

Tecnológico de Monterrey

Campus Monterrey

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud



**TECNOLOGICO
DE MONTERREY®**

**“Evaluación del efecto de péptidos de la Hsp60 sobre la inducción
de muerte celular y proliferación en cardiomioblastos”**

Disertación de tesis presentada por

Lic. Ramiro Alejandro Villarreal Leal

Entregada a la

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

En cumplimiento parcial de los requerimientos para obtener el grado de

Maestro

en

Ciencias Biomédicas

Monterrey, Nuevo León, mayo 2019



**TECNOLOGICO
DE MONTERREY®**

Carlos Enrique Guerrero Beltrán, Doctor en Ciencias Bioquímicas, Profesor Investigador, como director del presente trabajo y Fabiola Castorena Torres, Doctora en Ciencias con Especialidad en Toxicología, Profesora Investigadora, Catedrático en Investigación, como coordinador académico.

CERTIFICAN que la memoria presentada por Ramiro Alejandro Villarreal Leal, alumno de la Maestría en Ciencias Biomédicas, con el Título "Evaluación del efecto de péptidos de la Hsp60 sobre la inducción de muerte celular y proliferación en cardiomioblastos", reúne los requisitos requeridos para ser presentada y juzgada por el Tribunal correspondiente para optar al grado de Maestro.


Dr. Carlos Enrique Guerrero Beltrán


Dra. Fabiola Castorena Torres


Monterrey. Nuevo León, mayo 2019

Tecnológico de Monterrey


Campus Monterrey

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud


Los miembros del comité, por medio de la presente, certifican que han leído la disertación presentada por Ramiro Alejandro Villarreal Leal, y que cumple en calidad y enfoque como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biomédicas.




Dr. Carlos Enrique Guerrero Beltrán
Tecnológico de Monterrey
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Director de tesis



Dr. José Pedraza-Chaverri
Universidad Autónoma de México
Miembro del comité



Dra. Belinda del Carmen Carrión Chavarría
Tecnológico de Monterrey
Miembro del comité



Dra. Fabiola Castorena Torres
Coordinadora académica
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Monterrey, Nuevo León, mayo 2019

Declaración de Autoría

Yo, Ramiro Alejandro Villarreal Leal, declaro que esta disertación titulada, "Evaluación del efecto de péptidos de la Hsp60 sobre la inducción de muerte celular y proliferación en cardiomioblastos" y el presente trabajo son de mi autoría.

Confirmando que:

- Este trabajo fue realizado en su totalidad o en su mayoría durante mi candidatura para el título dentro de esta Universidad.
- En caso de que alguna parte de esta tesis hubiese sido previamente publicada para un grado o cualquier otra calificación en esta Universidad o cualquier otra institución, esto se declara abiertamente.
- Se atribuye el crédito a todos los trabajos de otros cuando estos fueron consultados
- Se declara la fuente de todo material que fuere citado de terceros. Con la excepción de tales referencias, esta tesis es completamente mi trabajo.
- He reconocido a todas las fuentes principales de apoyo para este trabajo.
- En el caso donde parte del trabajo fuere hecho por mí en conjunto con otros, he dejado en claro qué parte fue hecha por otros y cuál fue mi contribución.



Ramiro Alejandro Villarreal Leal

Monterrey, Nuevo León, mayo 2019

@2019 por Ramiro Alejandro Villarreal Leal

Todos los derechos reservados

DEDICATORIA

A Dios por ser bueno y proveer ante las adversidades y retos que tuve en mi camino.

A mis padres, a quienes debo todos mis logros, el lugar en donde estoy y la persona que soy. Gracias por todo su amor y comprensión durante esta etapa de mi vida profesional.

A mis hermanos, Jessy y Mario, por sus buenos deseos y por apoyar mis decisiones en todo momento. A mis sobrinas, a quienes quiero mucho y espero pueda algún día esta experiencia ser un ejemplo para su propia superación.

A mis amigos, por ser mi familia fuera de casa y por hacer más ameno cada uno de mis días.

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey, por el apoyo con la beca académica de colegiatura otorgada para la realización de mis estudios de posgrado y al CONACYT por el apoyo económico a través de la beca de manutención que me fue otorgada.

Extiendo mi más sincero agradecimiento a mi asesor, el Dr. Enrique Guerrero Beltrán, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo desde sus inicios como Profesor Investigador, y por todo el tiempo y apoyo que amablemente tuvo a disposición en cada ocasión. Le agradezco por enseñarme lo que implica hacer ciencia de calidad y con rigor, y por señalar mis aciertos y mis áreas de oportunidad a lo largo de mi formación de maestría. Agradezco también la paciencia y comprensión que tuvo conmigo en este tiempo, así como la confianza que me tuvo para compartir su línea de investigación en foros locales e internacionales. Sin duda, todas son experiencias que llevo conmigo y que encaminarán mis pasos durante mi vida profesional.

Gracias a mi Comité de Tesis: Dr. José Pedraza Chaverri y Dra. Belinda Carrión Chavarría por sus comentarios críticos que contribuyeron a mejorar este trabajo y por su comprensión hacia los retos enfrentados a lo largo de este proyecto.

Mi agradecimiento va también para el grupo de investigadores del departamento de Medicina Cardiovascular y Metabólica que formaron parte de mi crecimiento profesional. Agradezco el apoyo de la Dra. Elena González Castillo, Dr. Eduardo Vázquez Garza, Dr. Alejandro Torres Quintanilla y M.C. Anay Lázaro Alfaro, que me fue brindado en diferentes puntos de este trabajo.

A mis profesores, a la Dra. Fabiola Castorena Torres y a la coordinación del programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, a mis compañeros de trabajo y a mis amigos. Gracias a todos por ser parte de mi experiencia en estos dos años

LISTA DE ABREVIATURAS

IC	Insuficiencia cardiaca
β 1-AR	Receptor adrenérgico β 1
Ang II	Angiotensina II
HSP	Proteínas de choque térmico
Hsp60	Proteína de choque térmico 60
Hsp10	Proteína de choque térmico 10
ATP	Adenosín trifosfato
TLR	Receptores tipo-Toll
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LPS	Lipopolisacárido
TLR4	Receptor tipo-Toll 4
LRR	Receptores ricos en leucina
PRR	Receptor reconocedor de patrones
MD-2	Antígeno linfocitario 96
CD-14	Cúmulo de diferenciación 14
LBP	Proteína de unión a lipopolisacárido
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
sCD-14	Cúmulo de diferenciación 14 soluble
HMBG1	Proteína del grupo de alta movilidad box 1
LDL	Lipoproteína de baja densidad
oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
MMTV	Proteína de envoltura del virus tumoral mamario murino
RAA	Renina-angiotensina-aldosterona
AT ₁	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT ₂	Receptor de angiotensina II tipo 2
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
PLC	Fosfolipasa C
DAG	Diacilglicerol
IP3	Inositol trifosfato
Ca ²⁺	Calcio
MAPK	Proteínas cinasas asociadas por mitógenos
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
O ₂ ⁻	Anión superóxido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Cyt C	Citocromo C
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1

IFN- γ	Interferón- γ
IL	Interleucina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
BCR	Receptor de células B
Ig	Inmunoglobulina
Treg	Linfocitos T reguladores
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
FMNH	Flavín mononucleótido
FADH ₂	Flavín adenin dinucleótido reducido
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
BSA	Albúmina sérica bovina
SBF	Suero bovino fetal
FSC	Dispersión frontal
SSC	Dispersión lateral
IP	Ioduro de propidio
PE-Cy7	Ficoeritrina Cy7
PerCP	Piridin-clorofila-proteína
CuSO ₄	Sulfato de cobre
NaOH	Hidróxido de sodio
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
RIPA	Amortiguador de radioinmunoprecipitación
HRP	Peroxidasa de rábano
PBS	Solución salina fosfatada
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	12
2. ABSTRACT	13
3. MARCO TEÓRICO.....	14
3.1. INSUFICIENCIA CARDIACA	14
3.2. PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 60.....	15
3.3. PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 60 Y RECEPTORES TIPO-TOLL	17
3.4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN RECEPTOR TIPO-TOLL 4 - LIPOPOLISACÁRIDO.....	19
4. ANTECEDENTES	21
4.1. INSUFICIENCIA CARDIACA Y LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 60.....	21
4.2. RECEPTORES TIPO-TOLL Y ANGIOTENSINA II.....	23
4.3. HSP60 E INFLAMACIÓN	25
4.4. ESTRATEGIAS DE TOLERIZACIÓN USANDO PÉPTIDOS DE HSP60	26
5. JUSTIFICACIÓN	27
6. HIPÓTESIS	28
6.1. HIPÓTESIS NULA	28
6.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	28
7. OBJETIVO GENERAL.....	28
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
9. MÉTODOS Y MATERIALES	29
9.1. CULTIVO CELULAR.....	29
9.2. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE LA HSP60 EN CARDIOMIOBLASTOS 30	
9.3. DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE MUERTE ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON PÉPTIDOS DE LA HSP60.....	32
9.4. DETERMINACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR POR WESTERN BLOT	35
9.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
10. RESULTADOS	43
10.1. SIMULACIÓN IN SILICO DE LOS PÉPTIDOS DE LA HSP60 Y DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	43
.....	44
10.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TRABAJO PARA EL LPS EN CARDIOMIOBLASTOS H9C2 USANDO AZUL ALAMAR	44
10.4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE HSP60 Y LPS EN CARDIOMIOBLASTOS H9C2 USANDO AZUL ALAMAR	47

10.5. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS Y NECROSIS EN CARDIOMIOBLASTOS TRAS EL TRATAMIENTO CON PÉPTIDOS DE LA HSP60 Y LPS USANDO CITOMETRÍA DE FLUJO	49
10.6. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA EN CARDIOMIOBLASTOS TRAS EL TRATAMIENTO CON PÉPTIDOS DE LA HSP60 Y LPS POR WESTERN BLOT.....	55
11. DISCUSIÓN	57
12. CONCLUSIONES	63
13. REFERENCIAS.....	64

1. RESUMEN

La insuficiencia cardiaca (IC) es el estadio final de diversas patologías que afectan al corazón y se asocia a una rápida progresión y alta tasa de mortalidad. El presente trabajo pretende proponer nuevas alternativas para su tratamiento mediante el estudio de mecanismos novedosos que participan en inflamación.

Las proteínas de choque térmico son chaperonas endógenas que facilitan el plegamiento de polipéptidos y cuya expresión responde a estímulos que inducen estrés intracelular. En la IC, la proteína de choque térmico 60 (Hsp60) se sobreexpresa y se libera para asociarse a la membrana plasmática o alcanzar tejidos periféricos, donde actúa como una molécula señalizadora de daño que induce inflamación y muerte celular tras unirse y activar receptores tipo-Toll (TLR), en particular el TLR4, presentes en la superficie de cardiomiocitos y otras células.

Asimismo algunos péptidos de la Hsp60 pueden inducir respuestas específicas por sí mismos, alterando el curso de una respuesta inflamatoria. Existen antecedentes de la eficacia del uso de estos péptidos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, relacionando el efecto terapéutico a eventos inmunomodulatorios en leucocitos que disminuyen la inflamación; sin embargo se desconoce la participación que tienen las células cardiacas residentes, como los cardiomiocitos, en la coordinación de respuestas ante estos péptidos, así como la seguridad y citotoxicidad de los mismos en estas células.

En este trabajo se caracteriza el efecto sobre la viabilidad celular de tres péptidos de la Hsp60 en cardiomioblastos, identificándolos como potenciales agentes inductores de muerte por apoptosis. Se pone en evidencia la alta ventana de seguridad de estos péptidos, y se discute la necesidad de aumentar el número de réplicas experimentales para obtener conclusiones estadísticamente significativas de las tendencias aquí observadas.

2. ABSTRACT

Heart failure (HF) is an end-stage for many different pathologies affecting the heart and it is associated to a rapid progression and to a high mortality rate. The following thesis project aims at posing new alternatives to its treatment through the study of novel mechanisms related to inflammation

Heat shock proteins are endogenous chaperones that assist in polypeptide folding and whose expression respond to cellular stress-inducing stimuli. In HF, heat shock protein 60 (Hsp60) is overexpressed and released allowing it to associate to the plasma membrane or to reach peripheral tissues, whereupon it acts as a danger signaling molecule, inducing inflammation and cell death after binding to and activating Toll-like receptors (TLR), especially TLR4, present at the surface of cardiomyocytes and other cells.

Furthermore, some Hsp60 peptides may induce specific responses on their own, altering the course of an inflammatory response. There are some reports describing the use of these peptides for the treatment of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, whereby therapeutic effects are associated to immunomodulatory events in leukocytes that lead to a reduction in inflammation. Nevertheless, the particular role that cardiac resident cells, such as cardiomyocytes, may play in coordinating the response to these peptides remains elusive, much as their safety and cytotoxicity in these cells.

In the present work we characterize the effect of three Hsp60 peptides on cell viability in cardiomyoblasts, identifying them as potential apoptosis inducing agents. We report a high therapeutic window for these peptides, and we discuss the need to increase the number of experimental replicas to come up with statistically significant conclusions to the trends hereby observed

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Insuficiencia cardíaca

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte a nivel mundial. Patologías como el infarto agudo al miocardio, hipertensión arterial sistémica, aterosclerosis, arritmias, enfermedad valvular, y defectos de origen congénito, entre otros, forman parte de las enfermedades cardiovasculares; la insuficiencia cardíaca (IC) se engloba dentro de este espectro de patologías, al ser la etapa terminal de todas estas.

La IC representa la etapa final, en común, de un gran número de enfermedades que afectan al sistema cardiovascular. El daño generado, principalmente sobre las células que componen la capa muscular del corazón conocida como *miocardio*, representa la mayor parte de las causas asociadas a la disfunción de este órgano; sin embargo, el compromiso de otras poblaciones celulares, así como de otras estructuras anatómicas importantes en la dinámica cardíaca, como las válvulas aurículoventriculares y semilunares, el sistema de conducción eléctrica, y las arterias coronarias también participan en la fisiopatología de la IC (Jessup & Brozena, 2003).

Estas poblaciones celulares que residen dentro del corazón y que participan en la evolución de la IC comprenden tres tipos principales diferentes: 1) Los cardiomiocitos, que conforman la mayor parte del volumen del órgano. Estos tienen actividad contráctil, que es necesaria para la función de bomba del corazón. 2) Los fibroblastos; éste es el tipo celular más abundante, y sus funciones principales están relacionadas a la síntesis de matriz extracelular, que sirve como andamiaje para los cardiomiocitos, además de participar en procesos de reparación tisular. 3) Las células endoteliales, que recubren la capa más interna de las paredes cardíacas, y se encuentran orientadas hacia la luz de las aurículas y los ventrículos. Además, forman la túnica íntima de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón (Schoen & Mitchell, 2015). Dicho lo anterior, se conoce como IC al estado en el cual el corazón es incapaz de cumplir su función mecánica de bomba para suministrar sangre al resto de los órganos del cuerpo. La reducción en la cantidad de sangre que alcanza

a los tejidos periféricos provoca una perfusión disminuida, generando un ambiente de hipoxia como resultado de las bajas concentraciones de oxígeno disponibles en circulación (Schoen & Mitchell, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, existe un gran número de factores que pueden provocar daños sobre la función cardíaca, dentro de los cuales destacan el daño isquémico (Anderson & Morrow, 2017) la sobrecarga hemodinámica, la presencia de autoanticuerpos como los dirigidos contra el receptor adrenérgico β_1 (β_1 -AR, por sus siglas en inglés) y los antimiosina (Kaya, Leib, & Katus, 2012), microorganismos patógenos como *Mycobacterium spp* y *Porphyromonas gingivalis* y el efecto de neurohormonas como la angiotensina II (Ang II) (Valgimigli et al., 2001) sobre la cual se discutirá más a fondo a continuación. Estos insultos, que afectan la dinámica cardíaca, pueden desencadenar una respuesta inflamatoria como resultado de los daños en las células directamente afectadas, así como en las células periféricas en sitios fuera del foco de inflamación (Mehta & Pothineni, 2016).

3.2. Proteína de choque térmico 60

La familia de las proteínas de choque térmico, también conocidas como proteínas HSP (*heat shock proteins*, por sus siglas en inglés) incluye una larga lista de miembros que son expresados de manera constitutiva en pequeñas cantidades tanto en células eucariotas como procariotas, sin embargo son particularmente inducidas durante condiciones de estrés intracelular (Okamoto et al., 2015).

Se sabe que una de estas proteínas, la Hsp60, juega un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades con un componente inflamatorio predominante, como es el caso del cáncer (Cappello, Conway De Macario, Marasà, Zummo, & Macario, 2008), la artritis reumatoide (E. Y. Kim, Durai, Mia, Kim, & Moudgil, 2016) y la aterosclerosis (Grundtman, Kreutmayer, Almanzar, Wick, & Wick, 2011), por citar algunos ejemplos.

En condiciones fisiológicas, la Hsp60 actúa como una proteína chaperona que participa en el correcto plegamiento de otras proteínas para que éstas puedan alcanzar su estructura cuaternaria y tornarse funcionales. Este proceso se logra

mediante la formación de un complejo proteico HSP/HSP; este último consiste de la unión de una Hsp60 con una Hsp10 (Okamoto et al., 2015).

Este complejo Hsp60/Hsp10 es capaz de reconocer proteínas que aún no se han plegado. Por medio de la energía libre producida a partir de la hidrólisis de una molécula de ATP, Hsp60/Hsp10 son capaces de llevar a cabo su función: el correcto plegamiento de las proteínas

De manera usual, la Hsp60 se localiza al interior de las mitocondrias y en el citosol de las células. Sin embargo, bajo condiciones de estrés intracelular, esta proteína puede traslocarse desde su punto de origen, hacia otras partes de la arquitectura celular, como la membrana plasmática. En este sitio, la Hsp60 puede intercalarse en la bicapa lipídica, y asociarse a las balsas lipídicas ricas en colesterol en la cara exoplásmica de la membrana (Campanella et al., 2012).

De manera alternativa, la Hsp60 puede salir de las células hacia el medio extracelular. Este suceso puede ocurrir de dos formas diferentes, uno de los cuales implica un proceso dinámico y el otro uno pasivo; en el primero de éstos, la Hsp60 es empaquetada en vesículas para ser exocitada (Campanella et al., 2012), mientras que en el segundo, la proteína es capaz de fugarse al medio extracelular tomando ventaja de los cambios en la morfología celular y en la permeabilidad de la membrana plasmática que ocurren en condiciones de estrés intracelular, como sucede en el caso de los cardiomiocitos que sufren hipertrofia como proceso adaptativo a diversos insultos (Allen, Zhang, & Whitehead, 2010).

Lin et al. (2007) han informado que tanto la traslocación de la Hsp60 hacia la membrana celular, como su incorporación a las balsas lipídicas tiene una función importante como una molécula de daño intracelular, que promueve la inducción de una respuesta local de muerte celular. Esto se demostró por medio de observaciones que correlacionaban la presencia de la Hsp60, en los sitios antes mencionados, con una mayor actividad de las proteínas de la familia de las caspasas, además de otros intermediarios de la vía intrínseca de la apoptosis.

Por otro lado, la salida de la Hsp60 del interior de las células hacia el medio extracelular hace de esta proteína una molécula de señalización parácrina para los tejidos vecinos (S.-C. Kim et al., 2009). Asimismo, la Hsp60 puede alcanzar los

vasos sanguíneos, entrar a la circulación sistémica y actuar como una molécula de señalización endócrina desencadenando diversas respuestas en los tejidos periféricos (Henderson & Graham Pockley, 2012).

En el caso anterior, uno de los principales blancos para el reconocimiento de la Hsp60 son las células del sistema inmune, que pueden reconocer segmentos antigénicos específicos de la proteína (también conocidos como epítomos), tras lo cual son activadas y comienzan a mediar una respuesta inflamatoria para tratar de contener y eliminar la fuente del estímulo lesivo (Campanella et al., 2012).

3.3. Proteína de choque térmico 60 y receptores tipo-Toll

Como se ha mencionado anteriormente, la Hsp60 puede ser reconocida por otras células de forma parácrina o endócrina, activándolas para iniciar una respuesta inflamatoria. Este proceso está mediado por la presencia de receptores transmembrana en estas células, que pueden reconocer epítomos de la proteína. Estos receptores pertenecen a una familia denominada como receptores tipo-Toll (toll-like receptors, TLRs, por sus siglas en inglés), y forman parte de la respuesta inmune innata que pueden ejecutar las células humanas como defensa ante diversos patógenos y moléculas con efectos deletéreos sobre ellas. Esta gran familia de receptores consta de 13 miembros conocidos en mamíferos, de los cuales 10 se expresan en los seres humanos. Se tratan de receptores transmembrana tipo I que se distinguen por su capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Adamczak, 2017).

Con respecto a aquellos presentes en humanos, cinco de estos miembros (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) se encuentran ubicados en la membrana plasmática, donde transducen señales provenientes del medio extracelular y participan en el reconocimiento de componentes de origen bacteriano, como el lipopéptidos, ácido lipoteicoico y el lipopolisacárido; por otro lado, los demás receptores (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR10) se encuentran asociados a endosomas y tienen una función importante contra los virus y otros parásitos intracelulares mediante el reconocimiento de ácido ribonucleico (ARN) de origen

viral (de cadena doble y única) así como islas CpG sin metilar (características del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano) (Sato & Akira, 2016).

En el caso de los PAMPs, se trata de patrones ampliamente preservados que pueden encontrarse en elementos ubicados, tanto dentro como fuera de microorganismos que son capaces de infectar a un individuo, como lo son los virus y las bacterias (Bianchi, 2006). Ejemplos de estos PAMPs son: 1) lipopolisacárido (LPS), que forma parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. 2) ADN o ARN, que constituyen el material genético de los microorganismos patógenos. 3) Flagelina, una proteína importante para el movimiento de los flagelos en ciertas bacterias y protozoarios; entre otros (Yu, Wang, & Chen, 2010).

Los DAMPs por su parte, suelen ser patrones moleculares presentes en proteínas y otros componentes de las células que normalmente residen en su interior o se encuentran incorporados a su membrana plasmática. En condiciones donde ocurre algún daño sobre las células, estas moléculas pueden ser liberadas al medio extracelular, donde pueden entrar en contacto con TLRs presentes en otras células para desencadenar respuestas inmunes innatas que generan un ambiente proinflamatorio, además de poder amplificar este proceso al activar a las células del sistema inmune en tejidos periféricos, o a través de los TLRs de las células somáticas contiguas (McCarthy et al., 2014).

Existen moléculas que presentan un alto grado de conservación entre las diferentes especies, de manera que pueden estar presentes tanto en organismos procariotas como en eucariotas. Un ejemplo de esto es la Hsp60 que está presente tanto en bacterias como en organismos multicelulares, incluyendo a los seres humanos. En el caso de estos últimos, la exposición a la Hsp60 puede darse en forma de PAMP o DAMP dependiendo el origen de la proteína (Okamoto et al., 2015).

Durante un proceso infeccioso que afecta a células humanas, la proteína Hsp60 bacteriana puede ser reconocida por los TLR (TLR2, TLR3, TLR4), que tienen amplia actividad en el reconocimiento de varios de los miembros de la familia de las HSP. Esta interacción HSP-TLR (antígeno-receptor) es muy importante en la

defensa del hospedero contra el patógeno en cuestión, y sirve como un mecanismo para sortear este tipo de insultos (Cristofaro & Opal, 2006)

De forma alterna, la Hsp60 humana también puede interactuar con los TLR para iniciar respuestas pro-inflamatorias. Debido al alto nivel de homología entre la proteína bacteriana y la humana, cuando ésta última logra salir al medio extracelular puede ser reconocida por los TLR4, en un fenómeno que se conoce como *mimetismo molecular*, en el que un elemento endógeno puede ser reconocido como un antígeno ante las células del sistema inmune debido a su similitud con sus homólogos patogénicos (Blank, Barzilai, & Shoenfeld, 2007). Esta falla en la distinción apropiada entre los elementos propios y ajenos conlleva a una pérdida de la tolerancia inmune, que se asocia con el desarrollo de enfermedades de tipo autoinmune.

3.4. Vía de señalización receptor tipo-Toll 4 - lipopolisacárido

Como parte de los mecanismos de inmunidad innata, la vía de señalización del TLR4 funciona como una de las principales líneas de defensa en contra de microorganismos patógenos. En este sentido, el TLR4 es un receptor homodimérico transmembranal cuya activación depende de la unión de diversos ligandos a sus dominios de repeticiones ricas en leucina (leucine rich repeats, LRR, por sus siglas en inglés) en la cara exoplasmática, motivo por el cual se le conoce como un receptor reconocedor de patrones (pattern recognition receptor, PRR, por sus siglas en inglés) (Moresco, LaVine, & Beutler, 2011).

La mayor parte de nuestro conocimiento acerca de las características estructurales de este receptor provienen del estudio de la interacción con su ligando mejor reconocido, el LPS bacteriano. Utilizando análisis de cristalografía por rayos X, se han logrado hacer varias descripciones de la conformación del TLR4 unido a LPS, con lo cual se ha dilucidado en parte nuestro entendimiento sobre este paso inicial en la cascada de señalización de manera general (Ohto, Fukase, Miyake, & Shimizu, 2012). Mediante modelos computarizados, se ha reconocido que existen otros mediadores en la respuesta ante el LPS, incluyendo proteínas adaptadoras

como MD-2 (también conocida como antígeno linfocitario 96), CD14 y la proteína de unión a LPS (LBP) (Miyake, 2004).

Debido a sus fuertes propiedades hidrofóbicas, el LPS depende de un sistema de transporte bajo la forma de la LBP, una proteína sérica que lo acarrea desde una fuente de infección a través del torrente sanguíneo; bajo estas circunstancias, el LPS tiene mayor capacidad de interactuar con sus blancos a lo largo de los tejidos.

Dado que el TLR4 se expresa en la mayoría de las células somáticas, no es sorprendente que la endotoxina se relacione con respuestas sistémicas como la sepsis, aunque también ocurran respuestas tejido-específico ante infecciones localizadas, como la miocarditis (Roberts, Moussawi, & Huber, 2013) .

A nivel de la superficie celular, se han reconocido dos proteínas que asisten al LPS durante su unión al TLR4. La primera, CD14 es una proteína anclada a la membrana plasmática por una cola de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se une a la LBP y transfiere el LPS a TLR4 cercanos. CD14 se expresa mayormente en macrófagos y en menor medida en neutrófilos y células dendríticas. Una forma soluble de CD14 (sCD14) también se secreta por el hígado, enterocitos y monocitos, haciendo a otras células más sensibles ante el LPS. No existen informes en los que hayan publicado el papel de esta proteína en el contexto de respuestas inflamatorias contra la endotoxina en el corazón (Ogawa et al., 2013).

También contribuyendo a un mejor reconocimiento del LPS, MD-2 es una proteína con bolsillos hidrofóbicos a los cuales se propone se unen las colas aciladas de la endotoxina. Aunque el TLR4 puede transducir señales después de unirse a LPS por sí mismo, MD-2 incrementa la eficiencia de este proceso como resultado de una afinidad de unión mayor que al ligando antes mencionado. Se han observado deficiencias tanto en CD14 como en MD-2 en modelos murinos in vivo y se han encontrado respuestas disminuidas a la endotoxina, lo cual resalta el papel que juega en respuestas inmunes ante este derivado bacteriano (Lu, Yeh, & Ohashi, 2008).

Como se ha descrito en secciones anteriores, el TLR4 está compuesto por dos monómeros idénticos que forman una curvatura convexa hacia el espacio

extracelular, los cuales contienen los dominios LRR, que son secuencias cortas de 20-30 aminoácidos que se estima ocurren alrededor de 16 a 28 veces a lo largo de un sólo monómero. Estas repeticiones son las porciones responsables de detectar PAMPS y DAMPS de manera no específica, por medio de las cuales se unen las moléculas con base en su carga superficial y la complementariedad de tamaño (Tsukamoto et al., 2015).

Hasta la fecha se han descrito algunos ligandos del TLR4 más allá del LPS, dentro de los cuales se incluyen las HSP, la proteína del grupo de alta movilidad box 1 (HMBG1, del inglés high mobility box group 1), lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (oxLDL), ácidos grasos saturados, la proteína de fusión del virus sincitial respiratorio, ácido hialurónico, β -defensina 2 y la proteína de envoltura del virus tumoral mamario murino (MMTV, por sus siglas en inglés). La naturaleza heterogénea de estas moléculas sugiere que los mecanismos de reconocimiento que emplea el TLR4 son más bien inespecíficos. Además, como sucede para el caso del LPS, algunos de estos ligandos parecen depender en mayor medida de interacciones con MD-2 para desencadenar un cambio conformacional en el TLR4, particularmente como sucede para moléculas no polares de origen lipídico (Lu et al., 2008; Rocha, Caldas, Oliveira, Bressan, & Hermsdorff, 2016).

4. ANTECEDENTES

4.1. *Insuficiencia cardiaca y la proteína de choque térmico 60*

En la IC, se sabe que la Hsp60 sirve como un marcador de la evolución de la enfermedad, en la que una mayor concentración de la proteína en circulación se asocia a un daño estructural mayor y un peor pronóstico, de acuerdo a lo descrito por Lin et al. (2007). Este mismo grupo también ha descrito que tras la traslocación de la Hsp60 hacia la membrana plasmática y al medio extracelular, ésta media la inducción de muerte celular por apoptosis, además de la activación de las células del sistema inmune en sitios periféricos. Asimismo, la participación del sistema inmune en estos procesos incluye la inducción de una respuesta adaptativa

citotóxica mediada por linfocitos T, así como una respuesta humoral mediante la producción de anticuerpos específicos contra la Hsp60 a cargo de linfocitos B maduros que se diferencian a células plasmáticas capaces de llevar a cabo esta tarea (Quintana & Cohen, 2011).

Si bien las células del sistema inmune juegan un papel preponderante en la actividad inflamatoria que se observa en la IC, principalmente por la influencia de las respuestas adaptativas (Mehta & Pothineni, 2016), se desconoce la extensión de la participación de la respuesta inmune innata en este contexto. Por este motivo, este tema ha sido de gran interés en los años recientes, llegando a contribuir en cierta medida al entendimiento actual que se tiene de la diversidad de factores asociados a la fisiopatología de la IC.

Debido al papel fundamental que juegan los TLRs dentro de los mecanismos de inmunidad innata, el estudio de estos y de sus vías de señalización asociadas se ha convertido en un punto de referencia para el entendimiento de las enfermedades con componentes inflamatorios prominentes.

En la actualidad se sabe que los TLRs no sólo se encuentran en los leucocitos, sino que están presentes en una gran variedad de células somáticas en diferentes sistemas de órganos, lo cual denota la capacidad de estos tejidos a responder ante la invasión por patógenos y la presencia de moléculas inductoras de daño (Goulopoulou, Mccarthy, & Webb, 2016).

Liu et al. (2015) determinaron que los cardiomiocitos expresan algunos de los miembros de la familia de los TLR, principalmente TLR2, TLR3 y TLR4; este último se encuentra con mayor frecuencia. Además, indicaron que en condiciones de IC, tanto los niveles de transcritos como de proteína de TLR4 aumentan significativamente. El receptor se encuentra presente en la membrana plasmática tal y como se indica por el patrón de fluorescencia observado usando ligandos etiquetados, como LPS y Hsp60.

Con base en estos estudios, se propone que el TLR4 puede tener un papel importante en la fisiopatología de la IC. No obstante, no se conoce con claridad suficiente el mecanismo exacto por el cual la expresión y actividad de este receptor aumenta.

Una posible explicación es aquella que ofrecen Biancardi et al. (2017) quienes han postulado el papel que puede tener la Ang II, una neurohormona íntimamente relacionada con las enfermedades cardiovasculares, sobre la función de los TLR4 en diferentes células del organismo.

4.2. Receptores tipo-Toll y angiotensina II

Biancardi et al. (2017) han descrito que existe una relación entre las vías de señalización mediadas por Ang II y los mecanismos de respuesta inmune innata en diversas células, en los seres humanos.

En cuanto al primer elemento de la relación antes mencionada, la Ang II es una molécula que actúa principalmente sobre los vasos sanguíneos generando vasoconstricción, sin embargo también tiene diversos efectos en otras células. Constituye uno de los mecanismos fisiológicos para el control de la presión arterial a mediano y largo plazo, y forma parte de un eje sistémico importante para este propósito, conocido como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA). La vasoconstricción está mediada por la interacción de la Ang II con sus receptores específicos (AT₁ y AT₂, del inglés angiotensin II receptor type 1/type 2), los cuales son receptores acoplados a proteínas G (GPCR, de inglés G-protein-coupled receptors) con subunidad $\alpha_{q/11}$, por lo que ejercen su efecto mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la subsecuente generación de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), que actúan elevando las concentraciones de calcio (Ca²⁺) citosólico; este último efecto provoca la contracción del músculo liso en la túnica media de los vasos sanguíneos para generar un incremento en la presión arterial (Dasgupta & Zhang, 2011).

Dentro de la fisiopatología de la IC, la Ang II aumenta la resistencia vascular periférica mediante la vasoconstricción arterial. Este evento afecta la dinámica cardíaca al incrementar la poscarga durante la sístole ventricular, lo cual se traduce como un aumento en la fuerza que el músculo cardíaco debe generar para poder bombear sangre efectivamente hacia la circulación sistémica.

Esta carga adicional que se impone sobre el músculo cardíaco demanda una mayor capacidad contráctil por parte de los cardiomiocitos, por lo que estos responden mediante la inducción de cambios adaptativos en su morfología al

hipertrofiarse. Durante este suceso, estas células aumentan el número de miofilamentos disponibles para la contracción muscular, lo cual de manera temporal es capaz de generar una fuerza suficiente para vencer la poscarga derivada del incremento en la resistencia vascular periférica (Jessup & Brozena, 2003).

Debido a que durante la progresión de la insuficiencia cardiaca, el estímulo mediado por la Ang II sobre las células cardiacas es constante, existe un punto donde la respuesta adaptativa hipertrófica de los cardiomiocitos ventriculares se vuelve insuficiente para la eyección de la sangre a la circulación sistémica, por lo que la perfusión hacia los tejidos periféricos disminuye, generando un estado sistémico de isquemia.

Biancardi et al. (2017) proponen una interacción en la que los receptores AT_1 , tras unir a Ang II, son capaces de activar de manera directa a los TLR4. Como resultado, los TLR4 son capaces de transducir señales río abajo mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras que terminan por activar vías de señalización importantes como las MAP cinasas (MAPK, por sus siglas en inglés), para activar factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, por sus siglas en inglés), que pueden unirse al ADN para promover la transcripción de genes que codifican para los TLR4. De esta manera, se genera una cadena de amplificación para la expresión de estos TLR mediada por Ang II, por lo que esto puede explicar por qué existe una mayor actividad de los TLR4 bajo condiciones de IC (Liu et al, 2015)

Otro hallazgo importante realizado por Biancardi et al. (2017), es en cuanto a la relación que pueden tener los TLR4 con otros mecanismos de daño celular. De manera específica, se describió que tras su activación por el reconocimiento de PAMPs/DAMPs como la HSP60, o bien por la interacción directa con el AT_1 , los TLR4 pueden activar a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés) oxidasa, enzima que cataliza la reacción de oxidación del NADPH, reacción que tiene como producto la generación de radicales libres en la forma del anión superóxido (O_2^-) y de $NADP^+$ (Biancardi et al, 2017).

La producción excesiva de radicales libres tiene efectos deletéreos sobre las células. Un ejemplo de esto es la inducción de daño mitocondrial, que está asociada

a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como lo es el O_2^- . La pérdida de la integridad de la membrana externa mitocondrial inducida por las ROS permite la liberación del citocromo C (Cyt C, por su nombre en inglés) al citosol, y con esto, iniciar los eventos de la vía intrínseca de la apoptosis por medio del reclutamiento y activación de caspasas (Moris et al., 2017).

4.3. Hsp60 e inflamación

Como se ha mencionado anteriormente, tanto PAMPs como DAMPs pueden activar a los TLR4. La Hsp60 (que puede servir como un patrón de ambas clases dependiendo de su origen) es capaz de interactuar con el TLR4 mediante el reconocimiento de epítomos en esta proteína que son ampliamente conservados entre especies; dando como resultado, la generación de respuestas inflamatorias y de muerte celular (Okamoto et al., 2015)

Ciertos péptidos de la Hsp60 también son capaces de inducir respuestas inmunes proinflamatorias de manera independiente al resto de la proteína nativa. Dentro de la fisiopatología de la aterosclerosis, Almanzar et al. (2012) describieron que existen péptidos de la Hsp60 que tienen actividad proaterogénica, tanto en lesiones tempranas como en tardías. Estos péptidos actúan como epítomos que son reconocidos por linfocitos T, alterando su fenotipo hacia células Th1 secretoras de interferón- γ (IFN- γ), interleucinas (IL) 2 y 6, y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , por sus siglas en inglés), que propician un ambiente proinflamatorio al generar daño tisular directo y al ser capaces de reclutar a otras células inmunológicas como a los monocitos y macrófagos.

Los linfocitos B también pueden reconocer estos péptidos de la Hsp60 mediante su receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés) y receptores tipo-Toll, en su membrana plasmática, para la producción de autoanticuerpos IgM e IgG, esto de manera independiente a la estimulación por linfocitos T (Quintana & Cohen, 2011). Estos anticuerpos amplifican el daño perpetuado sobre las arterias, promoviendo el crecimiento de las placas ateroscleróticas, además de que se ha informado que se encuentran de manera significativa sólo en lesiones tardías (Almanzar et al., 2012).

4.4. Estrategias de tolerización usando péptidos de Hsp60

El cuerpo de conocimiento referente a Hsp60 y al papel en particular que sus péptidos juegan en la inducción de procesos inflamatorios durante la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares se ha derivado principalmente del estudio de células del sistema inmune, lo cual marca la pauta para el planteamiento de estrategias de inmunomodulación dirigidas a frenar la progresión del daño tisular mediante la inclinación de la balanza inflamatoria de un estado proinflamatorio a uno antiinflamatorio. Con este objetivo en mente, una de las opciones más exploradas a lo largo de los últimos años ha sido la inmunización usando péptidos de Hsp60, por medio de la cual se buscan los candidatos ideales para el desarrollo de vacunas que representen terapias novedosas para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares mediante la inducción de un estado de tolerancia inmune periférica hacia la chaperonina y sus péptidos.

En este sentido, Van Puijvelde et al. (2007) utilizaron un modelo murino de aterosclerosis usando ratones knockout (KO) para el receptor de lipoproteínas de baja densidad ($LDLr^{-/}$) que fueron alimentados concomitantemente con una dieta occidental alta en colesterol para favorecer el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Como intervención experimental, estos ratones fueron inmunizados por vía oral con dosis bajas de péptidos de Hsp60 antes de comenzar el regimen alimenticio descrito anteriormente. Los resultados de este grupo de investigación indicaron que hubo una reducción de hasta 80 y 27% en el tamaño de las placas ateroscleróticas en las carótidas y en la raíz aórtica, respectivamente en aquellos ratones inmunizados. También fue relevante el hecho de que estos beneficios terapéuticos fueran, al parecer, el resultado de un enriquecimiento en la población de linfocitos T reguladores (Treg) que portan el fenotipo $CD4^{+}$, $CD25^{+}$, $Foxp3^{+}$. Estas células se distinguen por su papel en el cese de las respuestas inmunes una vez que los estímulos detonantes iniciales han sido eliminados. Mediante la secreción de mediadores antiinflamatorios como la IL-10 y factor de crecimiento transformante- β ($TGF\beta$), los Tregs son capaces de polarizar poblaciones de linfocitos efectores de un subtipo Th1 a uno Th2, los cuales también son antiinflamatorios en la mayoría de los casos.

Grundtman et al. (2015) informaron hallazgos similares a los descritos anteriormente, lo que demuestra que péptidos específicos de mbHSP65 (el homólogo micobacteriano de la Hsp60 humana) inducen respuestas diferentes en modelos murinos de aterosclerosis derivados de una dieta alta en colesterol. Tras la inmunización con algunos de estos péptidos, se observó que de entre 7 que demostraron ser inmunogénicos, el péptido #33 tenía el mayor grado de actividad proaterogénica registrada, incrementando así el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en la raíz aórtica, mientras que se demostró que el péptido #67 fue ateroprotector lo que se evidenció por la reducción más marcada en el tamaño de las placas. Los resultados antes mencionados señalan al hecho de que la respuesta funcional ante la inmunización con péptidos de Hsp60 es dependiente de las secuencias específicas empleadas, por lo que no se deberían esperar respuestas universales. Esto conduce a más estudios para probar todos los antígenos concebidos para el desarrollo de vacunas usando péptidos de Hsp60 en diferentes tipos de células para determinar su potencial citotóxico antes de explorar su uso terapéutico en modelos de enfermedad más complejos.

5. JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia cardiaca representa la etapa final y el resultado de un gran número de enfermedades que afectan al sistema cardiovascular; se ha establecido un papel preponderante del sistema inmunológico en la progresión de esta patología. A la fecha, se ha demostrado que el tratamiento con péptidos de la Hsp60 podría reducir la respuesta inflamatoria por medio de la modulación del sistema inmunológico, sin embargo, se desconoce el efecto que diversos péptidos de la Hsp60 tienen directamente sobre las células cardiacas.

El reconocimiento de los efectos que péptidos de la Hsp60 tienen sobre las células cardiacas puede llevar al diseño de nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como la insuficiencia cardiaca.

6. HIPÓTESIS

- El uso de péptidos de la Hsp60 prevendrá o disminuirá la respuesta de muerte celular en cardiomiocitos (cardiomioblastos H9c2).

6.1. Hipótesis nula

- El uso de péptidos de la Hsp60 **no** prevendrá o disminuirá la respuesta de muerte celular en cardiomiocitos (cardiomioblastos H9c2).

6.2. Hipótesis alternativa

- El uso de péptidos de la Hsp60 provocará una mayor inducción de muerte celular en cardiomiocitos (cardiomioblastos H9c2).

7. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de péptidos de la Hsp60 sobre la viabilidad celular en cardiomiocitos (cardiomioblastos H9c2).

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los mecanismos de muerte celular o proliferación inducidos tras el tratamiento con péptidos de Hsp60 en cardiomioblastos H9c2.
 - Evaluar la viabilidad celular usando Azul Alamar.
 - Determinar la inducción de apoptosis/necrosis mediante la tinción con Anexina V/ioduro de propidio por citometría de flujo.
 - Determinar los cambios en la expresión de proteína de TLR4 y Hsp60 por Western blot

9. MÉTODOS Y MATERIALES

9.1. Cultivo celular

En el estudio de la fisiopatología de la IC inducida por incrementos en la carga hemodinámica mediada por neurohormonas que se asocia con una remodelación hipertrófica del miocardio se han empleado típicamente cultivos primarios de cardiomiocitos adultos y neonatales de rata, debido a que bajo condiciones patológicas presentan cambios similares a los observados en los cardiomiocitos humanos, como la expresión de genes de origen fetal.

Una alternativa al empleo de cultivos celulares primarios para el tipo de proyectos de investigación mencionados implica el uso de cardiomioblastos ventriculares de rata de la línea celular H9c2. Estas células se aislaron originalmente de tejido ventricular embrionario de rata, y presentan la ventaja de que reducen el número de animales necesarios para los proyectos de investigación, a la vez que son células adherentes y fácilmente cultivables. Además, son útiles para el estudio de patologías cardiovasculares que afectan principalmente a los ventrículos, como la cardiopatía isquémica a hipertensiva (Branco et al., 2015).

A diferencia de los cardiomiocitos adultos y neonatales, las células H9c2 no pueden contraerse, pero sí son capaces de replicarse, por lo cual crecen a confluencia en cultivo. No obstante, representan un buen modelo de estudio porque mantienen varias similitudes importantes con los cardiomiocitos primarios, como la morfología de la membrana, propiedades electrofísicas y la expresión y señalización de proteínas G. Asimismo, los cardiomioblastos también responden ante los estímulos por Ang II y endotelina-1, neurohormonas capaces de inducir hipertrofia celular, la cual es evidente al observar los cambios en el tamaño celular, la reorganización del citoesqueleto y la expresión de genes fetales asociados (Watkins, Borthwick, & Arthur, 2011).

El mantenimiento de la línea celular H9c2 se realizó usando como medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, D7777), suplementado con 10% de SBF (Suero Bovino Fetal, Biowest, S1650) y estreptomina (100

mg/mL; GIBCO, 15140). Se incubaron las células a una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Se realizaron pases de cultivo celular cada 6-7 días, tiempo esperado para que crezcan a confluencia de 80%.

9.2. Determinación de la citotoxicidad de los péptidos de la Hsp60 en cardiomioblastos

Como experimentos iniciales, se determinó la citotoxicidad de los péptidos seleccionados mediante bioensayos con Azul Alamar, una técnica que permite evaluar viabilidad celular con base en la actividad metabólica registrada por una muestra de células ante el tratamiento con un compuesto determinado.

El Azul Alamar es una sal conocida como rezasurina que se encuentra en su estado oxidado, en el cual tiene un color azul. Mediante la actividad de diferentes enzimas intracelulares que catalizan reacciones óxido-reducción, la rezasurina puede reducirse para formar el compuesto denominado resofurina, el cual presenta un cambio colorimétrico de azul a rosa observable a luz visible, además de emitir fluorescencia al ser excitado por una longitud de onda determinada. De manera importante, el Azul Alamar funciona como un aceptor de electrones dentro de la cadena de transporte mitocondrial, en la cual varios intermediarios y enzimas como el NADH, FMNH, FADH, NADPH y los citocromos pueden reducir la rezasurina a resofurina, por lo que la viabilidad celular estimada se puede entender en gran parte como resultado de cambios en el metabolismo mitocondrial, aunque la actividad de otras enzimas reductasas ubicadas en el citoplasma también contribuyen en el proceso y pueden ser particularmente importantes para células, como los eritrocitos, que carecen de mitocondrias. De manera general, aquellas células con un metabolismo más activo y con una capacidad redox más prominente serán más eficientes en reducir el Azul Alamar, lo cual se interpreta como una mayor viabilidad celular (Rampersad, 2012).

Debido a su capacidad de difundir libremente a través de la membrana plasmática, el Azul Alamar puede internalizarse en las células cuando se incuba por tiempo aproximado de una a tres horas a una temperatura de 37°C. Tras este tiempo, los resultados pueden interpretarse con base al cambio de coloración de manera cualitativa o cuantitativa mediante la medición colorimétrica o de

fluorescencia de la resofurina; se recomienda esta última opción dada su mayor sensibilidad, para lo cual se pueden emplear longitudes de onda de 530 y 590 nm para excitación y emisión, respectivamente, mediante el uso de un espectrofotómetro (Page, Page, & Noel, 1993).

Es importante estandarizar las condiciones ideales para cada línea celular a emplear, así como para los compuestos experimentales cuya citotoxicidad se quiere identificar. En el primer caso, la densidad de células empleada funciona como determinante de la respuesta observada; un número reducido de células tardará más tiempo en producir resofurina, contribuyendo a eventos falsos positivos. Por otra parte, se ha encontrado que algunos compuestos, como el SBF 10% y la albúmina sérica bovina 10% (BSA, por sus siglas en inglés) son capaces de apagar la señal fluorescente emitida por la resofurina, en un fenómeno de “*quenching*”. El tiempo de incubación que pasan las células con Azul Alamar también es otro factor que potencialmente contribuye a variaciones en la fluorescencia, donde tiempos mayores de incubación están asociados a la generación de dihidroresofurina, un producto de la resofurina que carece de color y favorece el cese de las señales fluorescentes (Goegan, Johnson, & Vincent, 1995).

Para determinar la dosis letal 50 (DL_{50}) de los péptidos seleccionados de la Hsp60 (derivados de *M. bovis*) en cardiomioblastos de rata se cultivaron células H9c2 a densidades de 1.75×10^3 en 200 μ L de DMEM enriquecido con SBF al 10% (descrito como DMEM+) en placas de 96 pozos. Al día siguiente se procedió a retirar el medio de las células, lavar con DMEM sin suero, y reemplazar por DMEM depletado en SBF al 1% (descrito como DMEM+SBF1%) y se permitió su incubación por 24 h. Posterior a esto, las células se trataron con las diferentes condiciones experimentales: control (incubado sólo con DMEM+SBF1% y un volumen equivalente de PBS al cual están preparados los péptidos que sirven como tratamientos), LPS (como control positivo de muerte por TLR4) péptido 1, péptido 2 y péptido 3. Se estudió la toxicidad de los péptidos de la Hsp60 a las concentraciones de 1 ng/mL a 400 μ g/mL. Se incubaron las células con el tratamiento en réplicas de 5 por grupo y los resultados de viabilidad celular se registraron en experimentos independientes a 24, 48 y 72 h para estandarizar las

condiciones exactas a las cuales se registra la DL₅₀ de los tratamientos. Se generaron triplicados de cada uno de estos experimentos para fines del análisis estadístico de los resultados. Para determinar la viabilidad celular pasado el tiempo de tratamiento con los péptidos, las células se incubaron con Azul Alamar (Sigma-Aldrich, USA) (1:10) durante 2 h a 37°C; se cuantificó la fluorescencia emitida por medio de espectrofotometría a longitudes de onda de 530 y 590 nm para excitación y emisión, respectivamente.

9.3. Determinación de los mecanismos de muerte asociados al tratamiento con péptidos de la Hsp60

Para profundizar en los mecanismos que pudieran estar contribuyendo al efecto citotóxico observado por algunos de los péptidos explorados, se optó por complementar los bioensayos con Azul Alamar mediante experimentos de viabilidad celular de mayor sensibilidad utilizando citometría de flujo.

La citometría de flujo es una metodología de análisis a nivel de célula única que se emplea para tipificar e identificar poblaciones celulares, de partículas y demás elementos en suspensión con base a sus patrones de dispersión de luz al ser interrogadas por un láser. El citómetro de flujo está equipado con una mesa interna en donde se encuentra un sistema de láseres, espejos dicróicos y detectores que se encargan de captar las emisiones de luz y fluorescencia que se generan durante el paso de las muestras por el punto de interrogación (Picot, Guerin, Le Van Kim, & Boulanger, 2012).

La muestra en suspensión es analizada molécula por molécula a manera de fila india gracias a un proceso conocido como enfoque hidrodinámico. Este último está dado por la acción de un fluido envolvente a presión que posiciona la muestra a evaluar al centro de la celda de flujo, de manera que estas dos partes no se mezclan. Una vez que los analitos pasan individualmente a través del sistema, estos alcanzan el punto de interrogación en donde son incididos con diferentes lasers al mismo tiempo (Frankowski et al., 2013).

Aterrizando los siguientes ejemplos a poblaciones celulares, la dispersión de luz en un plano frontal (en un ángulo agudo) es captada por un detector que sigue la misma orientación del laser. La intensidad de la luz documentada en esta

dirección es proporcional al tamaño de la célula, por lo que dicho detector de dispersión frontal (FSC, forward scatter, por sus siglas en inglés) provee información sobre las dimensiones de las células en suspensión. Por otra parte, la luz que se dispersa en cualquiera de las demás direcciones es captada por detectores de dispersión lateral (SSC, side scatter, por sus siglas en inglés). La información integrada por éstos refleja el grado de complejidad celular, que puede entenderse en términos de la granularidad y compartimentalización celular, así como de la rugosidad de la membrana plasmática. Al tomar en cuenta la información obtenida por los FSC y SSC, se puede tener una idea general sobre la identidad de las células presentes en la muestra.

La detección de emisiones de fluorescencia tras la excitación con lasers a longitudes de onda específicas complementan en mayor grado la caracterización celular antes descrita. La determinación de la expresión de marcadores específicos para diferentes linajes celulares se puede realizar mediante el uso de anticuerpos y otras moléculas marcadas con elementos fluorescentes, cuya emisión es captada por detectores para los canales de fluorescencia correspondientes (Herzenberg et al., 2002).

Una de las múltiples aplicaciones que recibe la citometría de flujo para el estudio de eventos celulares es la determinación de la viabilidad celular mediante la tinción con Anexina V y yoduro de propidio, las cuales sirven como indicadores de apoptosis y necrosis, respectivamente (Demchenko, 2013). La familia de las anexinas está compuesta por proteínas que se identificaron de manera inicial por su participación como agentes anticoagulantes al unirse a proteínas de matriz extracelular cargadas negativamente, como el colágeno expuesto ante lesiones vasculares que dan pie a la vía extrínseca de la cascada de la coagulación, en la que la unión de Anexina V a estas proteínas bloquea potenciales sitios de unión a plaquetas (Gerke & Moss, 2002). Otro grupo de moléculas a las cuales se une la Anexina V son los fosfolípidos de membrana, de manera particular a los residuos de fosfatidilserina con carga negativa, que normalmente se encuentran en la cara citosólica de la bicapa lipídica. La relación de esta proteína con procesos apoptóticos radica en el papel que tiene la fosfatidilserina en estos. Se reconoce

que uno de los primeros eventos que denotan el compromiso de una célula a una muerte programada se manifiesta en la forma de una reorganización de los lípidos de la membrana plasmática, con exposición de residuos de fosfatidilserina hacia la cara exoplasmática, en donde pueden ser reconocidas por macrófagos para su fagocitosis y aclaramiento (Dillon, Mancini, Rosen, & Schlissel, 2014). A pH entre 5 y 7 (Köhler, Hering, Zschörnig, & Arnold, 1997), la interacción entre Anexina V y fosfatidilserina depende de la presencia de iones Ca^{+2} en un rango de 1.0-2.5 mM; (Tait & Gibson, 1992).

Por otra parte, el yoduro de propidio es una molécula capaz de intercalarse en el ADN nuclear, por lo que se emplea cuando se desea identificar esta estructura. Es impermeable a la membrana plasmática, por lo que sólo difunde en aquellas células que presentan pérdida de la integridad de membrana, como sucede en células en apoptosis tardía o en necrosis (Rieger, Nelson, Konowalchuk, & Barreda, 2011). Cuando se usan juntas las tinciones de Anexina V y yoduro de propidio se pueden etiquetar poblaciones celulares para distinguir entre aquellas que se encuentran en procesos de apoptosis temprana, tardía o que ya cursan en necrosis. De esta forma, la doble tinción sirve para evaluar la viabilidad celular posterior a la inducción de un tratamiento experimental, y es una técnica que se ha vuelto bastante usada por su carácter cuantitativo y por su alta sensibilidad de detección.

Para identificar los mecanismos de muerte asociados al tratamiento con péptidos de la Hsp60, se determinó la viabilidad celular en términos de apoptosis y necrosis por medio de la tinción con Anexina V/yoduro de propidio, y se analizó por citometría de flujo. Para esto, se tripsinizaron H9c2 a partir de una placa de 6 pozos tras 72 h de tratamiento con péptidos a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o LPS a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se contó el número de células en cada pozo y se fijó a 100,000 para cada grupo. A continuación, se lavaron las células con 1 mL de Tyrode+glucosa [5 mM] (Tyr/Glc) y se centrifugaron a 220 x g por 5 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante de cada muestra y se resuspendieron las células en 195 μL de solución Tyr/Glc + 1.5 mM cloruro de calcio (Tyr/Glc/ Ca^{+2}) y se tiñeron con 5 μL de Anexina V-PE-Cy7 (eBioscience, 88-8103, San Diego, CA, USA) por 15 min en la oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células en 1 mL de Tyr/Glc y se centrifugaron como

se indicó anteriormente. Se descartaron los sobrenadantes por decantación y se resuspendieron las células en 195 μL de solución Tyr/Glc/ Ca^{+2} , y se incubaron con 500 ng de yoduro de propidio (P4170) para descartar las células necróticas. Tras las tinciones mencionadas, se analizaron las células por citometría de flujo de manera inmediata. El ensayo empleó un análisis de dos colores que determina la unión de la Anexina V conjugada con PE-Cy7, así como la tinción de yoduro de propidio (excitación a 488 nm). Con el fin de determinar las proporciones de células viables, apoptóticas y necróticas, se realizó compensación de la fluorescencia. Tras descartar los dobletes, se distinguieron las células vivas (Anexina V-/IP-, Q4), en apoptosis temprana (Anexina V+/IP-, Q3), en apoptosis tardía (Anexina V+/IP+, Q2), y necróticas (Anexina V-/IP+, Q1).

9.4. Determinación de vías de señalización celular por Western blot

Con el fin de determinar el papel de la vía TLR4/Hsp60 en el contexto de la citotoxicidad observada de algunos de los péptidos, se decidió estudiar los cambios en el perfil de expresión las dos proteínas mencionadas anteriormente. Se describe la metodología empleada a continuación.

Se conoce como Western blot, o inmunoblot, a la técnica empleada en biología molecular para el análisis e identificación de proteínas en muestras derivadas de tejidos en sistemas biológicos, que pueden ser, pero no están limitados, a homogeneizados o lisados celulares. El proceso implica la separación de las proteínas mediante electroforesis, generalmente empleando geles de poliacrilamida, con base a una relación masa/carga. Posteriormente, durante un proceso de transferencia, las proteínas migran del gel hacia una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF), en las cuales pueden ser marcadas puntualmente con el uso de anticuerpos (Burnette, 1981). Mediante el uso de sistemas de detección directa o indirecta, es posible visualizar las proteínas de interés unidas a los anticuerpos empleados mediante reacciones colorimétricas, quimioluminiscentes o fluorescentes que pueden ser evaluadas mediante sistemas tradicionales y digitales.

El procesamiento de las muestras comienza con el aislamiento del conjunto de proteínas presentes en una muestra, donde ésta suele ser provenir de tejidos completos o de células en cultivo. Para este propósito, es necesario eliminar el resto de las biomoléculas que no representan proteínas, incluyendo carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Existen diferentes formulaciones de soluciones de lisis que logran esta encomienda con base en propiedades como: 1) pH, 2) fuerza iónica, 3) presencia de detergentes y agentes desnaturizantes, 4) inhibidores de proteólisis. Ejemplos de algunas de las formulaciones más comúnmente empleadas incluyen el amortiguador de radioinmunoprecipitación (RIPA, Radioimmuno Precipitation Assay, por sus siglas en inglés) y NP-40 (Nonyl-Phenoxypolyethoxylethanol-40, por sus siglas en inglés) (Peach, Marsh, Miskiewicz, & MacPhee, 2015).

Una vez separada la fracción protéica del resto de los componentes celulares, es necesario cuantificar los niveles de proteína contenidos en las muestras obtenidas. Para ello se hace uso de una curva de calibración con una proteína con alto grado de pureza y cuya concentración stock sea conocida. Se preparan concentraciones crecientes de esta proteína para generar puntos que puedan ser graficados dentro de un modelo de regresión lineal a partir del cual se puedan interpolar los valores de concentración de proteína obtenidos de las muestras de interés (Lavagnini & Magno, 2007). La determinación de proteína suele hacerse mediante métodos de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/Vis) que reportan *absorbancia* siguiendo los principios de la Ley de Beer-Lambert, en donde este parámetro se entiende como el logaritmo negativo de la *transmitancia*. En términos prácticos, en una muestra cuya concentración de un determinado analito es mayor, la transmitancia de luz a través de ella será menor y por consiguiente su absorbancia, mayor. De esta forma, es posible evaluar la concentración de una muestra de proteína en función de su absorbancia, interpolándola dentro de un modelo lineal de una curva de calibración (Mantele & Deniz, 2017).

Existen varios métodos para la cuantificación de proteína por análisis colorimétricos, ejemplos de estos son el ensayo de Biuret, Bradford y Lowry, cuyos protocolos implican variaciones metodológicas menores entre ellos que les confieren diferencias en la sensibilidad de sus resultados. Para el caso de el ensayo

de Lowry, método empleado en los experimentos de esta tesis, la detección de proteína ocurre en dos pasos. El primero de ellos consta de un ensayo de Biuret, en el cual se emplea el reactivo del mismo nombre; éste contiene sulfato de cobre (CuSO_4) el cual se ioniza en medio acuoso para liberar iones cúpricos (Cu^{+2}). En presencia de un pH alcalino, favorecido por el hidróxido de sodio (NaOH) en la solución de Biuret, los iones Cu^{+2} interactúan con los enlaces peptídicos (hasta cuatro al mismo tiempo por cada ion) de las proteínas, tras lo cual son reducidos a su estado de oxidación I para formar iones cuprosos (Cu^{+1}) (Sapan, Lundblad, & Price, 1999). La segunda parte del método de Lowry implica una reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual funciona como un agente oxidante que se une a elementos como los iones Cu^{+1} producidos mediante la incubación de proteínas con Biuret, así como a residuos de aminoácidos como cisteína, tirosina y triptófano. El resultado de esta interacción conlleva a la oxidación de los elementos antes mencionados y a la reducción del Folin-Ciocalteu, de manera más específica del ácido fosfomolibdico presente en esta solución, el cual se convierte en un compuesto conocido como azul de molibdeno, que absorbe luz a 750 nm (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

El procedimiento de electroforesis seguido de manera usual para Western blot implica la separación de proteínas mediante un gel de poliacrilamida en presencia de condiciones reductoras y desnaturizantes, que incluyen el uso de dodecil sulfato sódico (SDS); dichas condiciones se engloban bajo el acrónimo SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, por sus siglas en inglés), el cual se logra mediante varias intervenciones. Primero, las muestras de proteína se exponen a altas temperaturas (95°C por 7 minutos), lo cual sirve para romper los puentes de hidrógeno que le confieren la estructura secundaria a las proteínas. Por otra parte, el SDS presente en el amortiguador de carga en el cual se mezclan las proteínas antes de cargarse en el gel de poliacrilamida, le confiere una carga negativa a los residuos de aminoácidos de las muestras, además de que rompe los enlaces no covalentes entre proteínas. También presente en el amortiguador de carga, el β -mercaptoetanol sirve como agente reductor de los puentes disulfuro que confieren la estructura terciaria de las proteínas. Como resultado de todos estos eventos, las

proteínas que entran a SDS-PAGE se encuentran como cadenas polipeptídicas cargadas negativamente, por lo que durante la electroforesis se resuelven en función de su relación masa/carga (Svasti & Panijpan, 2009).

La composición del gel de acrilamida utilizado contribuye al componente *masa* de la relación anterior. Se emplean soluciones de acrilamida-bisacrilamida en proporciones de (29:1); los polímeros de estos compuestos forman un entramado con poros a través de los cuales migran las proteínas. Entre mayor es el porcentaje de acrilamida de un gel, el entramado es más pronunciado, generando poros más cerrados que propician que únicamente proteínas pequeñas que son capaces de atravesarlos migren a lo largo del gel, mientras que las de mayor tamaño se estancan; la situación contraria es cierta para aquellos geles con menores porcentajes de acrilamida.

Los geles empleados para SDS-PAGE suelen ser discontinuos, lo cual implica que están constituidos por soluciones que forman dos fases con propiedades diferentes. La primera es la fase de compactación, en la cual la proteína se concentra y se empaqueta de manera que toda se encuentre al mismo nivel del gel antes de migrar a la siguiente fase. Esto garantiza que toda la proteína corra de manera uniforme, y que la separación observada sea verdaderamente producto de las diferencias en la relación masa/carga de cada una. Los tres componentes de la solución que contribuyen a este fenómeno son: 1) iones cloruro (Cl^-) derivados de Tris-HCl, 2) complejo proteínas-SDS, 3) glicina (presente en el amortiguador de corrida). Este último componente determina el orden en que progresan las proteínas en el gel. La glicina es un aminoácido pequeño que se comporta como zwitterión (alcanzando su punto isoeléctrico) a un pH de 5.95, mientras que se puede ionizar en presencia de medios más ácidos (pH 2.3) o alcalinos (pH 9.6), en los cuales se le encuentra con carga positiva y negativa, respectivamente. En la fase de concentración del gel de poliacrilamida, donde el pH es de 6.8, la glicina tiende a estar más cerca a su punto isoeléctrico, por lo que en el camino hacia el cátodo primero avanzan los iones Cl^- , seguidos de las proteínas cargadas negativamente por el SDS, y por último la glicina (Laemmli, 1970).

En la fase de separación, donde el pH es de 8.8, la glicina tiende a estar cargada negativamente, por lo que el orden de los elementos antes descritos cambia una vez más. En este escenario, los iones Cl⁻ siguen aportando la mayoría de las cargas negativas, seguidos por la glicina y por último las proteínas. De esta forma, éstas últimas migran a favor del campo electromagnético establecido por una fuente de poder conectada a un cátodo y ánodo, y su resolución depende de su tamaño y su capacidad de atravesar los poros establecidos por el gel de poliacrilamida. En breve, las proteínas más grandes tardan más en migrar y tienden a atorarse en la parte superior del gel, mientras que las más chicas avanzan más rápido y no presentan mayores inconvenientes al cruzar a través de la matriz de poliacrilamida .

Una vez separadas las proteínas de interés, se les procede a la transferir del gel hacia una membrana que puede ser de nitrocelulosa o de polifluoruro de polivinidileno (PVDF). En ambos casos, estas últimas contienen polímeros adheridos que unen proteínas de manera inespecífica, por lo que al poner en proximidad el gel de poliacrilamida con una de estas membranas, en presencia de un campo electromagnético generado por una fuente de poder, las proteínas del gel tienden a migrar hacia la membrana dado que ésta se orienta hacia el cátodo. En el caso de las membranas de PVDF, éstas deben humedecerse antes para poder permitir la transferencia de proteínas; sin embargo, debido a su alta hidrofobicidad, se requiere de un alcohol, como metanol o etanol para lograrlo (Tovey & Baldo, 1989). Existen dos métodos de electrotransferencia, la húmeda y la semi-seca. En la primera, se genera un campo electromagnético que se aplica al amortiguador en el cual se sumerge el sándwich de transferencia (que consiste en almohadillas de papel filtro entre los cuales se encuentran el gel y la membrana al centro). En el formato semi-seco, el sándwich está en contacto directo con las superficies que sirven de ánodo y cátodo, por lo que el proceso es más rápido, pero está sujeto a secarse debido a la menor disponibilidad de buffer en la cámara y a la generación de calor producto de la corriente establecida (Goldman, Ursitti, Mozdzanowski, & Speicher, 2015). De manera general, se recomienda emplear el método húmedo para el caso de proteínas de alto peso molecular, dado que requieren mayores

tiempos de transferencia y en éste sistema corren menos riesgo de sobrecalentarse comparado con el método semi-seco.

Tras la transferencia, la proteína ahora se encuentra adsorbida a la membrana. El siguiente paso consiste en incubar esta última en una solución de bloqueo que contenga proteínas capaces de unirse de manera inespecífica a todos los sitios de la membrana que no hayan sido ocupados por proteínas de la muestra original. Para este propósito, se emplea de manera usual leche baja en grasa o BSA al 5%. Es importante realizar este paso antes de incubar con los anticuerpos dado que con ello se evita la unión inespecífica de éstos a la membrana, y con ello se reduce el ruido de fondo observado al revelar los resultados. La incubación sea con leche o con BSA se realiza por una a dos horas a temperatura ambiente. Pasado el periodo de bloqueo, se procede a realizar 3 lavados con una solución de PBST o TBST; ambas soluciones cuentan con el surfactante Tween 20 al 0.1%, que contribuye a solubilizar la proteína no unida para su remoción (Mahmood & Yang, 2012).

A partir de este momento inicia la parte que se refiere al término inmunoblot, que consiste en la detección de las proteínas de interés contenidas en la membrana mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos a éstas. Los anticuerpos son tradicionalmente producidos en animales mediante la inmunización con el antígeno ante el cual se desea se generen defensas humorales. Mediante la purificación a partir del suero, los anticuerpos obtenidos pueden ser monoclonales o policlonales, dependiendo de la especificidad que tienen contra un epítipo determinado. Los modelos de hibridoma son otra fuente importante para la generación de anticuerpos, siendo particularmente útiles para obtener ejemplares de tipo monoclonal (Pogson, Parola, Kelton, Heuberger, & Reddy, 2016). Tras el bloqueo y los lavados, se incuban las membranas con el anticuerpo primario dirigido a la proteína de interés. A su vez, se debe aplicar anticuerpo para detectar una proteína de referencia, cuya expresión sea constitutiva y no se afecte por el tratamiento experimental. Ésta proteína de referencia sirve como control de carga ante el cual se normalizan los resultados (Li & Shen, 2013). La incubación con los anticuerpos primarios se hace 1 hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C, dónde ésta última opción

demuestra mayor especificidad de unión a la proteína de interés, pero también mayor unión inespecífica.

Los métodos de detección de las proteínas de interés pueden ser directos o indirectos. En el caso de los primeros, el anticuerpo primario viene previamente conjugado con un fluorocromo, que absorbe y emite fluorescencia a longitudes de onda determinadas. Por otra parte, los métodos indirectos hacen uso de moléculas reporteras que vienen incorporadas a un anticuerpo secundario obtenido de una especie diferente a la cual se utilizó para el anticuerpo primario. La mayoría de estos métodos indirectos consisten en inmunoglobulinas de tipo G (IgG) conjugadas a enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) y fosfatasa alcalina. La primera de estas dos se prefiere frecuentemente por su practicidad, participando en reacciones de quimioluminiscencia que pueden ser detectadas mediante el uso de laminillas de rayos X o sistemas de fotodocumentación digitales capaces de ejecutar un análisis densitométrico cuantitativo (Janes, 2015).

En breve, para la realización de los experimentos de Western blot se procesaron células H9c2 tras el tratamiento con péptidos de la Hsp60 a 72 h en SBF 1% en placas de 6 pozos utilizando buffer de lisis RIPA adicionado con inhibidor de proteasas y fosfatasas. Se realizó la cuantificación de los niveles de proteína en cada grupo mediante el método de Lowry utilizando una curva de calibración de BSA. Las proteínas se mezclaron en amortiguador de carga de Laemmli y se calentaron a 95°C por 7 min para su desnaturalización. Se utilizaron 30 µg de proteína por muestra para analizar el perfil de expresión del TLR4 y Hsp60, utilizando GAPDH como control constitutivo. Tras la desnaturalización, se procesaron las muestras por SDS-PAGE utilizando un gel al 10% que se corrió a 70 mV por 20 min durante la fase de compactación, y posteriormente por 70 min a 120 mV para la de separación. A continuación, se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF de 0.2 µm en cámara semi-seca durante 1 h a 10 mV en amortiguador de transferencia (agua bidestilada, 20% metanol, glicina 192 mM, Trizma base 25 mM). Posteriormente, las membranas se bloquearon por 2 h usando 5% leche en 0.1% PBST. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno usando PBST 0.1%, tras lo cual se incubaron las membranas durante toda la noche con los

anticuerpos primarios contra TLR4 y Hsp60 (ratón, 1:1,000 en 5% BSA en PBST 0.1%) y GAPDH (conejo, 1:10,000 en 5% BSA en PBST 0.1%) a 4°C. Al día siguiente, se recuperaron los anticuerpos primarios y se hizo un ciclo de 3 lavados por 5 min con PBST 0.1%. A continuación se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios anti-ratón para TLR4 y Hsp60 (conejo, 1:2,000 en 5% leche en PBST 0.1%), y anti-conejo para GAPDH (cabra, 1:10,000 en 5% BSA en PBST 0.1%) por 2 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizó un ciclo completo de lavados con se describió anteriormente y se procedió a revelar los resultados usando los reactivos de quimioluminiscencia Clarity Western ECL Blotting substrates (BioRad) y Millipore Sigma™ Luminata Forte Western HRP substrate a partes iguales. Para la exposición de las membranas, captura de las imágenes y análisis densitométrico de los resultados, se empleó el sistema de fotodocumentación UVP “BioSpectrum Imaging System” (UVP, LLC, Upland, California, EUA).

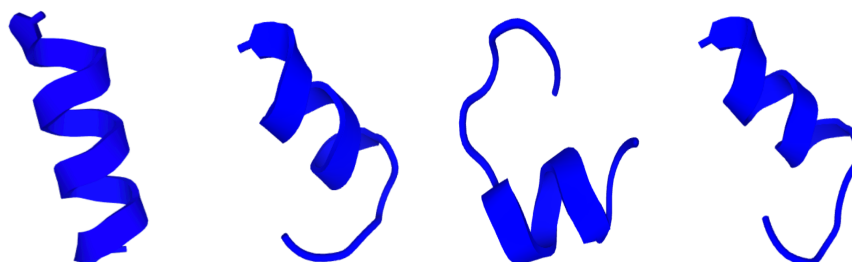
9.5. Análisis estadístico

Todos los resultados se reportan como media \pm error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA de un solo factor, seguidas por pruebas post hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para todos los resultados, se consideró como estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$.

10. RESULTADOS

10.1. Simulación *in silico* de los péptidos de la Hsp60 y determinación de propiedades físico-químicas

Con el fin de describir la identidad de los péptidos de la Hsp60 seleccionados así como sus propiedades físico-químicas, se consultó la plataforma de predicción de estructuras peptídicas *de novo* del portal web RPBS (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3>) (Neron et al, 2009) a través de la cual se pudo generar una simulación de la estructura secundaria de los péptidos, evidenciando la predominancia de alfa hélices, dobleces y giros en estos (Fig. 1 y 2). Utilizando la herramienta para el análisis de péptidos de ThermoFisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/peptides-proteins/custom-peptide-synthesis-services/peptide-analyzing-tool.html>), se determinaron algunas propiedades físico-químicas de los cuatro péptidos, incluyendo su punto isoeléctrico, solubilidad y peso molecular.



Nombre	Péptido 3	Péptido 4	Péptido 5	Péptido 6
Secuencia de aminoácidos	VTRSALQNAASIAGL	AEAMDKVGNQGVITV	VEGAGDTDAIAGRVA	APTLDELKLEGDEAT
Efecto reportado*	Desconocido	Proaterogénico	Antiaterogénico	Antiaterogénico
Punto isoeléctrico	11.1	3.8	3.7	3.5
Solubilidad	Hidrofóbico (moderado)	Hidrofóbico (moderado)	Hidrofóbico (moderado)	Hidrofóbico (moderado)
Peso molecular (kDa)	1.47	1.53	1.40	1.60

Figura 1. Simulación *in silico* de los péptidos de la Hsp60 y determinación de sus propiedades físico-químicas. Se realizó el análisis de las cuatro secuencias peptídicas elegidas para evaluar en cardiomioblastos. El modelaje de estos indica que forman estructuras secundarias como alfa hélices, giros y dobleces. *= De acuerdo con Grundtman et al, (2015).

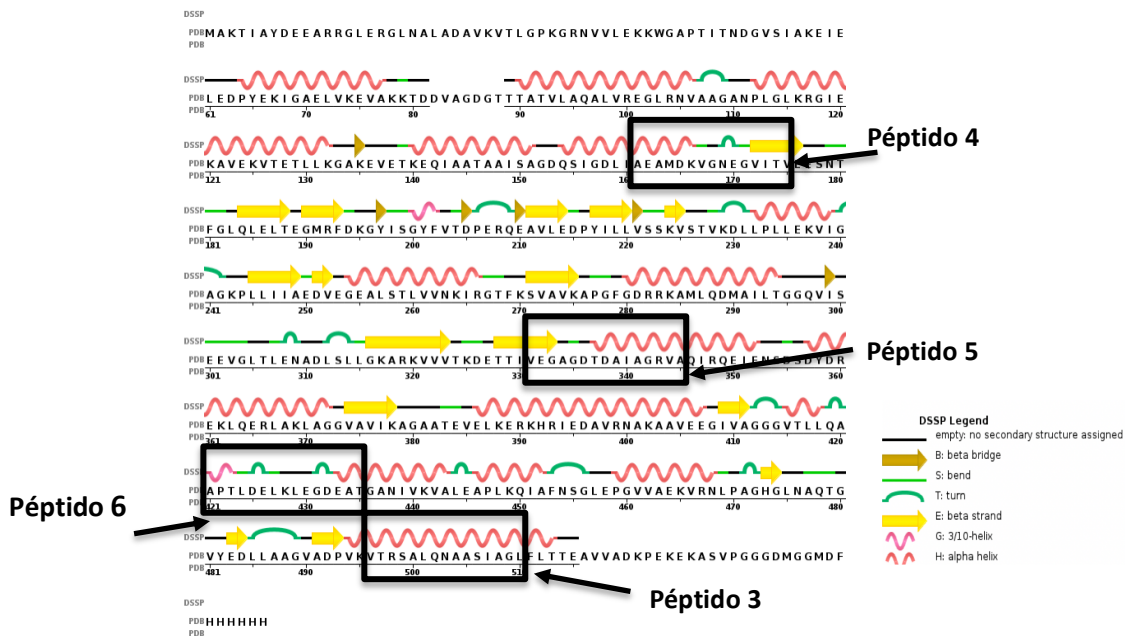


Figura 2. Secuencia completa de aminoácidos de la Hsp60 de *M. bovis*. La chaperonina micobacteriana consta de 540 aminoácidos, de los cuales 4 secuencias de 15 residuos cada una fueron elegidas, mismas que se indican enmarcadas con color negro.

10.2. Determinación de la concentración de trabajo para el LPS en cardiomioblastos H9c2 usando Azul Alamar

Dados los estudios descritos en la literatura que indican que otros péptidos de la Hsp60 ejercen sus efectos citotóxicos e inmunomodulatorios en otras células tras su interacción con el TLR4, se decidió utilizar una molécula que tuviera la capacidad de activar a dicho receptor y cuyo efecto citotóxico sea reconocido. Por este motivo, se incluyó un grupo que sirve como control positivo de muerte, cuyo tratamiento se realizó con LPS de *E. coli* (serotipo 055:B5). Se realizaron experimentos a diferentes concentraciones y tiempos de incubación para estandarizar las condiciones bajo las cuales se inducía muerte celular en los cardiomioblastos. Los resultados de las primeras pruebas exploratorias determinaron que una concentración de 200 µg/mL reduce la viabilidad de las células H9c2 en aproximadamente 20-30% (Fig. 3A) a 72 h en SBF 1%, según lo observado en lecturas con Azul Alamar. A continuación, se amplió el número de réplicas a 72 h para corroborar el dato anterior (Fig. 3B), y se determinó que no existía diferencia estadística significativa entre esta

concentración elegida y la siguiente de 300 µg/mL, con lo que se corroboró la decisión de usar 200 µg/mL como concentración de trabajo. La reducción de la viabilidad observada tras el tratamiento con LPS indica que la vía de señalización proinflamatoria del TLR4 está patente en nuestras condiciones experimentales, lo cual podría explicar los cambios en el control positivo de muerte.

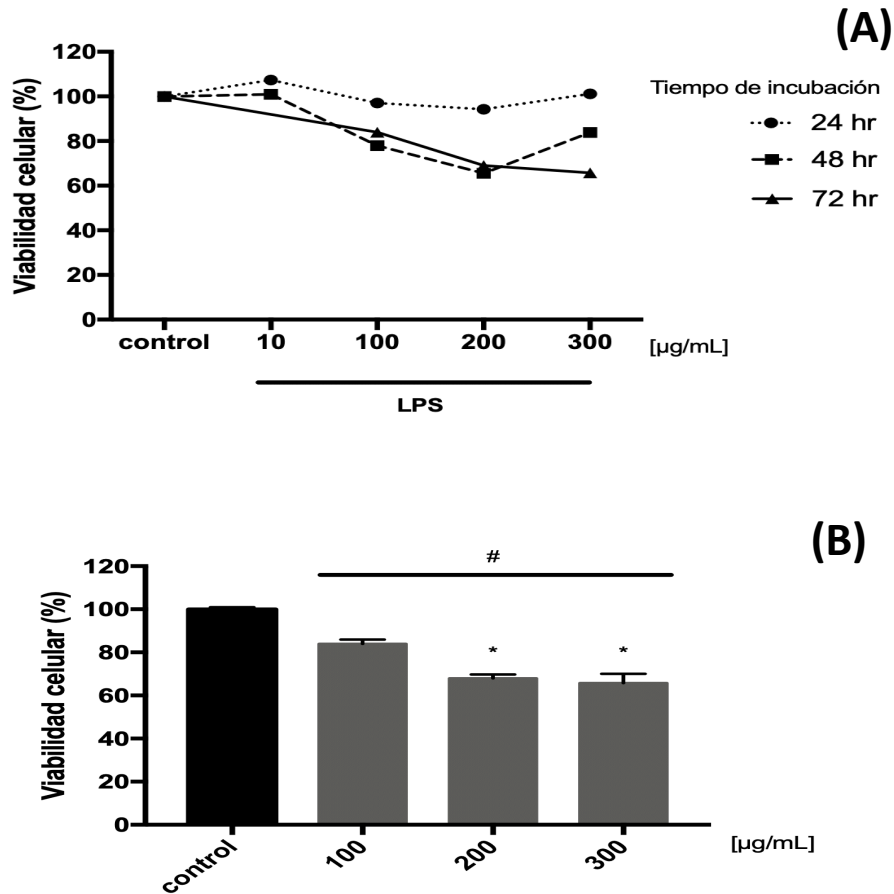


Figura 3. Experimentos dosis-respuesta con LPS en cardiomioblastos. **(A)** Se sembraron células en H9c2 en placas de 96 pozos para realizar experimentos exploratorios con diferentes concentraciones de LPS de *E. coli* (serotipo 055:B5) a diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h), donde se identificó a la dosis de 200 µg/mL como posible dosis de trabajo. **(B)** Se amplió el número de experimentos realizados a 72 h y se observó que no existía diferencia estadística significativa entre las concentraciones de 200 y 300 µg/mL, por lo que se optó por la primera como concentración de trabajo. Los datos de esta gráfica incluyen valores del grupo tratado con LPS 200 µg/mL que fueron realizados por el Dr. Guerrero. LPS 100 µg/mL: n=4 con 18 repeticiones internas; LPS 200 µg/mL: n=7 con 99 repeticiones internas; LPS 300 µg/mL: n=1 con 4 repeticiones internas. #p<0.0001 con respecto al grupo control, *p<0.05 con respecto al grupo de LPS 100 µg/mL.

10.3. Determinación de la concentración de trabajo para los péptidos de la Hsp60 en cardiomioblastos H9c2 usando Azul Alamar

De manera similar a lo descrito para el caso del LPS, se estandarizaron las condiciones para el tratamiento de las células H9c2 con los péptidos de la Hsp60 seleccionados. Los ensayos exploratorios a 24, 48 y 72 h nos permitieron identificar que el péptido 4 a 200 µg/mL reducía la viabilidad en cerca del 40%, mientras que los péptidos 5 y 6 no manifestaban diferencia con el control. Con base en esto, se decidió aumentar el número de réplicas experimentales a 72 h para confirmar los efectos encontrados para cada péptido. Debido a variaciones durante el proceso de síntesis por parte del proveedor de nuestros péptidos, el último lote que nos entregaron demostró tener mayor efecto citotóxico sobre la viabilidad celular (Fig 4D). El proveedor indicó que el lote correspondiente al péptido 4 tenía una concentración mayor de ácido trifluoroacético en esta ocasión, un compuesto volátil empleado durante la elución de los péptidos, el cual podía estar relacionado a la muerte observada dado que al someterse a temperaturas elevadas o ultrasonificación (este último es parte de nuestro protocolo para la resuspensión de nuestros péptidos), puede escindirse en fluoruro de hidrógeno, un gas que es tóxico (Sun & Corbett, 2018). Por este motivo, se decidió suspender el uso del péptido 4, y se exploró el péptido 3 como alternativa. Se determinó que a 400 µg/mL por 72 h, este nuevo péptido mostraba tener una citotoxicidad similar al péptido 4, por lo que se conservó para el resto de los experimentos. Los demás péptidos (5 y 6) se exploraron a estas mismas condiciones, encontrando que a pesar del incremento en la concentración a 400 µg/mL, no mostraban reducir la viabilidad. Considerando estos resultados, se decidió utilizar como concentración de trabajo para los péptidos 400 µg/mL a 72 h, explorando sus resultados en los experimentos descritos en el siguiente apartado.

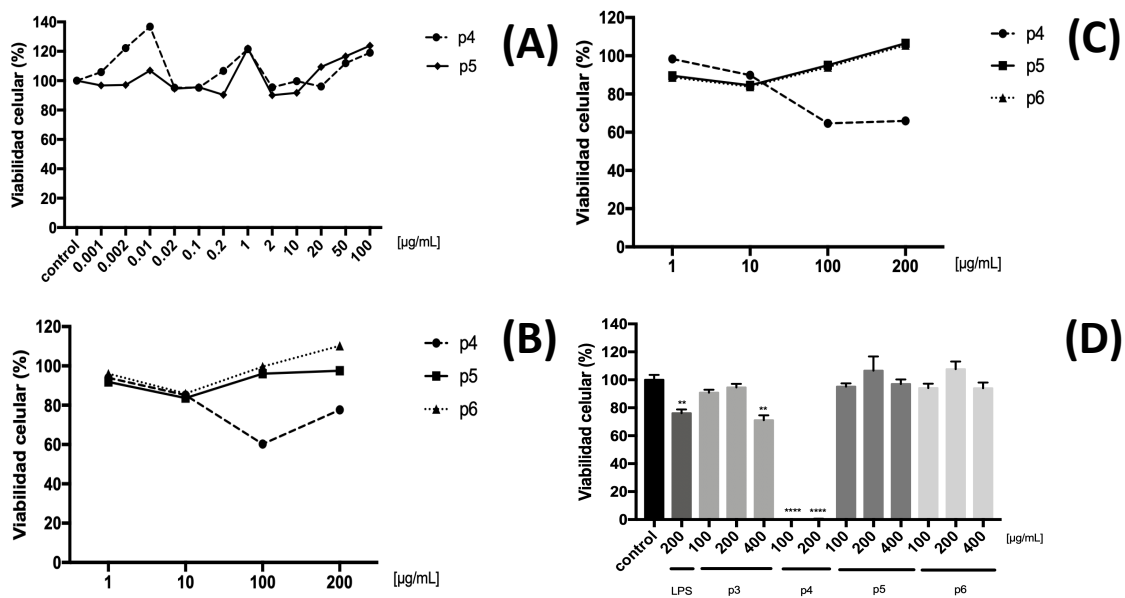


Figura 4. Experimentos dosis-respuesta con péptidos de la Hsp60 en cardiomioblastos. Se sembraron células en H9c2 en placas de 96 pozos con diferentes concentraciones de LPS de *E. coli* (serotipo 055:B5) a diferentes 24 (A), 48 (B) y 72 (C) h. Los resultados de viabilidad celular se registraron de acuerdo al protocolo de Azul Alamar. (D) Experimentos exploratorios incluyendo el péptido 3 y los demás a 400 µg/mL. Los datos de esta gráfica correspondientes al grupo tratado con el péptido 3 fueron realizados por el Dr. Guerrero. **p<0.01; ****p<0.0001.

10.4. Ensayo de citotoxicidad de los péptidos de Hsp60 y LPS en cardiomioblastos H9c2 usando Azul Alamar

Con el objetivo de determinar el efecto que los péptidos de la Hsp60 seleccionados tienen sobre la viabilidad de los cardiomioblastos H9c2 en cultivo, se realizaron bioensayos con Azul Alamar usando los péptidos a 400 µg/mL y el LPS a 200 µg/mL por 72 h.

Se realizaron tres experimentos independientes (n=3) usando pasajes diferentes de células H9c2 en todos los casos; el efecto de cada tratamiento se determinó en cinco muestras por cada experimento. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Fig. 5

Como primer hallazgo, se corroboró el efecto del LPS sobre la reducción en la viabilidad de los cardiomioblastos, el cual es estadísticamente significativo

($p < 0.0001$). En cuanto al tratamiento con los péptidos de la Hsp60, se observa que existen diferencias en la respuesta dependiendo del péptido en cuestión. En este sentido, el péptido 3 reduce la viabilidad celular en una manera similar al LPS (~20%, $p < 0.0001$), el péptido 5 la incrementa en cerca de 10% ($p < 0.05$), mientras que el p6 no muestra diferencias.

Sobre las concentraciones de los grupos experimentales empleadas, se puede deducir que se necesitan niveles mayores o iguales a 400 $\mu\text{g/mL}$ de los mismos para inducir una respuesta adversa en el presente modelo *in vitro*, lo cual sugiere que el margen de seguridad de estos péptidos es amplio en estas condiciones. Comparando la citotoxicidad del péptido 3 contra el LPS, se requiere el doble de la concentración de éste último para que se afecte la viabilidad celular a niveles equiparables, por lo que se puede decir que dicho péptido es menos nocivo que el LPS.

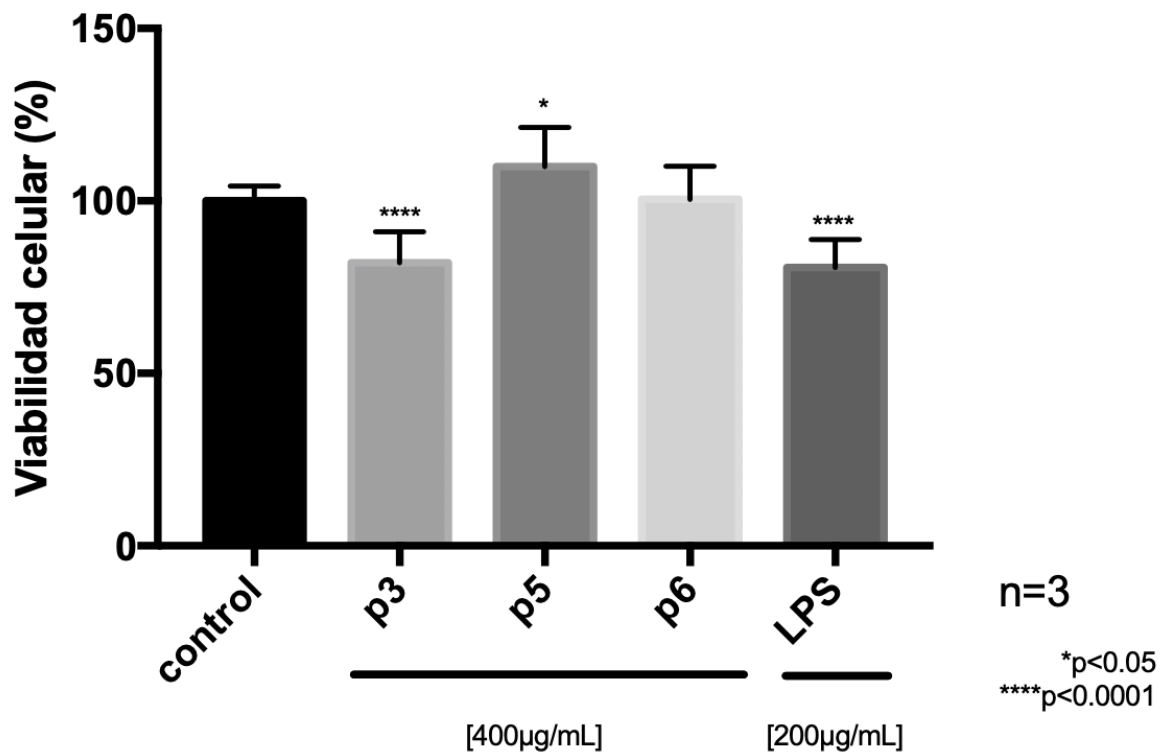


Figura 5. Determinación de la citotoxicidad de los péptidos de la Hsp60 y del LPS mediante bioensayos con azul alamar. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$; media \pm error estándar de la media, $n=3$.

Cabe resaltar que los resultados obtenidos mediante estos bioensayos representan una forma indirecta de evaluar viabilidad celular. De manera más precisa, estos hallazgos indican cambios en la tasa de actividad metabólica de las células, siendo así que el LPS y el péptido 3 la disminuyen, el péptido 5 la aumenta y el péptido 6 no tiene influencia sobre ella.

Es sabido que los cambios en la tasa metabólica son indicadores del estado proliferativo en células, donde aquellas que se encuentran en etapas replicativas dependen de una mayor actividad metabólica para aportar energía que favorezca los eventos biosintéticos asociados de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Por otra parte, aquellas células que atraviesan eventos de muerte, como apoptosis, necrosis y autofagia, se caracterizan por una menor disponibilidad de monedas energéticas, que compromete la homeostasia celular al obstaculizar reacciones fisiológicas esenciales para mantener con vida a las células.

Debido a lo anterior, los resultados obtenidos requieren ser corroborados mediante otra técnica que permita describir con mayor sensibilidad y especificidad el carácter citotóxico de los tratamientos experimentales, así como identificar de manera más puntual los mecanismos particulares a los cuales se asocia tal toxicidad.

10.5.Determinación de apoptosis y necrosis en cardiomioblastos tras el tratamiento con péptidos de la Hsp60 y LPS usando citometría de flujo

Para corroborar los resultados obtenidos en los bioensayos con azul alamar, en donde se determinó el efecto citotóxico del péptido 3 y del LPS a sus respectivas concentraciones, se optó por realizar experimentos de viabilidad celular por citometría de flujo usando tinciones que son capaces de identificar poblaciones que están en apoptosis y necrosis, como es el caso de la Anexina V y del yoduro de propidio, respectivamente. De esta manera, esta técnica nos aporta información adicional del efecto biológico de nuestros péptidos en cuestión, señalando de manera específica cuáles son los mecanismos de muerte asociados a la citotoxicidad de los tratamientos experimentales.

El planteamiento experimental para estos ensayos tuvo como base las condiciones en las cuales se realizaron los bioensayos con azul alamar. En este sentido, la densidad de células, así como el volumen de medio de cultivo y los volúmenes necesarios para mantener las concentraciones finales de nuestros tratamientos experimentales fueron definidos manteniendo una relación proporcional entre los requeridos para las dimensiones de una placa de 96 pozos y una placa de 6 pozos, en las cuales se realizaron los experimentos de citometría de flujo, como se describió en otras secciones de este documento.

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron en cuatro experimentos independientes (n=4) para todos los grupos a determinar, excepto para el péptido 5 (n=3). La definición de una matriz de compensación (Fig. 6) previa a estos experimentos, mediante la cual se pudiera corregir el desbordamiento (*spillover*) de la fluorescencia que el ioduro de propidio manifiesta en el espectro de la ficoeritrina-Cy7 (PE-Cy7, por sus siglas en inglés), tinción a la cual se encuentra conjugada la Anexina V en la presentación empleada, fue necesaria para poder separar efectivamente las poblaciones teñidas. Los detectores utilizados para registrar la fluorescencia de las células teñidas con estas moléculas fueron PE-Cy7 para Anexina V y PerCP (piridin-clorofila-proteína, por sus siglas en inglés) para el ioduro de propidio.

Mediante la doble tinción de las muestras experimentales, se pueden identificar cuatro poblaciones celulares diferentes: 1) Anexina V⁻/IP⁻, que representan células vivas; 2) Anexina V⁺/IP⁻, que incluye a las células en apoptosis temprana en las cuales la Anexina V se une a la fosfatidilserina expuesta en la cara exoplásmica de la membrana celular; 3) Anexina V⁺/IP⁺, que señala a la población en apoptosis tardía, caracterizada por presentar una membrana celular permeable al IP que permite que éste difunda y se una al ADN nuclear, además de tener alcance a la fosfatidilserina que de manera normal se encuentra en la cara citosólica de la membrana plasmática, y por último; 4) Anexina V⁻/IP⁺, característico de las células en necrosis. La separación de los eventos registrados de una muestra de células en cuadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4) permite visualizar con mayor facilidad estas

cuatro poblaciones, además de ser útil en la determinación del porcentaje de eventos que cada población representa del total.

Con base en lo anterior, los resultados de las cuatro réplicas experimentales registradas se muestran en las Fig. 7 y Fig 9. Se puede observar una tendencia similar en el comportamiento de los grupos experimentales en términos de viabilidad celular entre los resultados obtenidos en los bioensayos y los de citometría de flujo, donde el péptido 3 y el LPS muestran reducciones en este parámetro. Existe concordancia entre la muerte celular que se registra para el péptido 3 en ambos experimentos. Para el caso del LPS, sin embargo, la citotoxicidad manifestada es ~10% menor a la demostrada mediante Azul Alamar. Por otra parte, el péptido 5 se asocia al incremento en la viabilidad que en los bioensayos fue estadísticamente significativo, mientras que el péptido 6 no muestra cambios.

Cuando se analizan los resultados con base en los mecanismos de muerte específicos asociados a cada tratamiento (Fig. 8), se encuentra que el porcentaje de células en apoptosis temprana parece ser mayor en todos los grupos comparados con el control sin tratamiento; que la contribución de la apoptosis tardía es menos evidente para los péptidos 5 y 6; mientras que la muerte por necrosis es más común en los controles sin tratamiento y en las muestras con LPS.

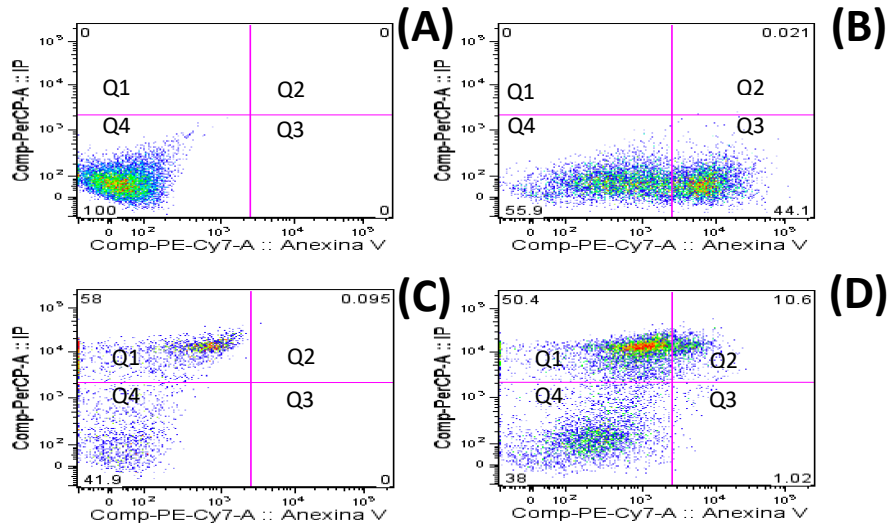


Figura 6. Compensación de las muestras teñidas para el experimento de viabilidad celular. Diagramas dot-plot donde se representa la compensación realizada para las muestras (A) sin tinción, teñidas de manera individual con Anexina V (B) o ioduro de propidio (C) y aquellas con con doble tinción (D). La distribución de los eventos en cuadrantes indica el porcentaje de células sanas (Q4), en apoptosis temprana (Q3), apoptosis tardía (Q2) y necrosis (Q1).

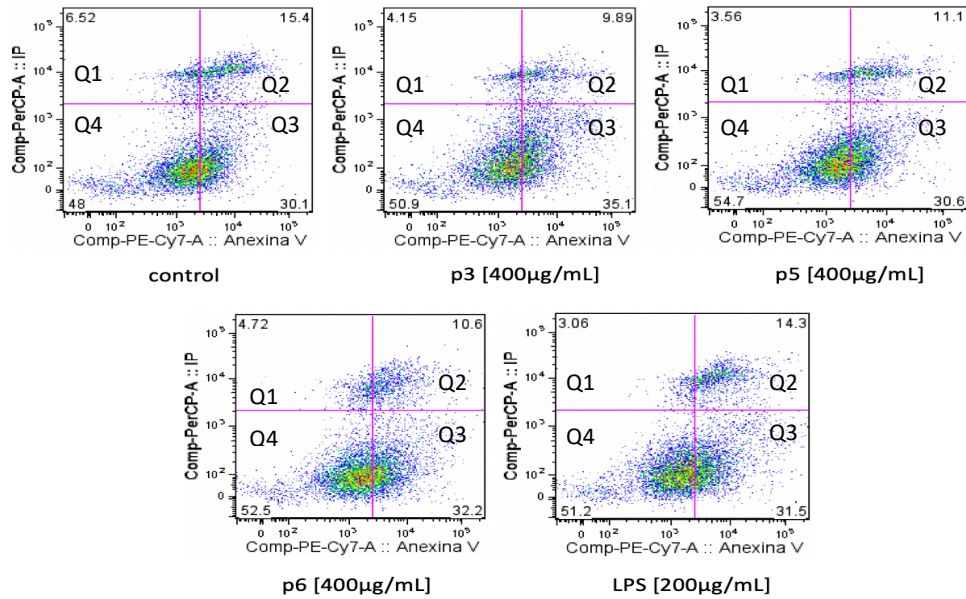


Figura 7. Determinación de apoptosis y necrosis en cardiomioblastos tras el tratamiento con péptidos de la Hsp60 y LPS usando citometría de flujo. Diagramas dot-plot representativos de los experimentos de citometría de flujo realizados usando una tinción doble con Anexina V y ioduro de propidio como marcadores de apoptosis y necrosis, respectivamente. La distribución de los eventos en cuadrantes indica el porcentaje de células sanas (Q4), en apoptosis temprana (Q3), apoptosis tardía (Q2) y necrosis (Q1); n=4; p5, n=3.

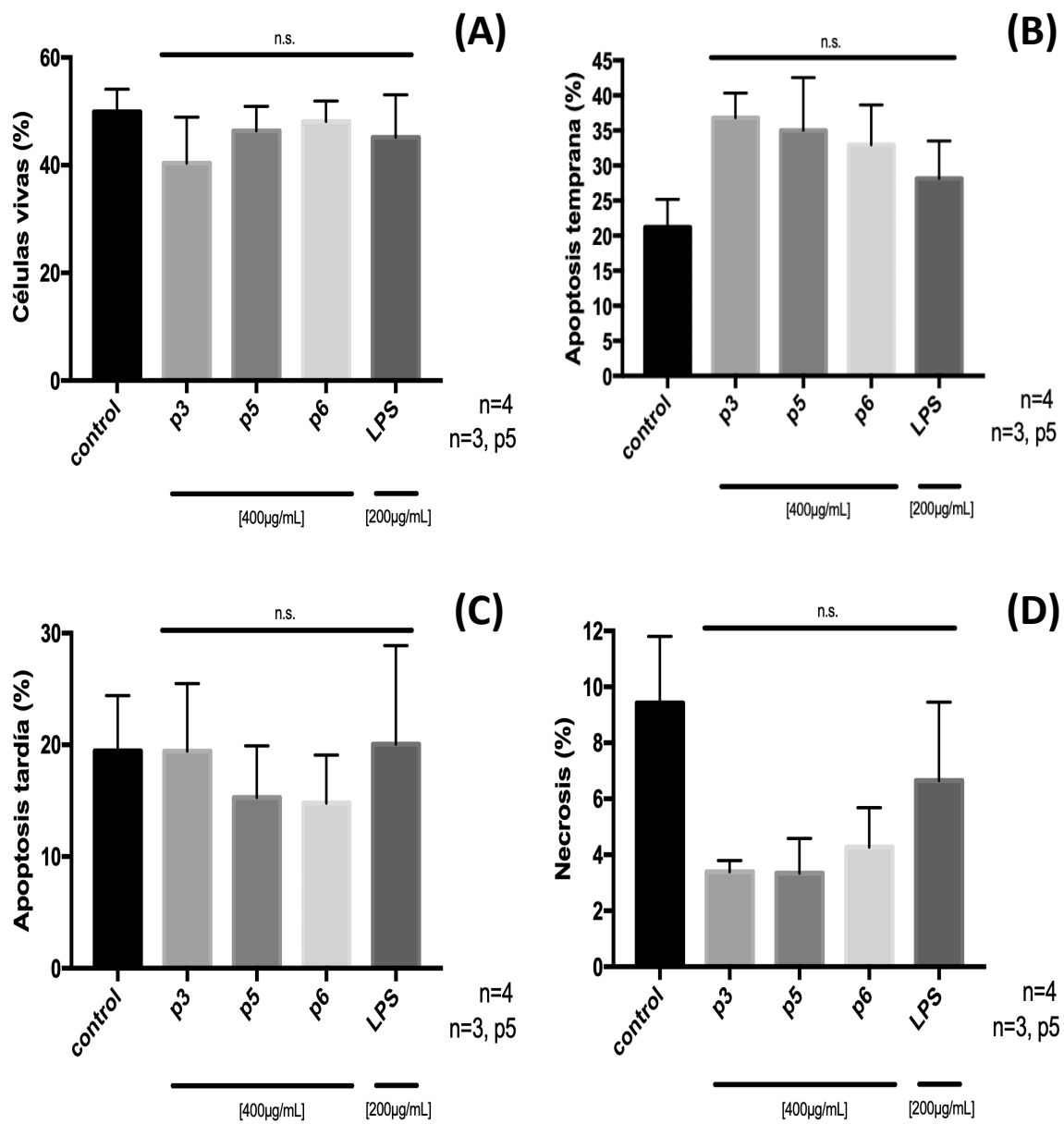


Figura 8. Mecanismos de muerte asociados al tratamiento con péptidos de la Hsp60 y LPS tras tinción con Anexina V y ioduro de propidio. **(A)** Células vivas. **(B)** Apoptosis temprana. **(C)** Apoptosis tardía. **(D)** Necrosis; n.s: sin diferencia estadística significativa. El número de experimentos para todos los grupos fue de n=4, excepto para el grupo tratado con p5 (n=3); n.s: sin diferencia estadística significativa.

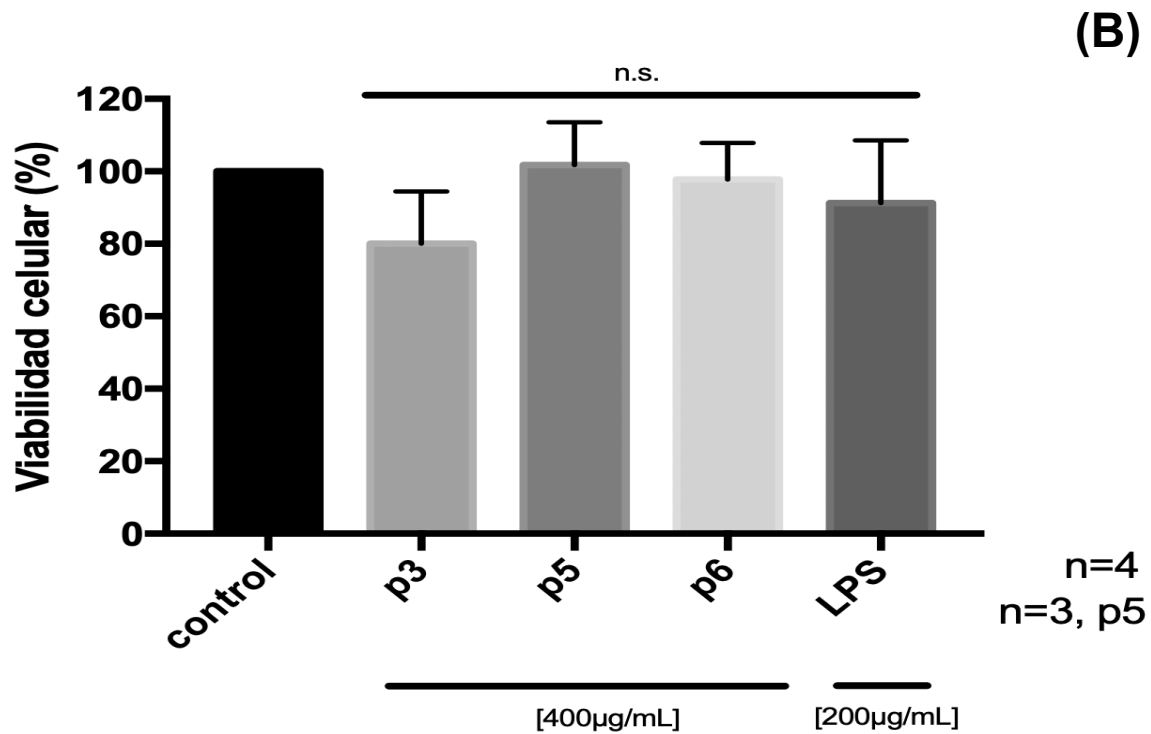
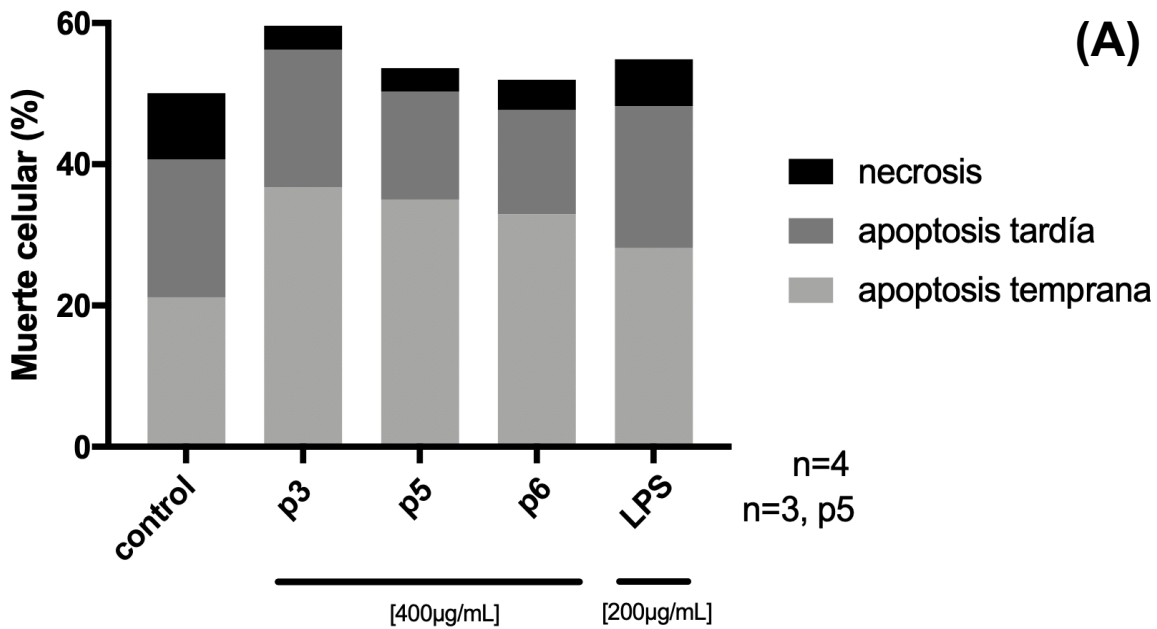


Figura 9. Viabilidad celular en cardiomioblastos tras el tratamiento con péptidos de la Hsp60 y LPS. **(A)** Condensado de la contribución de cada mecanismo específico de muerte a la observada de manera general. **(B)** Viabilidad celular tras normalización contra el grupo control. n=4; p5, n=3; n.s: sin diferencia estadística significativa.

10.6.Cambios en la expresión de proteína en cardiomioblastos tras el tratamiento con péptidos de la Hsp60 y LPS por Western blot

Para determinar si los efectos de nuestros tratamientos sobre la viabilidad celular y la inducción de mecanismos de muerte específicos que se identificaron por citometría de flujo responden en función a cambios en la expresión de TLR4 y Hsp60 como mediadores de una vía proinflamatoria, se realizaron experimentos de Western Blot de acuerdo a la metodología descrita en secciones anteriores.

Con un tamaño de muestra de tres experimentos independientes (n=3) para ambas proteínas de interés, así como para GAPDH que se empleó como control de carga, los resultados (Fig 10) apuntan hacia una tendencia que indica que la expresión de TLR4 aumenta en un ~10% y 30% para los grupos tratados con los péptidos 5 y 6 respectivamente, mientras que el péptido 3 muestra una reducción de ~10% y el LPS no muestra diferencias con respecto al control.

Para el caso de la expresión de Hsp60, el péptido 3 reporta una disminución aproximada del 7%, mientras que el péptido 5 la reduce hasta la mitad de la observada en el grupo control. En contraste, las células tratadas con el péptido 6 y LPS aumentan su expresión de la chaperonina al doble.

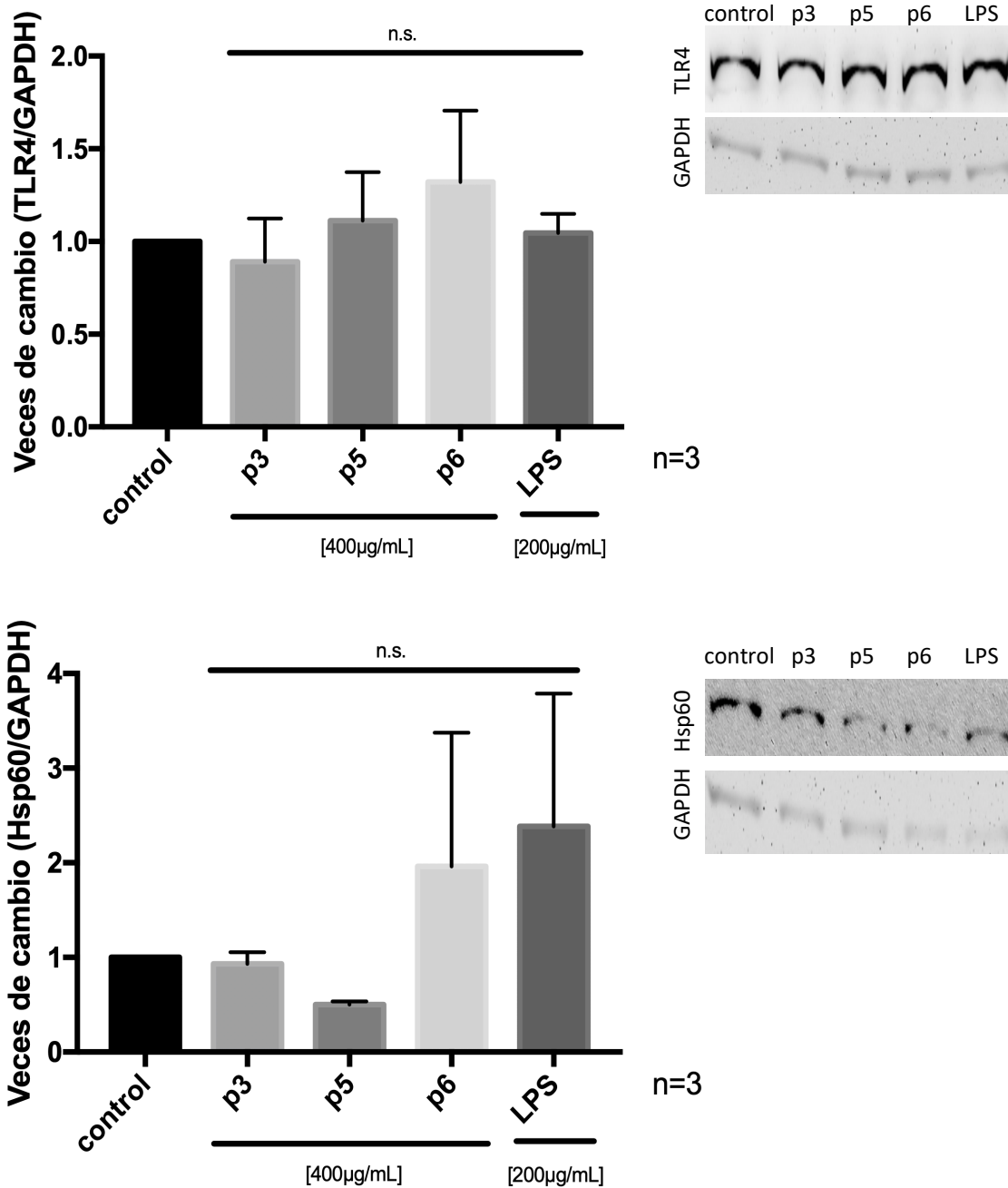


Figura 10. Determinación de los cambios en expresión de proteína en cardiomioblastos tras el tratamiento con los péptidos de la Hsp60 y LPS. (A) Veces de cambio en la expresión del TLR4 comparado contra GAPDH. (B) Veces de cambio en la expresión de la Hsp60 comparado contra GAPDH. n=3; n.s: sin diferencia estadística significativa.

11. DISCUSIÓN

El entendimiento de las diferentes funciones que la Hsp60 cumple dependiendo del contexto celular en cuestión deriva principalmente del estudio de esta proteína en células de cáncer y del sistema inmune. En el caso de las primeras, se ha observado que la chaperonina se sobreexpresa en varios tipos de cáncer como un mecanismo que confiere capacidades de adaptación y sobrevivencia a las células neoplásicas al ser menos susceptibles ante el estrés oxidante, a la respuesta de las proteínas mal plegadas (unfolded protein response, UPR, por sus siglas en inglés), que genera proteínas cuya conformación las hace disfuncionales y que se pueden acumular en la célula para generar toxicidad, como las proteínas amiloideas; además de contribuir en la evasión de ciertos mecanismos de la apoptosis intrínseca, donde Hsp60 es capaz de secuestrar e inhibir a proteínas proapoptóticas como Bax (Gupta & Knowlton, 2005).

Por otro lado, en el caso de las células del sistema inmune, se sabe que la Hsp60 sirve como un elemento inmunomodulador que coordina algunas funciones de la inmunidad innata y adaptativa mediante su actividad como DAMP o PAMP, además de que es capaz de inducir muerte celular mediante su interacción con el TLR4 en diversos tipos celulares, como se ha descrito en otras secciones.

La titulación de diferentes concentraciones de LPS (serotipo 055:B5 de *E. coli*) que se realizó en este trabajo para estandarizar las condiciones de nuestro control positivo de muerte por TLR4 está en concordancia con lo que otros autores han reportado en células H9c2, donde concentraciones cercanas a 250µg/mL inducen una muerte aproximada del 20% (Li et al, 2016). Aunado a esto, los experimentos de Western Blot aquí realizados corroboran la expresión del receptor en esta línea celular. De esta forma, se sientan las bases para asumir que la vía proinflamatoria mediada por TLR4 está patente en nuestros experimentos, dado que el LPS es reconocido primordialmente por dicho receptor y demuestra reducir la viabilidad de los cardiomioblastos tras 72 h de tratamiento. Partiendo de esta premisa bajo la cual se puede asumir que el receptor que reconoce a los péptidos

de la Hsp60, el cual varios artículos descritos en la literatura científica señalan como el responsable, se encuentra presente y activo, se exploró el efecto de los tres péptidos seleccionados (p3, p5 y p6).

Los experimentos dosis-respuesta sobre la viabilidad celular en cardiomioblastos evidenciaron el hecho que las tres secuencias peptídicas exploradas tienen una ventana de seguridad mayor que la del LPS, dado que requieren una concentración mayor para inducir efectos adversos (manifestado aquí como una reducción en la viabilidad). Los bioensayos con Azul Alamar apuntan que a concentraciones de 400 µg/mL, el péptido 3 es el único que reduce la viabilidad a niveles similares a los del LPS, aunque a una concentración dos veces mayor a la de este último. Esta tendencia fue observable también mediante citometría de flujo, donde la viabilidad de este grupo se redujo de manera consistente en un 20%, el cual se atribuyó principalmente a una inducción mayor de apoptosis temprana. Con respecto a este mecanismo de muerte, también parece tener más importancia en los demás grupos experimentales, comparados con el control. El porcentaje de células en apoptosis tardía fue menor para los grupos tratados con p5 y p6, aunque la variación entre los grupos fue menor que para el caso de la apoptosis temprana. Por último, en cuanto a la muerte por necrosis, no se observó diferencia significativa entre los grupos, y fue similar al caso de la apoptosis tardía, la variación entre los grupos fue poca. A pesar de que de manera global todos los grupos tratados tuvieron un mayor porcentaje de muerte celular, al normalizar los resultados contra los del grupo control no se reportaron diferencias estadísticamente significativas. Se deberá aumentar el número de experimentos para cada condición con el fin de disminuir el error dentro de cada grupo, y con ello confirmar las tendencias que se observan en esta ocasión.

En cuanto a los cambios en la expresión de proteína, los péptidos 5 y 6 causan un incremento en TLR4, siendo más pronunciado éste en el grupo del péptido 6, mientras que el péptido 3 la reduce. El LPS no se asoció a diferencias en la expresión de su receptor.

Con respecto a la Hsp60, se observan escenarios contrastantes, donde el péptido 5 reduce en casi la mitad su expresión, mientras que el péptido 6 y el LPS lo aumentan al doble. El péptido 3 parece no inducir cambios en este sentido.

La hipótesis de este trabajo de tesis anticipaba que el uso de péptidos de la Hsp60 prevendría o disminuiría la respuesta de muerte celular en los cardiomioblastos. El planteamiento anterior se estableció teniendo como antecedente las publicaciones que indican que diversos péptidos de la Hsp60 tienen efectos biológicos, donde algunos de ellos se asocian a respuestas proinflamatorias y muerte celular, como en las enfermedades autoinmunes y cardiovasculares, mientras que otros participan como señales para inducir proliferación celular y mecanismos de supervivencia, como en el cáncer (Tsai, Teng & Wu, 2008). De manera más puntual, en el caso de la aterosclerosis como ejemplo de enfermedad cardiovascular, Grundtman et al (2015) determinaron que tras la inmunización con péptidos específicos de la Hsp60 en modelos murinos de esta enfermedad, se observan efectos proaterogénicos con algunos y antiaterogénicos con otros. Dichos efectos fueron relacionados con la proliferación y actividad de poblaciones específicas de leucocitos, implicando que estos derivados de la chaperonina tienen efectos inmunomodulatorios por sí mismos con implicaciones funcionales en aterosclerosis. A partir de este estudio, se tomaron las secuencias de los dos péptidos que mayor actividad antiinflamatoria demostraron tener, correspondientes a los péptidos 5 y 6. Asimismo, originalmente se decidió explorar el péptido 4, reportado por los mismos autores como aquel con mayor actividad proaterogénica, sin embargo, en el camino se dejó de usar debido a problemas durante su síntesis de acuerdo a indicaciones de nuestro proveedor, por lo que se decidió explorar otros péptidos que pudieran tener efectos citotóxicos, ante lo cual se postuló al p3 cuya toxicidad se observó en este trabajo. Como acercamiento inicial, se planteó la posibilidad que los efectos descritos para cada uno de estos péptidos seleccionados se pudieran interpolar a otras enfermedades con componentes inflamatorios prominentes, como la IC, donde aquellos péptidos proaterogénicos pudieran ser proinflamatorios, a la vez que los antiaterogénicos fueran antiinflamatorios. El estudio del comportamiento de dichos péptidos, para el caso de los primeros,

contribuiría a la determinación de mecanismos implicados en la fisiopatología de la IC no antes descritos, mientras que entendimiento del papel de los segundos podría identificar secuencias que confirieran una ventaja terapéutica ante la enfermedad. En ambos casos, nuevos tratamientos para la IC podrían establecerse al encontrar blancos terapéuticos que al ser bloqueados pudieran prevenir o ralentizar la progresión de la enfermedad, así como péptidos que al administrarse pudieran modular la respuesta celular para disminuir o frenar procesos inflamatorios y con ello ofrecer un beneficio terapéutico.

Dado que no existen publicaciones reportadas en las cuales se describa el efecto citotóxico que los tres péptidos aquí seleccionados tienen sobre población celular alguna, incluyendo a aquéllas presentes en el corazón, los datos que se presentan en este documento representan la primera discusión de dichas secuencias en cardiomioblastos. La hipótesis inicial asume que los efectos potenciales de estos péptidos están asociados a la modulación de respuestas inmunes en células H9c2, y se sugiere que estos ocurren tras la interacción de los péptidos con el TLR4, el receptor más comúnmente asociado al reconocimiento de la chaperonina de donde derivan.

Los ensayos de citotoxicidad realizados en este trabajo de tesis apuntan hacia una tendencia que indica que el péptido 3 reduce la viabilidad celular en un 20%, observado en bioensayos con Azul Alamar y citometría de flujo, sin embargo, dicha citotoxicidad no se asoció con incrementos simultáneos en la expresión de TLR4 y Hsp60, evento que según lo reportado en la literatura ocurre como ciclo de retroalimentación positiva ante esta interacción ligando-receptor (Tian et al, 2013); por el contrario, se observaron reducciones en la expresión de estas dos proteínas en un 11% y 7%, respectivamente, las cuales no fueron estadísticamente significativas. Para corroborar que dicho efecto citotóxico depende de la interacción del péptido 3 y el TLR4, se deberán realizar experimentos en donde se inhiba la expresión o actividad del receptor. Ciertos fármacos, como el glucocorticoide sintético dexametasona, son capaces de disminuir la expresión de este PRR mediante la inhibición de factores de transcripción que son clave para esta encomienda, como es el caso de NF- κ B y AP-1 (Ge et al, 2012). Por otra parte,

existen inhibidores específicos de la vía de TLR4, como TAK-242 (también conocido como CLI-095), que actúan al bloquear el sitio de unión entre el receptor y su molécula adaptadora IRAK-1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1, por sus siglas en inglés) en su cara citosólica (Wei et al, 2016). La recuperación de la viabilidad celular en el grupo tratado con el péptido 3 tras cualquiera de las intervenciones antes mencionadas, indicaría la que la citotoxicidad del péptido se explica por los mecanismos de señalización asociados al TLR4.

De manera complementaria, se debe explorar la participación de otros posibles mediadores a la respuesta del péptido 3. En particular, además de ser importante para describir algunos mecanismos que podrían estar relacionados a la respuesta variable aquí observada ante el tratamiento con LPS, sería interesante evaluar la participación de las proteínas necesarias que releven la señal de la endotoxina hacia el TLR4, en asociación al efecto de los péptidos de la Hsp60. Para el caso de los cardiomiocitos adultos se ha descrito que CD14 es necesario para mediar el daño celular inducido por el LPS (Comstock et al, 1998). Se ha descrito también que MD-2, la proteína unida al TLR4 en su cara exoplásmica interactúa con moléculas hidrofóbicas y cargadas negativamente, como las colas aciladas del LPS, y dado que los péptidos de la Hsp60 aquí explorados son hidrofóbicos y que tienen puntos isoeléctricos bajos (por lo que a pH 7.4, como en PBS y medio de cultivo, tienen cargas netas negativas), su interacción con el TLR4 podría ser dependiente de su relación con MD-2. La ausencia de estas proteínas en células H9c2, o una disminución en su expresión, podrían ser factores adicionales que expliquen por qué se necesitan dosis altas para inducir una respuesta sobre la viabilidad celular, tanto para el LPS como para los péptidos de la Hsp60. En este sentido, existen también reportes que indican que debido a diferencias en los patrones de expresión de las proteínas antes mencionadas, así como variaciones en los genes que codifican para las mismas (Vaure & Liu, 2014), se distinguen diferencias en la respuesta al LPS entre especies, donde los humanos, caballos y conejos son hasta 100,000 veces más sensibles al daño por este componente bacteriano comparado con babuinos, ratones, ratas y gallinas, especies que toleran concentraciones más elevadas de endotoxina (Munford, 2010). Por lo tanto, una concentración de LPS

que sea capaz de inducir muerte celular y modificar mecanismos proinflamatorios en células humanas puede tener una respuesta alterna en células de rata, como es el caso de los cardiomioblastos que aquí se emplearon.

Se debe determinar también la posible contribución que el TLR2 pudiera tener en el reconocimiento de los péptidos aquí seleccionados, dado que también se encuentra presente en cardiomioblastos y existen reportes en la literatura que indican que interactúa con la Hsp60 y con algunos de sus péptidos en células del sistema inmune (Heiserman et al, 2015; Quintana & Cohen, 2011).

El entendimiento de los mediadores intracelulares activados por el tratamiento con los péptidos también podría ayudar a generar conclusiones sobre los posibles mecanismos de acción de cada secuencia. Se deberá determinar la expresión de las proteínas relacionadas a la vía de señalización de TLR4, como MyD88, IRAK-1, TAK-1, las MAPK asociadas ERK-1/2, p38 y JNK y los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Por otra parte, TNF α e IL-6 son dos citocinas proinflamatorias frecuentemente asociadas al efecto inductor de daño de la Hsp60 como PAMP/DAMP (Choi et al, 2015). Todas estas proteínas y citocinas están implicadas en la señalización inducida por la interacción entre la chaperonina y el TLR4 de acuerdo a la literatura, por lo que se esperaría que también fuera el caso para sus péptidos; aunque esto deberá corroborarse. En caso de no encontrar una conexión entre los mediadores antes descritos, sería posible que el efecto de las secuencias peptídicas aquí exploradas respondiera a vías de señalización diferentes, donde la citotoxicidad se pudiera explicar como una reducción en la expresión de Hsp60 que confiera menor capacidad de sobrellevar eventos de estrés intracelular.

12. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a través de este proyecto indican una tendencia del comportamiento de los péptidos de la Hsp60 que señala al péptido 3 como un agente inductor de muerte, mientras que el efecto de los péptidos 5 y 6 son menos claros. El LPS fue capaz de inducir muerte celular, demostrando la patencia de la vía de señalización del LPS en nuestras células y validándolo como control positivo de muerte.

Los efectos sobre los diferentes mecanismos de muerte observados por citometría de flujo pueden ser corroborados con ensayos de apoptosis intrínseca e inducción de caspasas efectoras, determinación de lactato deshidrogenasa como marcador de necrosis, así como mediante la lectura de citocinas en el sobrenadante de aquellas células tratadas con los péptidos y LPS.

Se deberán realizar experimentos explorando el papel del TLR4 ante la viabilidad reportada por nuestros tratamientos experimentales mediante ensayos donde se inhiba su expresión o actividad. Asimismo, se deberá averiguar el efecto de otras proteínas que colaboran en el reconocimiento del LPS durante la respuesta ante los péptidos seleccionados, así como del TLR2 y otros receptores que pudieran mediar los efectos observados.

Para tener un mejor entendimiento del efecto de los péptidos y el LPS en cardiomioblastos, se deberá aumentar el número de experimentos realizados con el fin de disminuir el error entre grupos y alcanzar la significancia estadística de los resultados.

13. REFERENCIAS

- Adamczak, D. M. (2017). The role of toll-like receptors and vitamin D in cardiovascular diseases—a review. *International Journal of Molecular Sciences*.
<https://doi.org/10.3390/ijms18112252>
- Allen, D. G., Zhang, B. T., & Whitehead, N. P. (2010). Stretch-induced membrane damage in muscle: Comparison of wild-type and mdx mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 682, 297–313. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6366-6_17
- Almanzar, G., Illinger, R., Leuenberger, J., Onestingel, E., Rantner, B., Zehm, S., ... Wick, G. (2012). Autoreactive HSP60 epitope-specific T-cells in early human atherosclerotic lesions. *Journal of Autoimmunity*, 39(4), 441–450.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.006>
- Anderson, J. L., & Morrow, D. A. (2017). Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 376(21), 2053–2064.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1606915>
- Biancardi, V. C., Bomfim, G. F., Reis, W. L., Al-Gassimi, S., & Nunes, K. P. (2017). The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.017>
- Bianchi, M. E. (2006). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
- Blank, M., Barzilai, O., & Shoenfeld, Y. (2007). Molecular mimicry and auto-immunity. In *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* (Vol. 32, pp. 111–118).

<https://doi.org/10.1007/s12016-007-0025-8>

Branco, A. F., Pereira, S. P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A. A., & Oliveira, P. J. (2015). Gene expression profiling of H9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype. *PLoS ONE*, *10*(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129303>

Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

Campanella, C., Bucchieri, F., Merendino, A. M., Fucarino, A., Burgio, G., Corona, D. F. V, ... Cappello, F. (2012). The odyssey of Hsp60 from tumor cells to other destinations includes plasma membrane-associated stages and Golgi and exosomal protein-trafficking modalities. *PLoS ONE*, *7*(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042008>

Cappello, F., Conway De Macario, E., Marasà, L., Zummo, G., & Macario, A. J. L. (2008). Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biology and Therapy*.
<https://doi.org/10.4161/cbt.7.6.6281>

Choi, B., Choi, M., Park, C., Lee, E. K., Kang, D. H., Lee, D. J., . . . Kang, S. W. (2015). Cytosolic Hsp60 orchestrates the survival and inflammatory responses of vascular smooth muscle cells in injured aortic vessels. *Cardiovascular Research*, *106*(3), 498-508. doi:10.1093/cvr/cvv130

Cristofaro, P., & Opal, S. M. (2006). Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs*, *66*(0012–6667 (Print)), 15–29.

<https://doi.org/6612> [pii]

Comstock, K. L., Krown, K. A., Page, M., Martin, D., Ho, P., Pedraza, M., . . . Sabbadini, R. A. (1998). LPS-Induced TNF- α Release from and Apoptosis in Rat Cardiomyocytes: Obligatory Role for CD14 in Mediating the LPS Response. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*,30(12), 2761-2775. doi:10.1006/jmcc.1998.0851

Dasgupta, C., & Zhang, L. (2011). Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.11.016>

Demchenko, A. P. (2013). Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9481-y>

Dillon, S. R., Mancini, M., Rosen, A., & Schlissel, M. S. (2014). Annexin V Binds to Viable B Cells and Colocalizes with a Marker of Lipid Rafts upon B Cell Receptor Activation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1322>

Frankowski, M., Theisen, J., Kummrow, A., Simon, P., Ragusch, H., Bock, N., ... Neukammer, J. (2013). Microflow cytometers with integrated hydrodynamic focusing. *Sensors (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/s130404674>

Ge, Y., Xu, Y., Sun, W., Man, Z., Zhu, L., Xia, X., . . . Wang, X. (2012). The molecular mechanisms of the effect of Dexamethasone and Cyclosporin A on TLR4 /NF- κ B signaling pathway activation in oral lichen planus. *Gene*,508(2), 157-164. doi:10.1016/j.gene.2012.07.045

Gerke, V., & Moss, S. E. (2002). Annexins: From Structure to Function. *Physiological*

- Reviews*, 82(2), 331–371. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001>
- Goegan, P., Johnson, G., & Vincent, R. (1995). Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. *Toxicology in Vitro*. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(95\)00004-R](https://doi.org/10.1016/0887-2333(95)00004-R)
- Goldman, A., Ursitti, J. A., Mozdzanowski, J., & Speicher, D. W. (2015). Electroblotting from Polyacrylamide Gels. *Current Protocols in Protein Science*, 82, 10.7.1-10.7.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1007s82>
- Goulopoulou, S., Mccarthy, C. G., & Webb, R. C. (2016). Toll-like receptors in the vascular system: Sensing the dangers within. *Pharmacol Rev*, 68(1), 142–167. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010090>
- Grundtman, C., Jakic, B., Buszko, M., Onestingel, E., Almanzar, G., Demetz, E., ... Wick, G. (2015). Mycobacterial heat shock protein 65 (mbHSP65)-induced atherosclerosis: Preventive oral tolerization and definition of atheroprotective and atherogenic mbHSP65 peptides. *Atherosclerosis*, 242(1), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.044>
- Grundtman, C., Kreutmayer, S. B., Almanzar, G., Wick, M. C., & Wick, G. (2011). Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 960–968. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.217877>
- Gupta, S., & Knowlton, A. A. (2005). HSP60, Bax, Apoptosis and the Heart. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1), 51-58. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00336.x
- Heiserman, J. P., Chen, L., Kim, B. S., Kim, S. C., Tran, A. L., Siebenborn, N., & Knowlton, A. A. (2015). TLR4 mutation and HSP60-induced cell death in adult

- mouse cardiac myocytes. *Cell Stress and Chaperones*, 20(3), 527-535.
doi:10.1007/s12192-015-0577-0
- Henderson, B., & Graham Pockley, A. (2012). Proteotoxic stress and circulating cell stress proteins in the cardiovascular diseases. *Cell Stress and Chaperones*.
<https://doi.org/10.1007/s12192-011-0318-y>
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and flow cytometry: A view from Stanford. In *Clinical Chemistry*.
- Janes, K. A. (2015). An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. *Science Signaling*, 8(371), rs2-rs2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005966>
- Jessup, M., & Brozena, S. (2003). Heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 348(20), 2007–18. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2012.10.002>
- Kaya, Z., Leib, C., & Katus, H. A. (2012). Autoantibodies in heart failure and cardiac dysfunction. *Circulation Research*.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243360>
- Kim, E. Y., Durai, M., Mia, Y., Kim, H. R., & Moudgil, K. D. (2016). Modulation of Adjuvant Arthritis by Cellular and Humoral Immunity to Hsp65. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00203>
- Kim, S.-C., Stice, J. P., Chen, L., Jung, J. S., Gupta, S., Wang, Y., ... Knowlton, A. a. (2009). Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circulation Research*, 105(12), 1186–1195.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209643>
- Köhler, G., Hering, U., Zschörnig, O., & Arnold, K. (1997). Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. *Biochemistry*.

<https://doi.org/10.1021/bi9703960>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

Lavagnini, I., & Magno, F. (2007). A statistical overview on univariate calibration, inverse regression, and detection limits: Application to gas chromatography/mass spectrometry technique. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/mas.20100>

Li, R., & Shen, Y. (2013). An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sciences*, 92(13), 747–751. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.02.014>

Lin, L., Kim, S. C., Wang, Y., Gupta, S., Davis, B., Simon, S. I., ... Knowlton, A. A. (2007). HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2238-47. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00740.2007>

Li, C., Wang, J., Wang, Q., Zhang, Y., Zhang, N., Lu, L., . . . Tu, P. (2016). Qishen granules inhibit myocardial inflammation injury through regulating arachidonic acid metabolism. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep36949

Liu, L., Wang, Y., Cao, Z. Y., Wang, M. M., Liu, X. M., Gao, T., ... Lin, L. (2015). Up-regulated TLR4 in cardiomyocytes exacerbates heart failure after long-term myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(12), 2728–2740. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12659>

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* , 193(1), 265–275. Retrieved from

<http://www.jbc.org/content/193/1/265.short>

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway.

Cytokine, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>

Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble

shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.

<https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

Mantele, W., & Deniz, E. (2017, February). UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-

Beer reloaded. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular*

Spectroscopy. England. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>

McCarthy, C. G., Goulopoulou, S., Wenceslau, C. F., Spitler, K., Matsumoto, T., &

Webb, R. C. (2014). Toll-like receptors and damage-associated molecular

patterns: novel links between inflammation and hypertension. *AJP: Heart and*

Circulatory Physiology, 306(2), H184–H196.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00328.2013>

Mehta, J. L., & Pothineni, N. V. K. (2016). Inflammation in Heart Failure: The Holy

Grail? *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07307>

Miyake, K. (2004). Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2.

Seminars in Immunology, 16(1), 11–16.

Moresco, E. M. Y., LaVine, D., & Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Current Biology*,

21(13), R488–R493. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.039>

Moris, D., Spartalis, M., Tzatzaki, E., Spartalis, E., Karachaliou, G.-S., Triantafyllis, A.

S., ... Theocharis, S. (2017). The role of reactive oxygen species in myocardial

redox signaling and regulation. *Annals of Translational Medicine*, 5(16), 324–

324. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.17>

- Munford, R. (2010). Murine Responses to Endotoxin: Another Dirty Little Secret? *The Journal of Infectious Diseases*, 201(2), 175-177. doi:10.1086/649558
- Neron, B., Menager, H., Maufrais, C., Joly, N., Maupetit, J., Letort, S., . . . Letondal, C. (2009). Mobylye: A new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics*, 25(22), 3005-3011. doi:10.1093/bioinformatics/btp493
- Ogawa, Y., Imajo, K., Yoneda, M., Kessoku, T., Tomeno, W., Shinohara, Y., ... Nakajima, A. (2013). Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *PloS One*, 8(6), e65211–e65211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065211>
- Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., & Shimizu, T. (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), 7421–7426. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201193109>
- Okamoto, T., Ishida, R., Yamamoto, H., Tanabe-Ishida, M., Haga, A., Takahashi, H., ... Itoh, H. (2015). Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 586, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.09.022>
- Page, B., Page, M., & Noel, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *International Journal of Oncology*.
- Peach, M., Marsh, N., Miskiewicz, E. I., & MacPhee, D. J. (2015). Solubilization of proteins: The importance of lysis buffer choice. In *Western Blotting: Methods and Protocols*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_8

- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012). Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>
- Pogson, M., Parola, C., Kelton, W. J., Heuberger, P., & Reddy, S. T. (2016). Immunogenomic engineering of a plug-and-(dis)play hybridoma platform. *Nature Communications*, 7, 12535. <https://doi.org/10.1038/ncomms12535>
- Quintana, F. J., & Cohen, I. R. (2011). The HSP60 immune system network. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.11.001>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (50), 2597. <https://doi.org/10.3791/2597>
- Roberts, B. J., Moussawi, M., & Huber, S. A. (2013). Sex differences in TLR2 and TLR4 expression and their effect on coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis. *Experimental and Molecular Pathology*, 94(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.06.005>
- Rocha, D. M., Caldas, A. P., Oliveira, L. L., Bressan, J., & Hermsdorff, H. H. (2016). Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015>
- Sapan, C. V., Lundblad, R. L., & Price, N. C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29 (Pt 2), 99–108.

- Satoh, T., & Akira, S. (2016). Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Microbiology Spectrum*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016>
- Schoen, F. J., & Mitchell, R. (2015). Chapter 12: The Heart. In Robbins and Cotran pathologic basis of disease (9th ed., pp. 523-578). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Svasti, J., & Panijpan, B. (2009). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A simple explanation of why it works. *Journal of Chemical Education*. <https://doi.org/10.1021/ed054p560>
- Tait, J. F., & Gibson, D. (1992). Phospholipid binding of annexin V: Effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90111-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90111-9)
- Tian, J., Guo, X., Liu, X., Liu, L., Weng, Q., Dong, S., . . . Lin, L. (2013). Extracellular HSP60 induces inflammation through activating and up-regulating TLRs in cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 98(3), 391-401. doi:10.1093/cvr/cvt047
- Tovey, E. R., & Baldo, B. A. (1989). Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 19(2), 169–183. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-022X\(89\)90024-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-022X(89)90024-9)
- Tsai, Y., Teng, S., & Wu, K. (2008). Direct regulation of HSP60 expression by c-MYC induces transformation. *FEBS Letters*, 582(29), 4083-4088. doi:10.1016/j.febslet.2008.11.004
- Tsukamoto, H., Ukai, I., Yamagata, Y., Takeuchi, S., Kubota, K., Kozakai, S., ... Tomioka, Y. (2015). Leucine-rich repeat 2 of human Toll-like receptor 4 contains

the binding site for inhibitory monoclonal antibodies. *FEBS Letters*, 589(24PartB), 3893–3898. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.018>

Valgimigli, M., Curello, S., Ceconi, C., Agnoletti, L., Comini, L., Bachetti, T., ... Ferrari, R. (2001). Neurohormones, cytokines and programmed cell death in heart failure: a new paradigm for the remodeling heart. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 15(6), 529–537.

Van Puijvelde, G. H. M., Van Es, T., Van Wanrooij, E. J. A., Habets, K. L. L., De Vos, P., Van Der Zee, R., ... Kuiper, J. (2007). Induction of oral tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates t cell regulation and reduces atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(12), 2677–2683. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151274>

Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00316

Watkins, S. J., Borthwick, G. M., & Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 47(2), 125–131. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9368-1>

Wei, Z., Sun, X., Xu, Q., Zhang, Y., Tian, F., Sun, H., ... Dai, J. (2016). TAK-242 suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in human coronary artery endothelial cells. *Pharmazie*, 71(10), 583–587. <https://doi.org/10.1691/ph.2016.6512>

Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), 2592–2603. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x>

