponerse forma una variedad de combinaciones ricas en azufre, incluidos el sulfuro de dialilo (DAS), el disulfuro de dialilo (DADS) y el trisulfuro de dialilo (DATS), los cuales liberan  $H_2S$  en presencia de glutatión reducido (GSH). Esto ha hecho que a estos alimentos se les atribuyan actividades vasoactivas importantes que contribuyen a tener impactos positivos en la amortiguación de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. El consumo de alimentos ricos en azufre es muy importante, ya que se trata del tercer mineral más abundante en el organismo, por detrás del calcio y fósforo. El azufre elemental es obtenido a través de la dieta y se utiliza para la producción de  $H_2S$  de forma endógena a través de vías no enzimáticas. Existen diversos grupos de alimentos que actúan como fuentes naturales de azufre, como los vegetales crucíferos que incluyen coliflor, col rizada, rúcula, brócoli, coles de Bruselas o el repollo y que son ricos en glucosinolato como fuente de azufre. Adicionalmente, el consumo de alimentos ricos en aminoácidos azufrados como la metionina y la cisteína contribuyen a la producción endógena de  $H_2S$  por vía enzimática. Estos aminoácidos suelen encontrarse en alta proporción en productos con abundante contenido proteico como la carne, el pescado, pollo, huevo, productos lácteos y mariscos. Otros alimentos que también contribuyen a la ingesta diaria de azufre son grosella, frambuesa, nueces, almendras, semillas de girasol y algunos frutos secos como dátiles, higos y pasas, pues contienen dióxido de azufre. Por ello, el consumo de alimentos con actividad potencial como donadores de  $H_2S$ , es una alternativa que puede ayudar al tratamiento de afecciones que involucren alteraciones en las concentraciones de este gasotransmisor.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se señala que el tratamiento con NaHS tiene un efecto benéfico para el cardiomiocito pudiendo este ser un nuevo fármaco para disminuir la

morbi/mortalidad en grupos de pacientes que cursan con HR, siendo este una nueva herramienta farmacológica para disminuir la incidencia y prevalencia de enfermedades isquémicas del corazón.

## 10.- Bibliografía

- ❖ Abe, K., y Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.*, 16(3), 1066–1071.
- ❖ Cadenas, S. (2018). ROS and Redox Signaling in Myocardial Ischemia-reperfusion Injury and Cardioprotection. *Free Radical Biology and Medicine*. 117: p. 76-89.
- ❖ Elejalde Guerra, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 50-59. Recuperado en 01 de diciembre de 2023, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es).
- ❖ Moore y Whiteman. (2015). *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide* (Vol. 230): Springer.
- ❖ Moreu, B.J., Macaya, M. C. (2007). Fisiopatología del Miocardio Isquémico. Importancia de la Frecuencia Cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl.* 7: p. 19D-25D.
- ❖ Konigsberg, F.M. (2008). *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas Manual moderno*. 1era edición: p. 1-623.
- ❖ M.R. (2010). Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. *Rev. Inst. Med. Trop.* 5(2): p. 23-29.
- ❖ Papapetropoulos, A., Whiteman, M., y Cirino, G. (2015a). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br J Pharmacol* 172(6).
- ❖ Powell, C.R., Dillon, K.M., Matson, J.B. (2018). A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* 149, 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.014>
- ❖ Rang, H.P., Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G.; *Farmacología*. 8º ed. 2016, España.

- ❖ Rosado, P.J.M., N. V. (2007). Mini-Revisión: Inflamación Crónica y Estrés Oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 32(2): p. 58-69.
- ❖ Sanabria, R.F.G., K. J. C. (2000). Síndrome de Reperusión. *Fisiopatología, Prevención y Manejo*. *Revista Colombiana de Anestesiología*.
- ❖ Sánchez, A.A.G., Bobadilla, S. M. E., Dimas, A. B., Gómez, O. M., González, G. G. (2016). Enfermedad Cardiovascular: Primera Causa de Morbilidad en un Hospital de Tercer Nivel. *Revista Mexicana de Cardiología*. 27(3): p. s98-s102.
- ❖ Szabo, C. (2018). A timeline of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.* 149, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.010>
- ❖ Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, 92(2), 791-896.