



Universidad  
Rey Juan Carlos

**GRADO EN BIOLOGÍA**  
**Curso Académico 2022/23**  
**Trabajo de Fin de Grado**

**VALORACIÓN DE LOS EFECTOS CARDÍACOS DE UN  
NUEVO MODELO DE TORMENTA DE  
CITOQUINAS Y SEPSIS**

**Autor: Judit Blázquez Cervera**

**Tutor URJC: José Antonio Uranga Ocio**

<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	4
Ética .....	4
Animales y tratamiento .....	4
Obtención y procesamiento de las muestras .....	5
Tinción de hematoxilina-eosina (H-E) .....	5
Tinción picrofucsina de Van Gieson .....	6
Tinción de azul de toluidina .....	6
Inmunohistoquímica .....	6
Análisis y cuantificación de muestras.....	8
Análisis estadístico .....	8
<b>RESULTADOS</b> .....	8
Daño general .....	8
Fibrosis .....	12
Función cardíaca.....	13
Tamaño celular .....	14
Células cebadas .....	16
Macrófagos.....	17
Neutrófilos.....	19
<b>DISCUSIÓN</b> .....	20
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	23
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	24
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24

## **RESUMEN**

La reciente pandemia de COVID-19 ha causado un gran número de fallecimientos, muchos de ellos debidos al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica producido por una respuesta desregulada del sistema inmune. Durante la pandemia se ha visto cómo la mortalidad del SARS-CoV-2 está estratificada por edades, siendo mayor en personas de más edad. Por estos motivos es de interés la creación de un modelo animal que simule los síntomas de la enfermedad. Este modelo se llevó a cabo mediante la administración de LPS, ATP e imiquimod, sustancias que por separado se ha demostrado que inducen una respuesta inflamatoria exagerada. A partir de diversas pruebas inmunohistoquímicas (MPO, WGA, CD163, conexina 43, iNOS y ATF3) y tinciones histológicas (H-E, azul de toluidina y tinción de Van Gieson) se establecieron los objetivos de valorar los efectos del modelo en corazón de ratas de dos grupos de edad (jóvenes y adultos) en dos cohortes (agudo y secuelas). Los resultados en jóvenes mostraron un aumento de macrófagos que podría indicar que se ha producido inflamación tras la administración del fármaco y un aumento de células cebadas debido probablemente al bajo número encontrado. En el caso de los adultos, no se ha encontrado ninguna complicación cardíaca significativa, lo que podría indicar que los efectos en el corazón adulto se manifiestan más tarde, lo que habría producido la muerte del grupo de adultos secuelas sin que pudiésemos realizar los experimentos

## **INTRODUCCIÓN**

La COVID-19, producida por el SARS-CoV-2, comenzó en Wuhan en 2019 y desde allí se expandió por todo el mundo provocando un colapso sanitario. Según Statista, el 6 de abril de 2023 ya se contaban 6,8 millones de muertes por este virus en el mundo 120.426 de los cuales pertenecen a España, junto con 13,8 millones de infectados y una mortalidad de 115,32 por cada 100.000 habitantes en el período con mayor número de muertes (Medeiros et al, 2021).

Esta enfermedad se caracteriza por provocar en muchos casos el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) o síndrome de liberación de citocinas. Este consiste en una respuesta inflamatoria severa o desregulada producida por dos desencadenantes, las lesiones y las infecciones (Lush & Kvietys, 2010). En el primer caso la inflamación es desencadenada por la liberación de moléculas denominadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Gotts & Matthay, 2016), y en el segundo, el caso del coronavirus, por la liberación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Lush & Kvietys, 2010). La unión de estos a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) situados en las células permiten el reconocimiento por parte de los macrófagos. Un tipo especial de PAMP es el lipopolisacárido (LPS), un glicolípido de la pared de las bacterias gram negativas que es reconocido por los receptores de tipo Toll (TLR) (López-Bojorquez, 2004). La unión de los PAMPs a los PRR activa estos últimos desinhibiendo al factor de transcripción NF- $\kappa$ B que se introduce en el núcleo e induce la

transcripción de citocinas proinflamatorias (López-Bojorquez, 2004 y Muñoz-Carrillo et al. 2021). Estas citocinas inducen la inflamación mediante la vasodilatación, el aumento del número y la vida de macrófagos, monocitos y neutrófilos (Gotts & Matthay, 2016) y la activación de células cebadas. Estas aumentan la permeabilidad vascular y, junto con macrófagos y neutrófilos, refuerzan la respuesta inmune produciendo más citocinas.

Destacan las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . La primera inicia la transcripción y la traducción de la forma inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS). Esta enzima cataliza la formación de óxido nítrico (NO) (Moreno-Eutimio), un vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria que puede provocar hipotensión y tiene efectos citotóxicos para algunos patógenos (Pérez et al, 1997). La acción conjunta de las dos citocinas activa los neutrófilos que en la respuesta severa provocan daños en los tejidos por citotoxicidad al liberar más mediadores proinflamatorios y secretar mieloperoxidasa (MPO) (Moreno-Eutimio, 2016).

Mientras se produce lo anterior, las células dendríticas fagocitan patógenos, viajan a los nódulos linfáticos y presentan los antígenos a las células de inmunidad adquirida, los linfocitos B y T, que se activan. Los primeros producen y liberan a la sangre anticuerpos que neutralizan toxinas y facilitan el trabajo a las células fagocíticas. Los segundos eliminan células infectadas y producen más citocinas proinflamatorias que refuerzan la acción de los macrófagos y los monocitos y estimulan la proliferación de linfocitos B; también sintetizan citocinas antiinflamatorias para regular el proceso inflamatorio, de esta manera vemos que la respuesta inflamatoria es dual, estando la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10 y la apoptosis de células inmunes. Cuando no se da esta regulación, se produce el SIRS, como ocurre con el coronavirus, en este caso aparecen síntomas compartidos con la sepsis (Moreno-Eutimio; García, López & Sánchez, 2000; Villarreal, 2009 y Gotts & Matthay, 2016).

La sepsis es una enfermedad muy común desencadenada por una infección, definida por el tercer documento internacional de consenso para la definición de sepsis y *shock* séptico de 2016 como una “disfunción de los órganos que pone en peligro la vida causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección” (Singer et al, 2016). Entre 2006 y 2016 hubo una media de 437 casos por cada 100.000 personas y año, con una mortalidad en los países desarrollados del 17% (Jaramillo-Bustamante et al, 2020), y en los últimos años ha aumentado la incidencia de los casos más graves debido entre otras cosas al envejecimiento de la población (Bhatia et al, 2009 y Alcaíno Von Hausen, 2016).

Los efectos de la sepsis, provocada por el SIRS desencadenado por el SARS-CoV-2, se han observado en diversos órganos (Shenoy, 2020). En el corazón, cuando la respuesta inflamatoria persiste, se puede llegar al *shock* séptico. Durante este, se dilatan los capilares y la sangre queda atrapada en ellos, lo que reduce la presión arterial y aumenta el volumen de sangre que lanza el corazón. Estos cambios

aumentan el gasto cardíaco (cantidad de sangre bombeada hacia la aorta por minuto) y la frecuencia cardíaca (taquicardia). Se produce también insuficiencia cardíaca (incapacidad de bombear sangre rica en oxígeno eficientemente) debido a la disfunción mitocondrial (Villarreal, 2009). La disfunción mitocondrial se debe a cambios electrofisiológicos que se producen en las células como respuesta a los PAMPs y DAMPs. Estos provocan la apertura de poros de la membrana mitocondrial desacoplando la cadena respiratoria y produciendo un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inductores de apoptosis. Todo ello puede provocar la apoptosis de las células miocárdicas (Navarrete et al, 2013 y Liu et al, 2019). Todos estos efectos pueden desembocar en la muerte (Alfaro-Murillo & Lazo-Paéz, 2021). A nivel histológico podemos encontrar como efectos de la sepsis áreas con necrosis de miocitos, hipertrofia de los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo e infiltrado de linfocitos (Gancedo & Alcalde, 2021).

Por todo lo anterior es de gran interés el estudio de los daños provocados por la sepsis causada por COVID-19 en los diferentes tejidos y órganos, y sus posibles tratamientos. Para ello es necesario el desarrollo de modelos animales.

En los modelos existentes encontramos diferentes inconvenientes. En el caso de la COVID-19, es el uso del virus SARS-CoV-2 como agente infeccioso por su potencial letalidad. La solución es crear un modelo no infeccioso a partir del conocimiento preexistente sobre los mecanismos que impulsan la enfermedad (Cleary et al, 2020), en nuestro caso, crear un modelo de sepsis de COVID-19 a partir del conocimiento sobre el desarrollo de la sepsis. En el caso de la sepsis, en el modelo más utilizado, el de la administración de LPS, el principal inconveniente es que se genera endotoxemia, una respuesta inflamatoria exagerada por la presencia de LPS en la sangre (*Endotoxemia*, 2006) pero diferente a la sepsis (Wichterman et al, 1980), por lo que no reproduce completamente los síntomas de esta enfermedad en humanos (Bhatia et al, 2009). Aun así, estudios en pacientes humanos voluntarios han revelado que la administración de LPS produce efectos similares a la sepsis (Fink & Heard, 1990).

El efecto del LPS podría verse intensificado por la administración de ATP extracelular e imiquimod. El primero es el DAMP más potente. Induce la acumulación de neutrófilos y eosinófilos (Arzola et al, 2020), funciona como un quimiotáctico para las células inmunes (Di Virgilio & Vuerich, 2015) y desencadena la síntesis y liberación de IL-1 $\beta$  que, como ya sabemos, es un mediador proinflamatorio. (Riteau et al, 2010); el segundo es un ligando de receptores TLR7 que al unirse a ellos estimula la producción de citocinas proinflamatorias como interferones y TNF- $\alpha$  (Schön & Schön, 2007) que provocan una respuesta inmunitaria local contra virus que destruye el ARN viral, detiene la replicación de células infectadas y activa macrófagos entre otras cosas (Arzola et al, 2020).

A la vista de lo anterior planteamos como **hipótesis** que la acción sinérgica de estos tres compuestos podría intensificar el proceso de inflamación dando lugar al SIRS similar al producido por la COVID19.

Los objetivos del presente estudio son:

1. Identificar las complicaciones cardíacas agudas y sus secuelas en animales jóvenes mediante un modelo de tormenta de citocinas en rata.
2. Identificar las complicaciones cardíacas agudas en animales adultos mediante un modelo de tormenta de citocinas en rata.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### Ética

Todos los experimentos se llevaron a cabo con la previa aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Universidad Rey Juan Carlos (número de registro interno del CEI-URJC: ENM242/212109202220422, PROEX: 123.2/22).

### Animales y tratamiento

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho (subesp. *Rattus norvegicus* doméstica) jóvenes (de 3 meses), con un peso de entre 400 y 550g; y adultas (de 8 a 10 meses), con pesos comprendidos entre los 400 y 600g, procedentes de Janvier Labs. Todas fueron estabuladas en grupos de 2 a 4 ratas, separadas en función del tratamiento experimental en cubetas transparentes estándar, con libre acceso a comida y bebida, bajo condiciones controladas de temperatura (20°C), humedad (60%) y ciclos de 12h luz/ 12h oscuridad (luces encendidas de 7:00 a 19:00h).

Para llevar a cabo el modelo de inflamación animal se dividió a las ratas en dos grupos según la edad:

- Fase 1 (jóvenes): compuesta por ratas macho de 3 meses de edad. Se dividió en dos subgrupos:
  - o Control o salino: a los que se inyectó el vehículo de LPS más vehículo de imiquimod más vehículo de ATP, en todos los casos el vehículo es PBS.
  - o Tratamiento: a los que se inyectó LPS (3 mg/kg) más imiquimod (0.1 mg/kg) más ATP (5 mg/kg).
- Fase 1,5 (adultos): compuesta por ratas de entre 8 y 10 meses de edad. Se dividió en dos subgrupos:
  - o Control o salino: a los que se inyectó el vehículo de LPS más vehículo de imiquimod más vehículo de ATP, todos ellos PBS.
  - o Tratamiento: a los que se inyectó LPS (1.5 mg/kg) más IMIQUIMOD (0.1 mg/kg) más ATP (5 mg/kg).

En la fase de adultos la concentración fue menor ya que con 3mg/kg la mortalidad era excesiva. Estas concentraciones se demostraron adecuadas en estudios previos. Todos los fármacos y vehículos se administraron por vía intraperitoneal.

Se realizaron dos cohortes, ambas con una n=10 para cada una de las fases:

- Estudio agudo: con sacrificios 24 h tras la administración del tratamiento o el salino.
- Estudio de secuelas: con sacrificios entre 3 o 4 semanas después de la administración del tratamiento o el salino.

El grupo de jóvenes constó de ambas cohortes, mientras que el grupo de adultos solo se evaluó en la cohorte de agudo ya que en secuelas hubo que cambiar la marca del fármaco porque la empresa tuvo problemas de logística y no podía enviar a tiempo el fármaco necesario. La nueva marca produjo una mortalidad excesiva, lo que provocó que no se pudieran realizar los sacrificios ni las pruebas histológicas.

A ambas cohortes se las anestesió con pentobarbital (50mg/kg) (Usp, ref: 1041926) y se las sacrificó mediante guillotinado.

#### Obtención y procesamiento de las muestras

Tras el sacrificio, se extrajeron los corazones, se fijaron en una solución de formaldehído al 4% en agua destilada, tras lo cual se deshidrataron en una batería de etanol (Panreac, ref: 141086.1211) de gradación creciente (70º, 96º y 100º), luego se pasaron a xilol (Panreac, ref: 131769.1611) y se procesaron en el procesador de tejidos Citadel 3000 para embeberlos en parafina y hacer bloques. Estos bloques se cortaron en un microtomo (Microm HM310) en secciones de 5µm de grosor. Estas muestras se fijaron en portaobjetos tratados con poli-L Lisina (Merck, ref: A-005-C), sustancia que favorece la adhesión de las muestras y se almacenaron en una estufa a 37º hasta su uso. El estudio de estas muestras se llevó a cabo mediante el análisis histopatológico de muestras de corazón con diferentes técnicas de las que hablaremos más abajo.

#### Tinción de hematoxilina-eosina (H-E)

Se utilizó para valorar la apariencia general. Primero se desparafinaron e hidrataron las muestras en xilol y una batería de alcoholes en gradación decreciente (100º y 96º), terminando en agua. Tras lo cual se sumergieron las muestras en Hematoxilina de Carazzi (Panreac, ref: 251344.1606) durante 12 minutos, y se dejó virar el color en un baño de agua durante 15 minutos más. El contraste se realizó con eosina acuosa al 1% (Panreac, ref: 251301.1609) durante 20 segundos, tras lo cual se deshidrataron las muestras en la batería de etanol de gradación creciente (96º, 100º) acabando en xilol. Para terminar, se montaron las muestras con EUKITT (Orsatec, ref:6.00.01.0001.05.01.01).

Se analizó mediante un análisis cualitativo buscando infiltrado de linfocitos y zonas de tejido reemplazadas por colágeno (fibrosis).

#### Tinción picrofucsina de Van Gieson

Se utilizó para valorar fibrosis. Para ello se desparafinaron e hidrataron las muestras, y se sumergieron en hematoxilina férrica Weigert (hecha al 50% a partir de una solución de Hematoxilina 1g/100ml alcohol y de Cloruro férrico 29% (4ml) más ácido clorhídrico (1ml) más agua destilada (95ml), (Merck, ref: 1159730002) durante 10 minutos, y en picrofucsina de Van Gieson (Merck, ref: 1001990500) durante 5 minutos, tras lo que se lavaron en alcohol absoluto, se pasaron por xilol y se montaron como en el caso de la H-E.

Se evaluó mediante un análisis cualitativo buscando haces rosados (colágeno).

#### Tinción de azul de toluidina

Se utilizó para valorar células cebadas. Para ello se desparafinaron e hidrataron las muestras y se sumergieron en azul de toluidina (Panreac, ref: 251176.1604) al 0,25% durante 10 segundos, tras lo que se lavaron en agua y se deshidrataron por la batería de alcohol creciente, se pasaron por xilol y se montaron.

Se evaluó con un análisis cuantitativo, valorando 10 campos bajo el objetivo de 10 aumentos. Tras esto se calculó el número medio de células por campo y grupo experimental.

#### Inmunohistoquímica

Se comenzó desparafinando e hidratando, tras lo cual se llevó a cabo un pre-tratamiento con calor en un tampón citrato (10mM) en microondas, durante 10 minutos a 98 grados para el desenmascaramiento de los antígenos. Tras ello se añadió agua oxigenada (Solución de bloqueo endógeno Bloxall ImmPRESS Vector laboratories ref: SP-6000-100) durante 10 minutos para bloquear la peroxidasa endógena, y se lavó con PBS-Tween (PBS a concentración 1x y Tween al 0,05%; PBS: Panreac, ref: A0965; Tween: Panreac, ref: A4974) tres veces dejando 5 minutos entre lavados para eliminar el sobrante que podría interferir más adelante y permeabilizar los tejidos facilitando así la unión de los anticuerpos.

A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo añadiendo una solución de bloqueo (Normal Horse Serum 2,5% ImmPRESS Vector laboratories, ref: S-2012-50) o FBS (suero bovino fetal) en los casos en que se necesitó un bloqueo más intenso, durante 20 minutos, tras los que, sin lavar, se retiró el sobrante y se añadió la concentración correspondiente ya indicada de anticuerpo primario diluido en PBS-Tween.

Se utilizaron como controles negativos muestras sin anticuerpo.

Todas las muestras se incubaron con los anticuerpos durante la noche en la nevera a 4°C.

Tras ello se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se añadió el polímero que actúa como anticuerpo secundario IgG Horse Anti-Mouse (ImmPRESS Vector laboratories ref: MP-7422-15) o Horse Anti-Rabbit (ImmPRESS Vector laboratories ref: MP-7801-15) según corresponda con el anticuerpo primario.

Este anticuerpo secundario está conjugado con peroxidasa. Al añadir agua oxigenada la peroxidasa libera oxígeno, este oxida la diaminobencidina (DAB) que cambia a color marrón, lo que hace visibles las zonas de interés. Se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, se retiró y se realizaron dos lavados con PBS dejando 5 minutos entre lavados.

Para revelar la peroxidasa se añadieron 15 microlitros de DAB (ImmPRESS Vector laboratories ref: SK-4105) junto con 15 microlitros de agua oxigenada, y se incubó durante 10 minutos en oscuridad y se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS, tras esto se lavó en agua durante otros cinco minutos.

Para la tinción de contraste, útil para poder ver los núcleos de las células y el fondo de la muestra y orientarnos en ella, se tiñó con hematoxilina durante 3 minutos, seguida del virado de color en agua durante 15 minutos, y su posterior deshidratado por la batería de alcoholes de concentración creciente, acabando en xilol y montando con el EUKITT.

En el caso de WGA el proceso es diferente, ya que este anticuerpo está unido a un fluorocromo de la longitud de onda del infrarrojo, por lo que el anticuerpo primario se deja incubar únicamente una hora a temperatura ambiente, al ser de fluorescencia no es necesario el marcaje con DAB, porque el propio anticuerpo primario incluye un marcaje directo. Tampoco es necesario el bloqueo de la peroxidasa ni el anticuerpo secundario. Además, se monta en húmedo con una gota de glicerol (Fisher Scientific, ref: 15832544). Estas muestras se conservaron en oscuridad y frío para preservar la fluorescencia.

Se utilizaron anticuerpos contra las siguientes proteínas:

- CD163 (Bio Rad, ref: MCA342GA): marcador de macrófagos antiinflamatorios M2, generado en ratón. A una concentración de 1:750. Se analizó cuantitativamente tomando diez zonas por muestra bajo el objetivo de 10 aumentos, contando el número de macrófagos por zona. Tras esto, se calculó el número medio de células por campo y grupo experimental.
- Conexina 43 (Santa Cruz, ref: sc-59949): para marcar nexos entre miocitos, cuyo estado determina el funcionamiento del corazón, generado en conejo. Usado a una concentración de 1:800. Se analizó de manera cualitativa.
- ATF3 (Bioss antibodies, ref: bs-0519R): marcador de estrés con el que se puede valorar daño y reparación celular, se utilizó para confirmar lo visto en HE. Generado en conejo. Se empleó a una concentración de 1:800. Se analizó cualitativamente.
- iNOS (Bioss antibodies, ref: bs-2072R): marcador de inflamación para valorar daño, generado en conejo. Empleado a una concentración de 1:7500. Se analizó de forma cualitativa.

- WGA (Biotium, ref: 29025): marcador de glicoproteínas de membrana para valorar tamaño celular. Usado a una concentración de 1:200. Se analizó cuantitativamente tomando al menos 10 fotos por muestra bajo el objetivo de 40 aumentos y se pasaron una a una por el programa ImageJ, donde se estableció una escala de 222 píxeles equivalentes a 50 micras, y se transformó la imagen a blanco y negro para escoger automáticamente las señales con un tamaño mínimo de 40 micras. Se eliminaron manualmente los datos que correspondían a células mal analizadas por el programa. Tras esto, se calculó la media de tamaño de las células por cada imagen y grupo experimental.
- MPO (Abcam, ref: ab65871): marcador de neutrófilos para valorar su presencia, generado en conejo. Se empleó a una concentración 1:1000. Se analizó cuantitativamente contando el número total de neutrófilos en la muestra.

#### Análisis y cuantificación de muestras

Todas las muestras que requerían análisis cuantitativo se analizaron a partir de imágenes tomadas con un microscopio Zeiss AxioPhot 2, con el programa Las X, versión 3.7.4.23463, este software sirve para el análisis y procesamiento de imágenes, a excepción de las muestras de fluorescencia, cuyas imágenes se tomaron en el microscopio de fluorescencia con la cámara Nikon Moments con el software NIS-elements de Nikon (Nikon, Japón) en la longitud de onda del infrarrojo.

Para la cuantificación de las muestras se utilizó el programa ImageJ-FIJI del *National Institutes of Health, USA*. Este programa transforma las imágenes a blanco y negro y valora características de la imagen como la intensidad de marcaje, el número de células o el tamaño de estas a partir del área mínima que establezcamos.

#### Análisis estadístico

Para todos los datos se calculó la desviación típica y el error estándar. Las diferencias entre tratamiento y control se analizaron con Prism 8.3.0 Portable, con el que se realizó un T-test paramétrico con corrección de Welch's, en el que se comparaban las medias del grupo control y el grupo tratamiento. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando presentaron una  $P < 0,05$ .

### **RESULTADOS**

#### Daño general

Tanto en el caso de los animales jóvenes como en el de los adultos en todos sus grupos, la valoración de H-E dio como resultado ciertas zonas eosinofílicas, lo que sería compatible con cierto daño en los cardiomiocitos (Figuras 1 y 2). Sin embargo, el número de estas áreas fue pequeño, constando en su mayoría de células aisladas, y sin diferencias entre los distintos grupos experimentales.

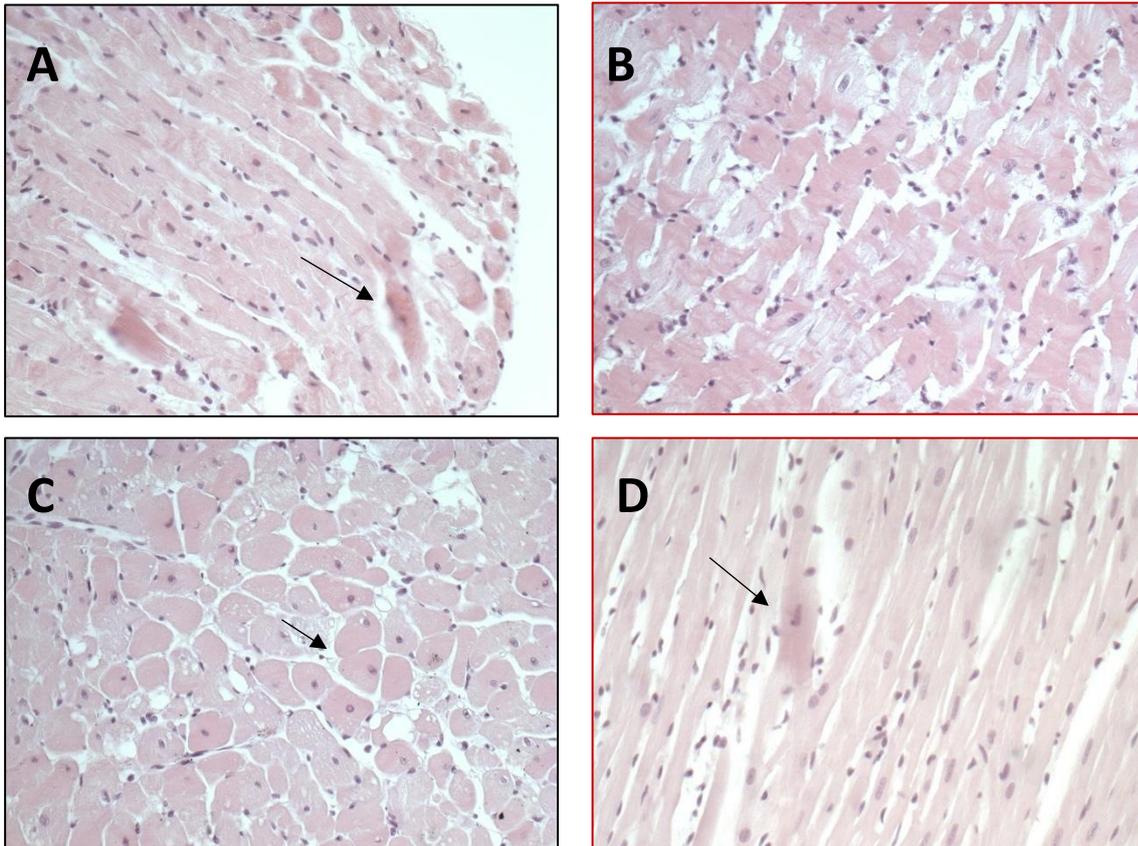


Figura 1. Corazón de ratas jóvenes marcado con H-E. Jóvenes agudo (A, B) y jóvenes secuelas (C, D). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20.

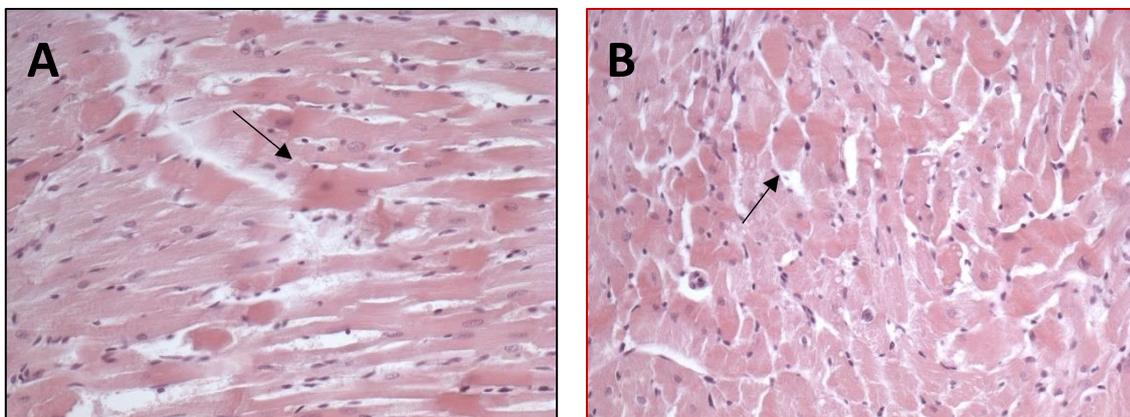


Figura 2. Corazón de ratas adultas agudo marcado con H-E. Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20. Señaladas con una flecha algunas células más eosinofílicas.

Se observaron además leves infiltraciones de linfocitos (Figuras 3 y 4), poco numerosas y similares entre los grupos experimentales.

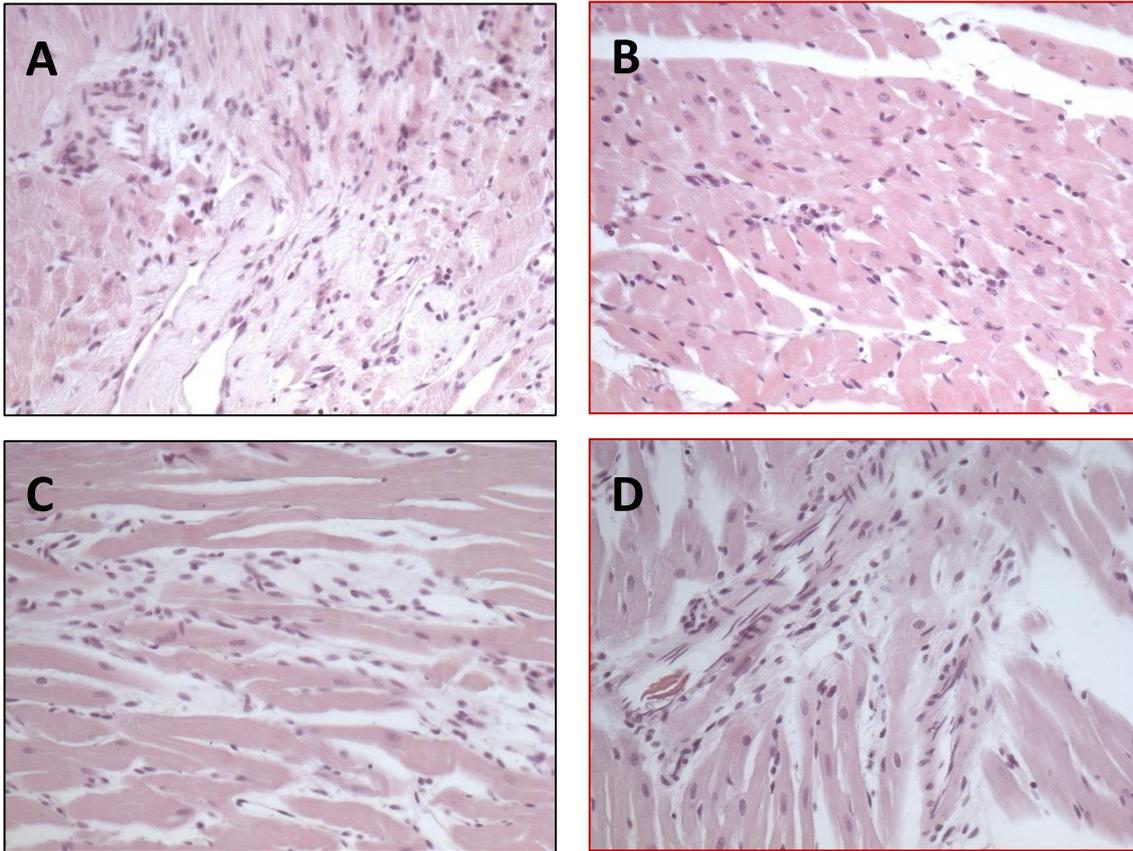


Figura 3. Corazón de ratas jóvenes marcado con H-E. Jóvenes agudo (A, B) y jóvenes secuelas (C, D). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20.

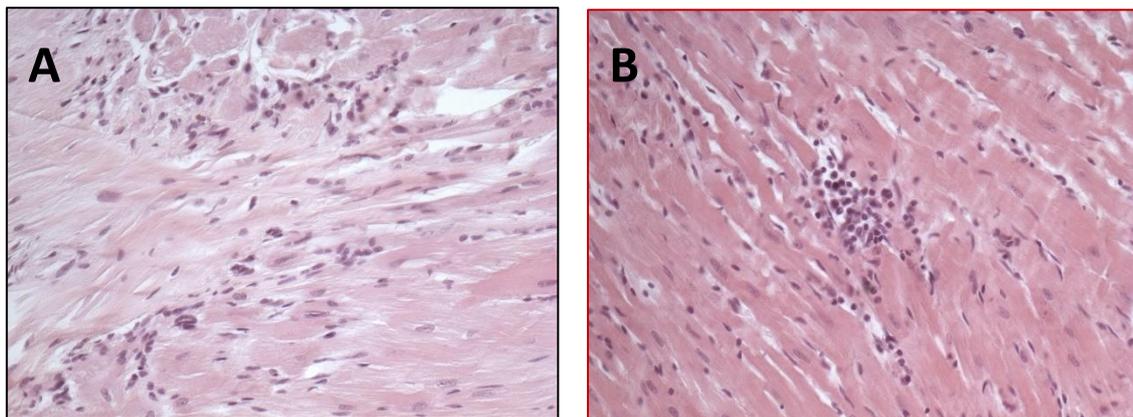


Figura 4. Corazón de ratas adultas agudo marcado con H-E. Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20.

Debido a esa cierta eosinofilia apreciada en la valoración de H-E, sin apenas infiltrado inflamatorio, se consideró oportuno realizar otro análisis con el anticuerpo ATF3 (Figura 5). Se observó poca coincidencia entre las zonas positivas para ambos marcajes, siendo en general negativo. Se decidió por ese motivo hacer este análisis solo en jóvenes y no en adultos.

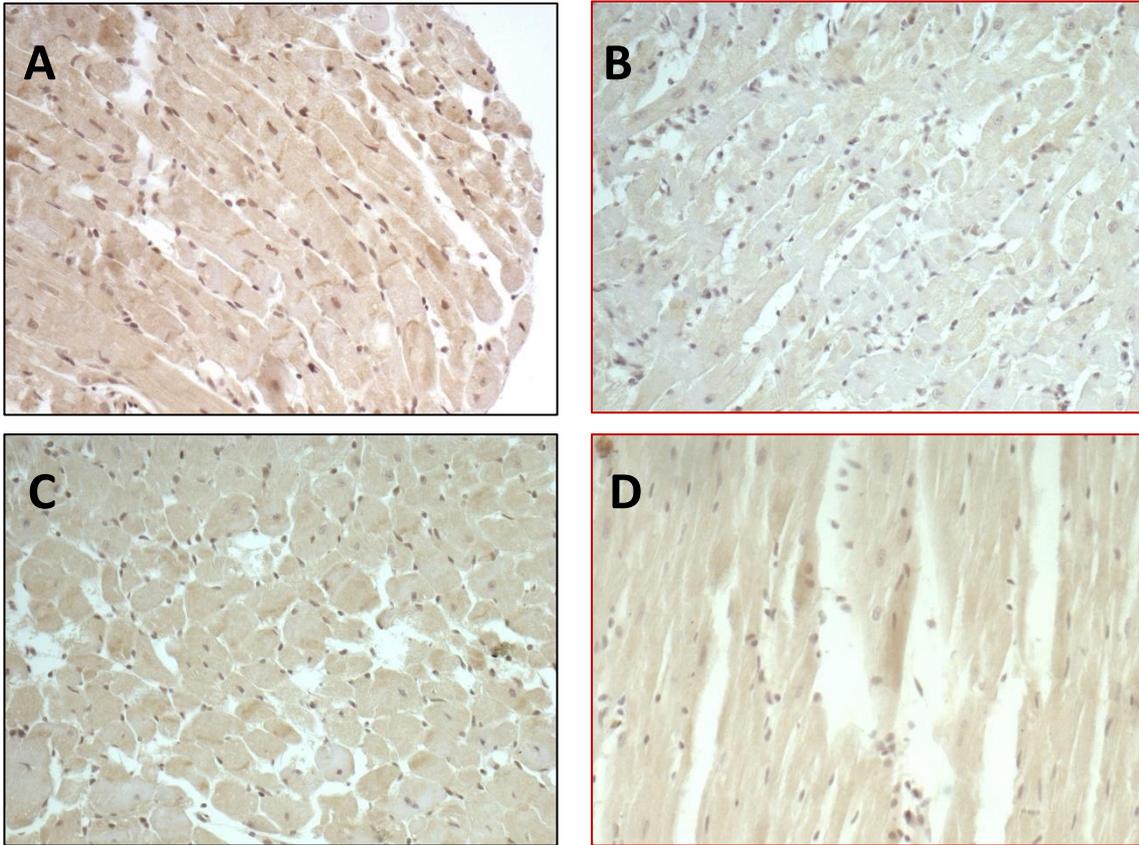


Figura 5. Corazón de ratas marcado con ATF. Jóvenes agudo (A, C) Y jóvenes secuelas (E, G). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20.

Por las mismas razones que en el caso anterior, se decidió hacer un análisis con el anticuerpo iNOS (Figura 6) y se obtuvo un marcaje negativo en todos los grupos experimentales, que se corresponden, como en el caso anterior, con la no significancia obtenida en las muestras de H-E.

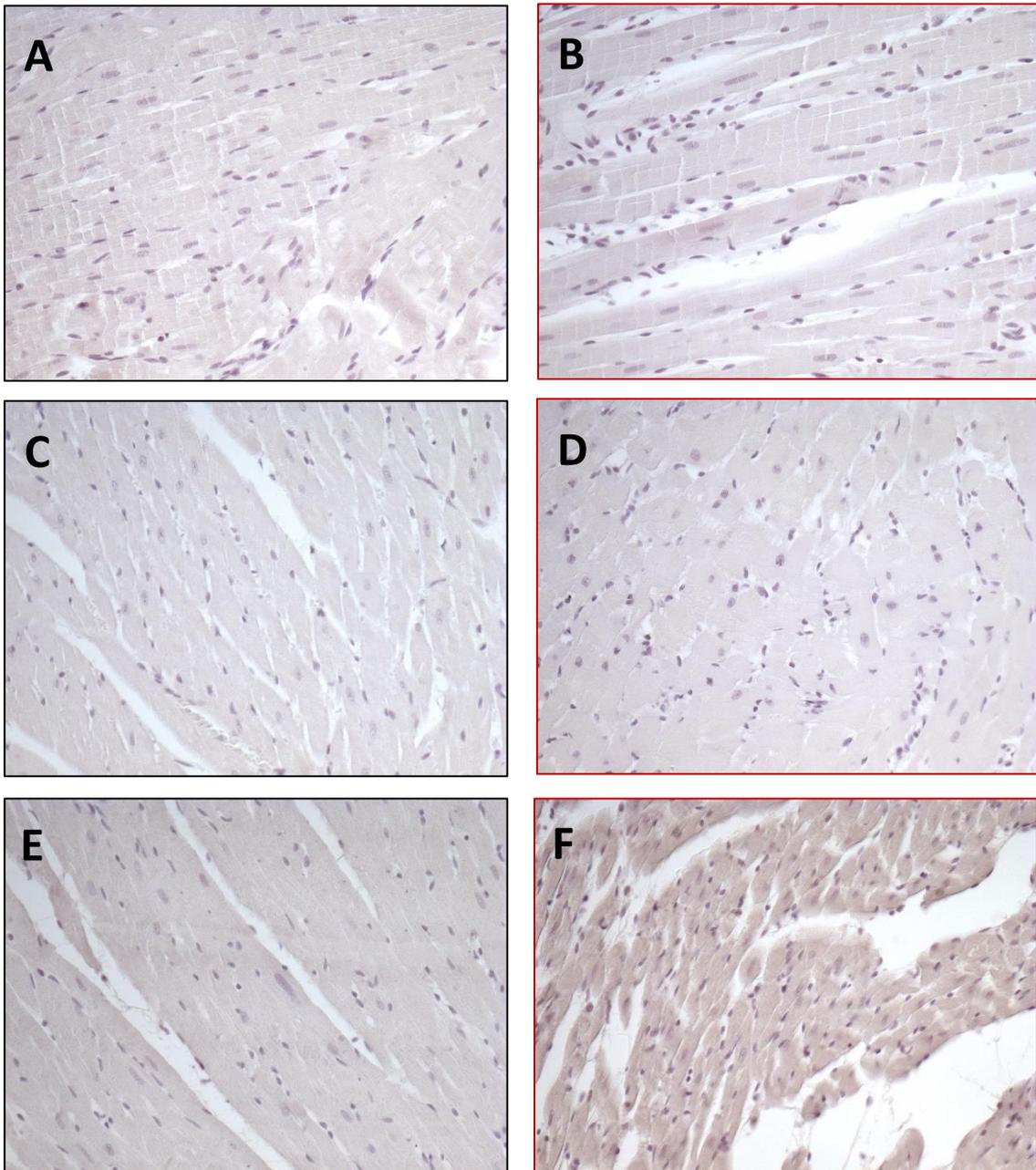


Figura 6. Corazón de ratas marcado con iNOS. Jóvenes agudo (A, B), jóvenes secuelas (C, D) y adultos agudos (E, F). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20.

### Fibrosis

Tanto en el caso de los animales jóvenes como en el de los adultos en ambas cohortes se observa una fibrosis muy leve, sin diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 7). En el caso de jóvenes las muestras están teñidas mediante la técnica de Van Gieson, pero al marcarse el colágeno de una forma tan débil, se decidió valorar la fibrosis de adultos mediante la tinción de H-E, en la que también es visible.

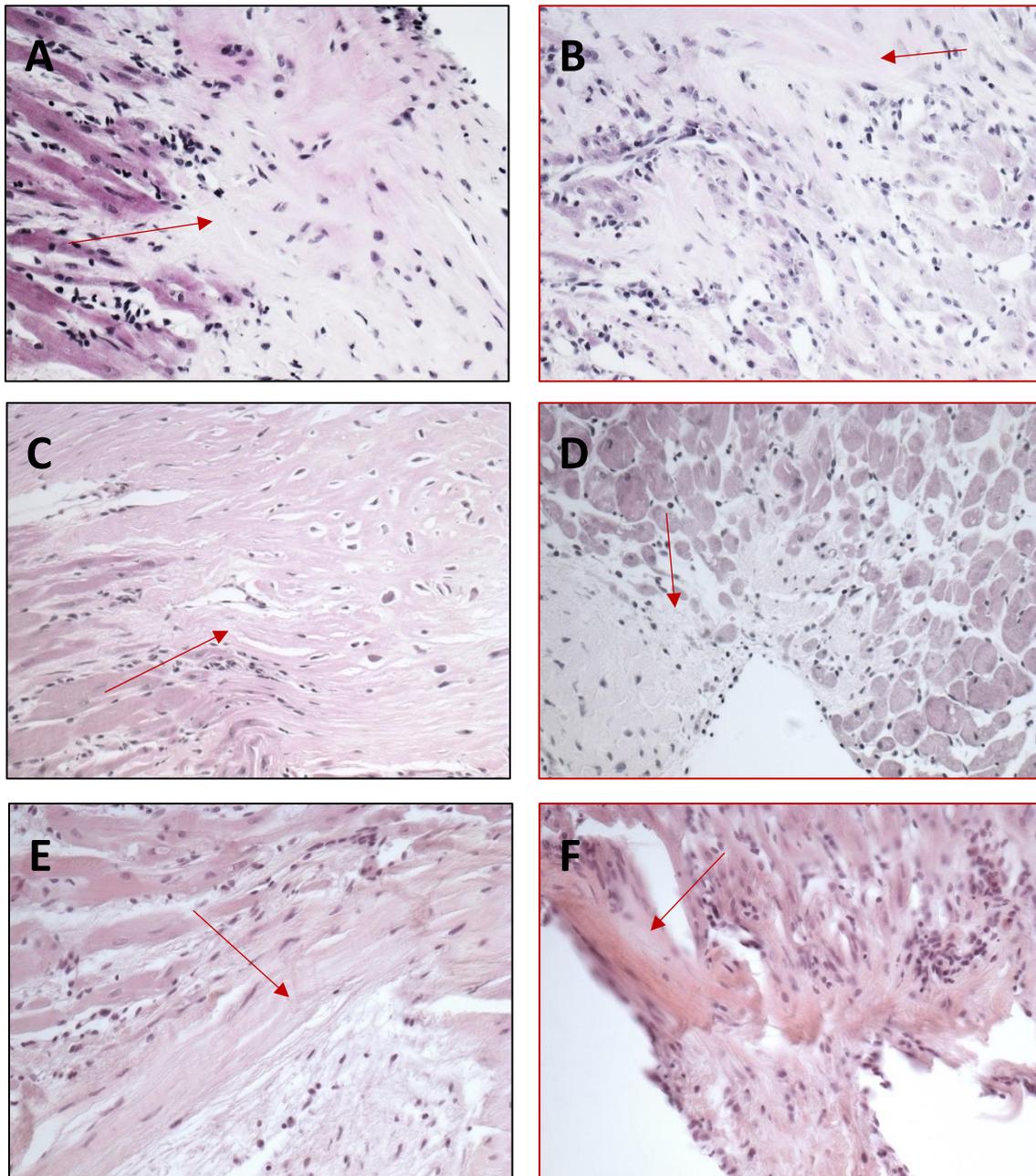


Figura 7. Corazón de ratas marcado mediante la técnica de Van Gieson. Jóvenes agudo (A, B), jóvenes secuelas (C, D) y adultos agudos marcado con H-E (E, F). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20. Señaladas con una flecha las zonas de fibrosis.

### Función cardíaca

Tanto en los grupos de jóvenes como en los de adultos se observó una distribución normal de la conexina. Se encontró marcada en los discos intercalares sin que se apreciase ninguna anomalía en su distribución. (Figura 8).

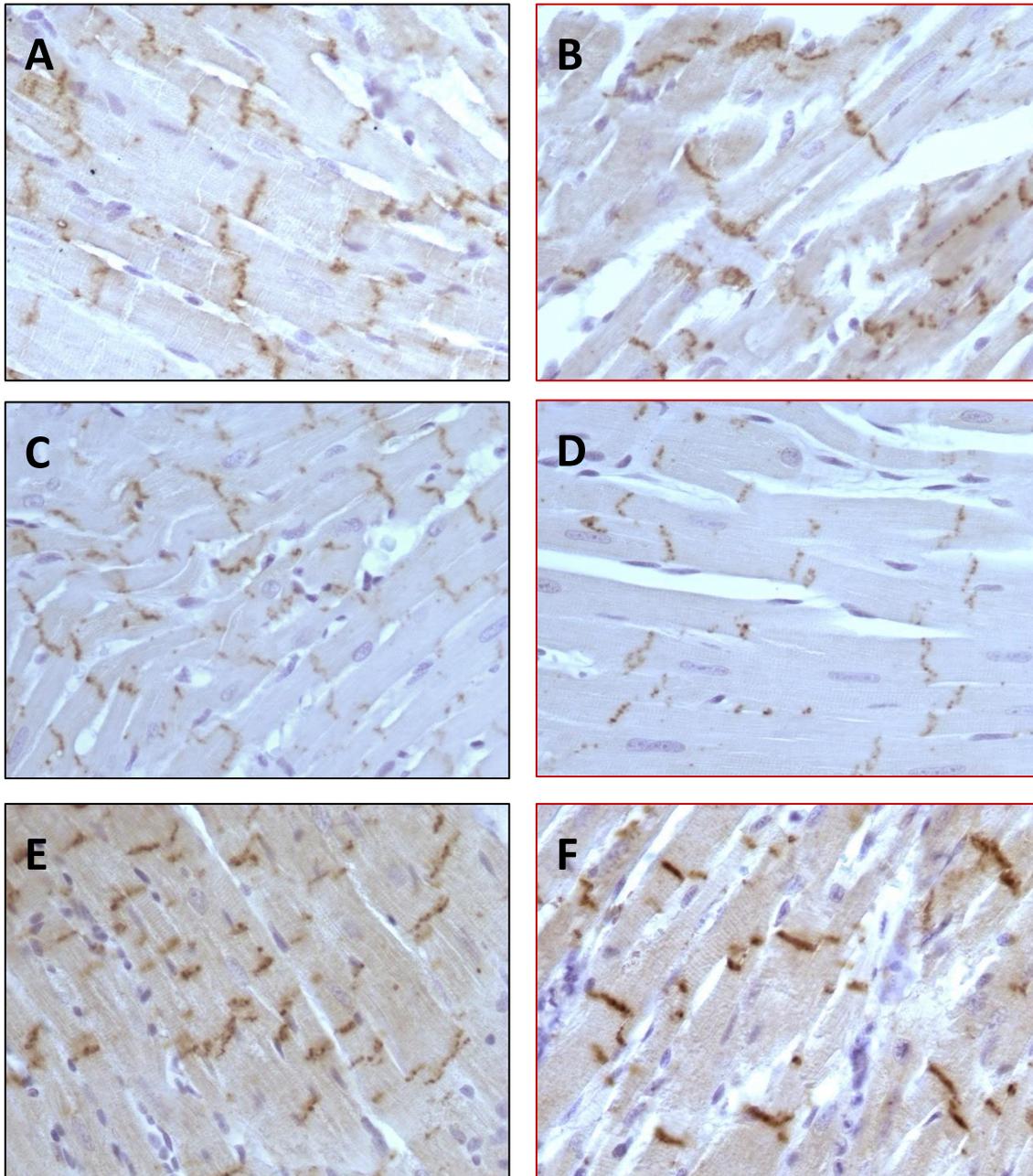


Figura 8. Corazón de ratas marcado con Connexina 43. Jóvenes agudo (A, B), jóvenes secuelas (C, D) y adultos agudos (E, F). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x40.

### Tamaño celular

En los grupos de animales jóvenes se observó, tanto en el de agudo (Figuras 9A, B y 10A) como en el de secuelas (Figuras 9C, D y 10B), un leve aumento no significativo del tamaño medio (en micras cuadradas) de los cardiomiocitos en el grupo tratamiento respecto al grupo control.

Al contrario, en el grupo de animales adultos agudo (Figuras 9E, F y 10C), se observó una leve disminución de la media del tamaño de los cardiomiocitos, aunque fue no significativo.

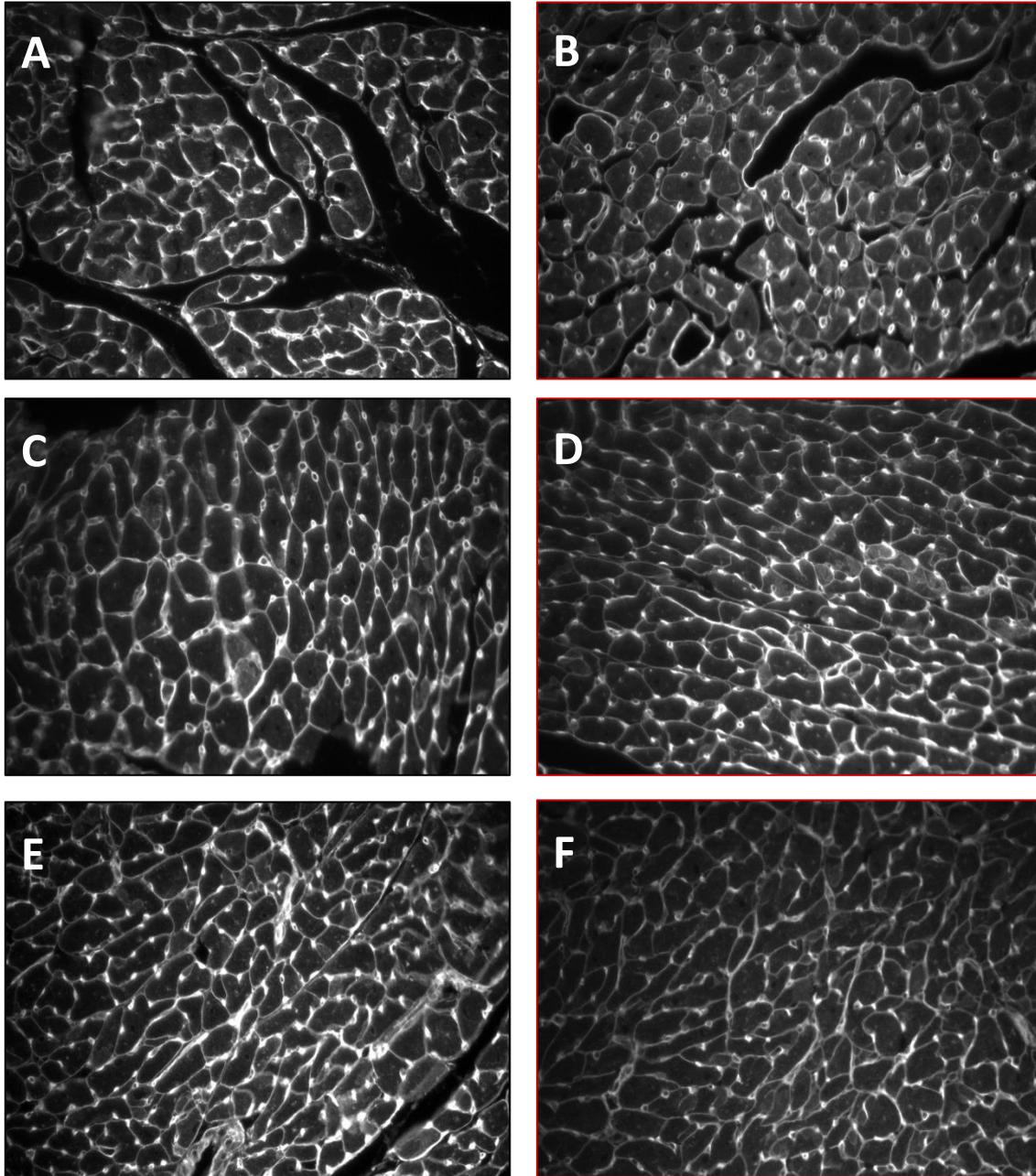


Figura 9. Corazón de ratas marcado con WGA. jóvenes agudo (A, B), jóvenes secuelas (C, D) y adultos agudos (E, F). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x40. Marcadas en blanco las membranas celulares de los cardiomiocitos.

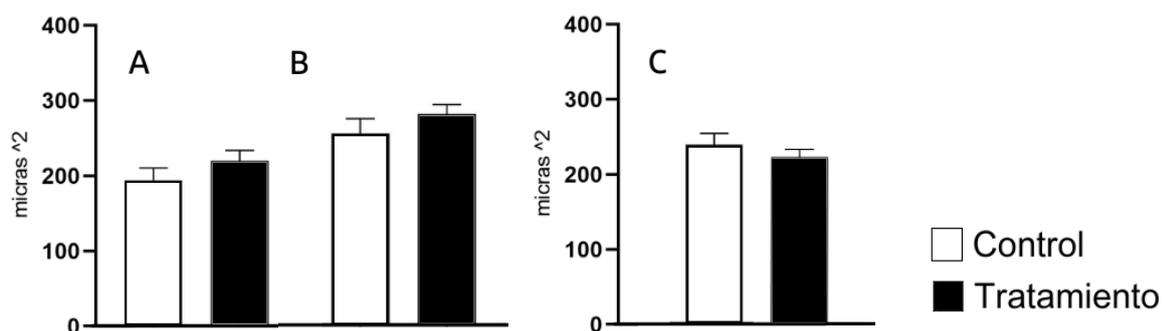


Figura 10. Valoración cuantitativa de tamaño celular. **A**, grupo de jóvenes agudo (control y tratamiento ambas con n=6), las diferencias son no significativas ( $P > 0,05 = 0,2586$ ); **B**, jóvenes secuelas (control con n=4 y tratamiento con n=6), con diferencias tampoco significativas ( $P > 0,05 = 0,3259$ ); **C**, adultos agudo (control con n=6 y tratamiento con n=4), diferencias no significativas ( $P > 0,05$ ;  $P = 0,3634$ ).

### Células cebadas

Tanto en el grupo de los jóvenes agudo como en el de los adultos agudo, se observó un aumento en el número de células cebadas del grupo tratamiento respecto al control, aunque no fue significativo (Figuras 11A, C, 12A, B, E y F). Al contrario, en el grupo de los animales jóvenes secuelas se vio un aumento mucho mayor y significativo (Figuras 11B, 12C y D).

También se observó un número mayor de estas células en los adultos con respecto a los jóvenes (Figura 11).

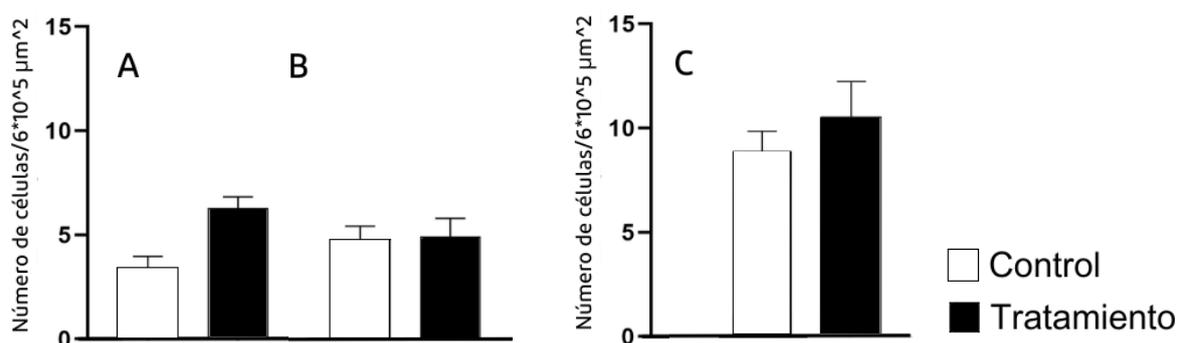


Figura 11. Valoración cuantitativa del número de células cebadas. **A**, grupo de jóvenes agudo (control y tratamiento ambas con n=6), las diferencias son no significativas ( $P > 0,05$ ;  $P = 0,8926$ ); **B**, jóvenes secuelas (control con n=4 y tratamiento con n=6), las diferencias de número de células cebadas son significativas con  $**P < 0,05 = 0,0063$ . **C**, adultos agudo (control con n=6 y tratamiento con n=4), diferencias no significativas ( $P > 0,05$ ;  $P = 0,4376$ ).

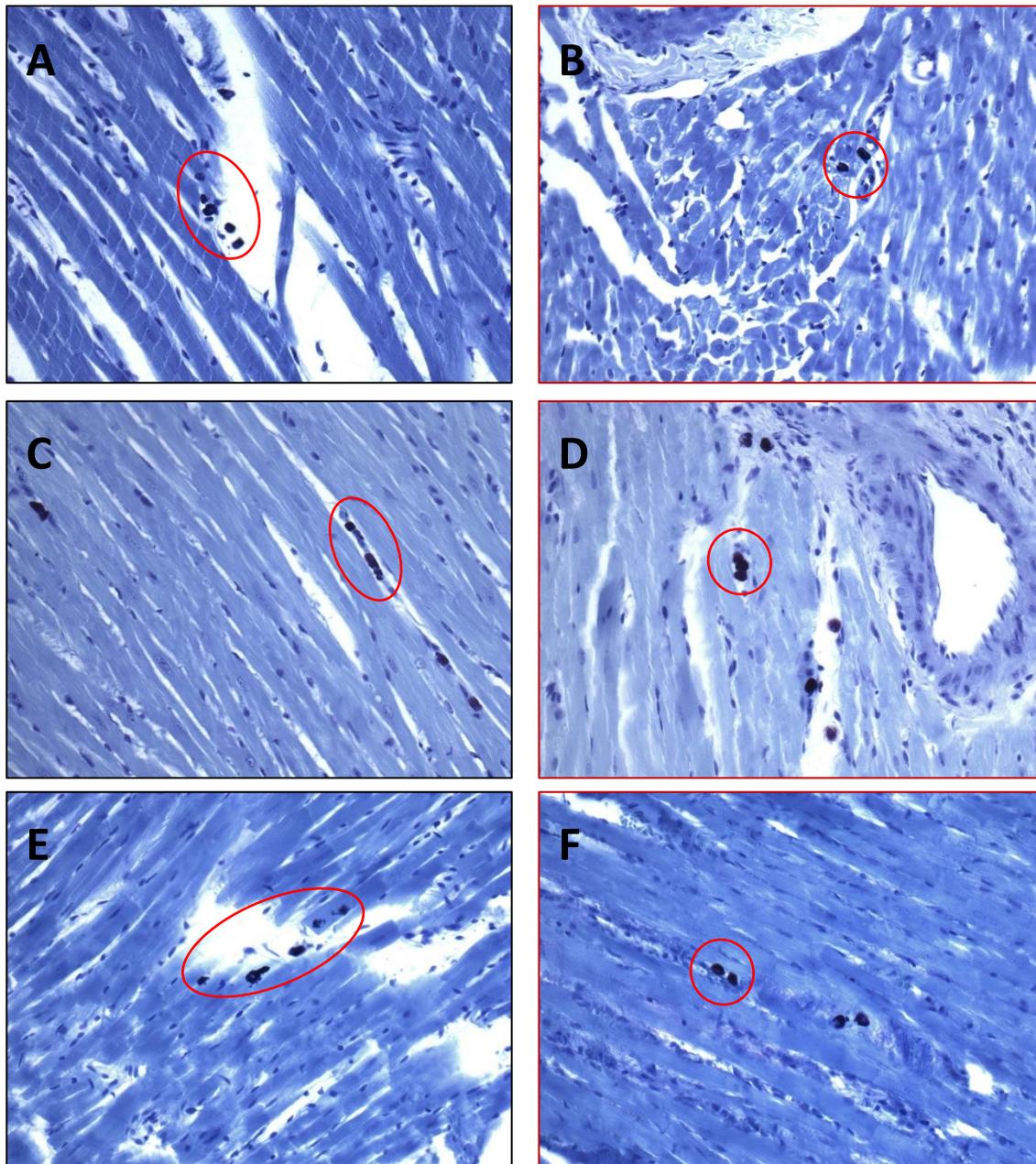


Figura 12. Corazón de ratas marcado con azul de toluidina. Jóvenes agudo (A, B), jóvenes secuelas (C, D) y adultos agudos (E, F). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20. En azul oscuro vemos las células cebadas. Rodeadas algunas células cebadas.

### Macrófagos

En los grupos de los animales jóvenes se observó un aumento del número de macrófagos M2 en los grupos tratamiento respecto a los grupos control, siendo este aumento significativo en la cohorte de agudo (Figuras 13A, B y 14A), pero no en la de secuelas (Figuras 13C, D y 14B).

En el grupo de los animales adultos también se observó ese aumento, pero fue no significativo (Figuras 13E, F y 14C).

Además, se observó una disminución en el número de macrófagos en los grupos de animales adultos con respecto a los de los jóvenes (Figura 14).

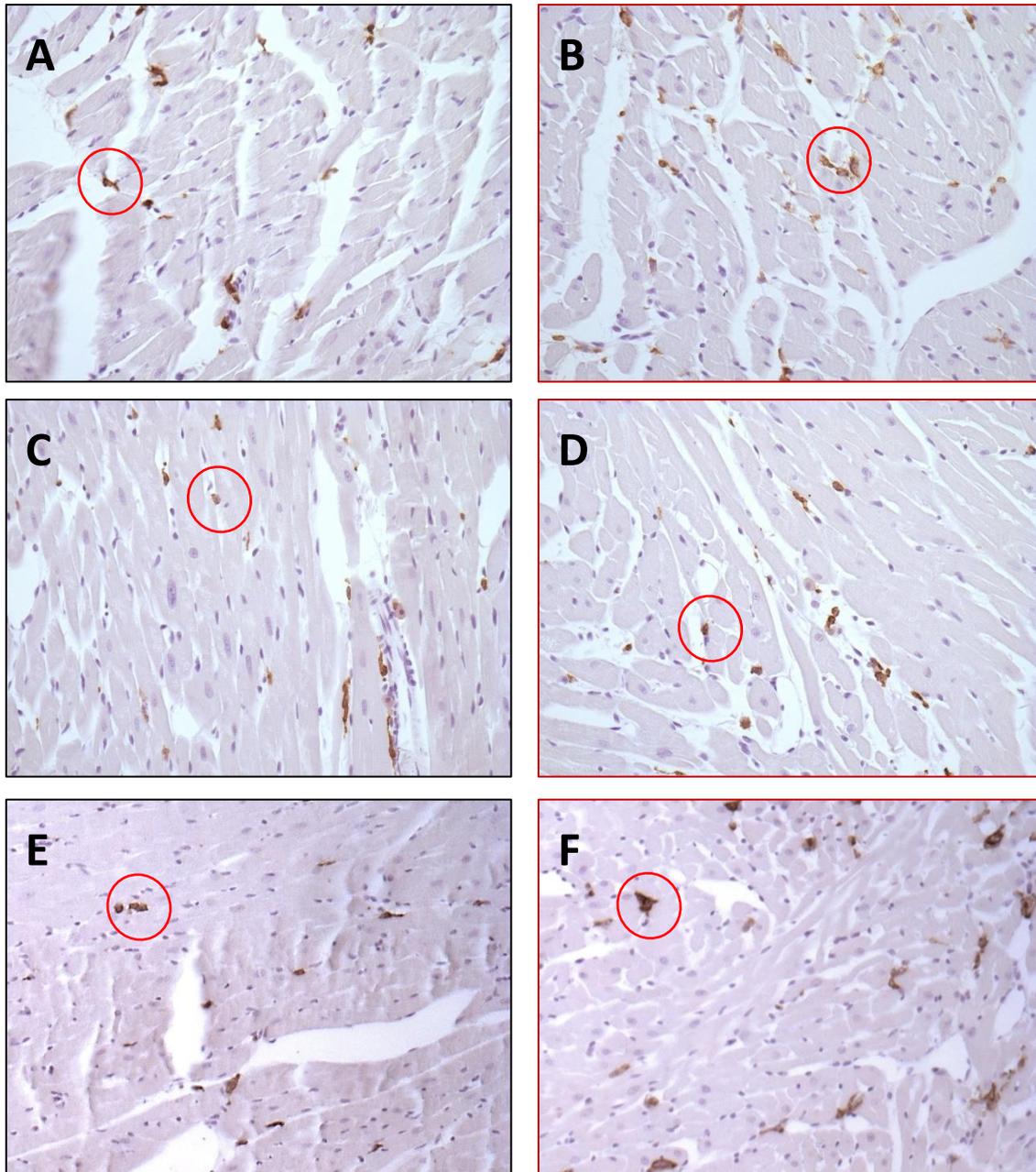


Figura 13. Corazón de ratas marcado con CD163. Jóvenes agudo (A, B), jóvenes secuelas (C, D) y adultos agudos (E, F). Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20. En marrón oscuro se marcan los macrófagos. Rodeados algunos macrófagos.

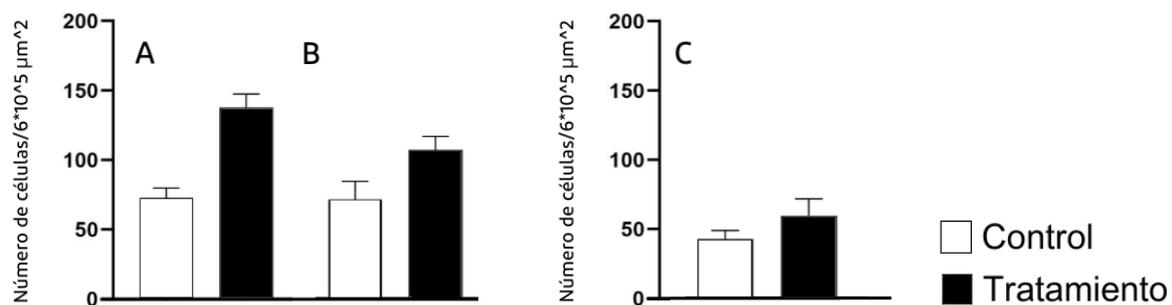


Figura 14. Valoración cauntitativa de macrófagos M2. **A**, grupo de jóvenes agudo (control y tratamiento ambas con n=6), las diferencias son significativas con \*\*\* $P < 0,05 = 0,0005$ ; **B**, jóvenes secuelas (control con n=4 y tratamiento con n=6) las diferencias de número de macrófagos son no significativas ( $P > 0,05 = 0,0697$ ); **C**, adultos agudo (control con n=6 y tratamiento con n=4), diferencias no significativas ( $P > 0,05$ ;  $P = 0,2756$ ).

### Neutrófilos

Tanto en los grupos de animales jóvenes como en el de adultos, el número de neutrófilos fue escaso y no significativo, al encontrar entre 0 y 4 neutrófilos por muestra (Figuras 15 y 16).

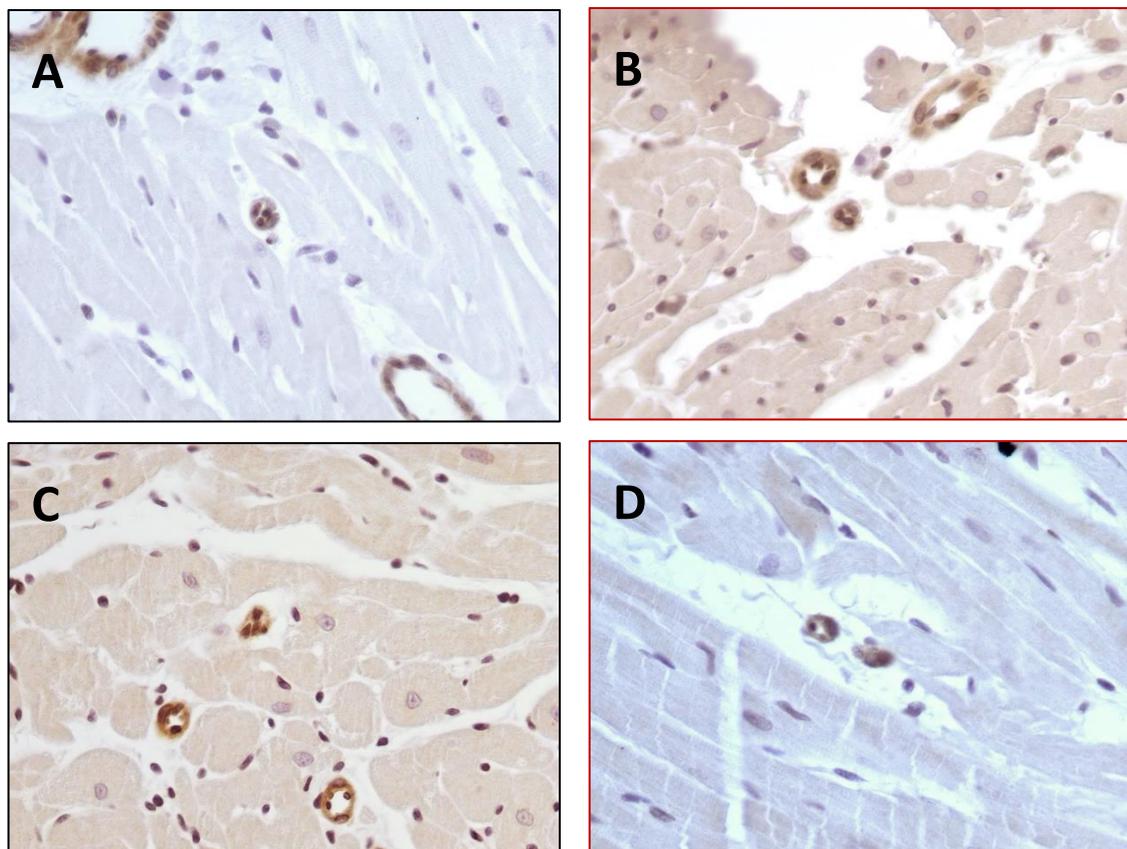


Figura 15. Corazón de ratas marcado con MPO. Jóvenes agudo (A, B) y jóvenes secuelas (C, D). Animales control (marca negro) o tratados (rojo). Objetivo x20. Neutrófilos marcados en un color marrón oscuro (del mismo color se marca como ruido la capa epitelial de los vasos sanguíneos).

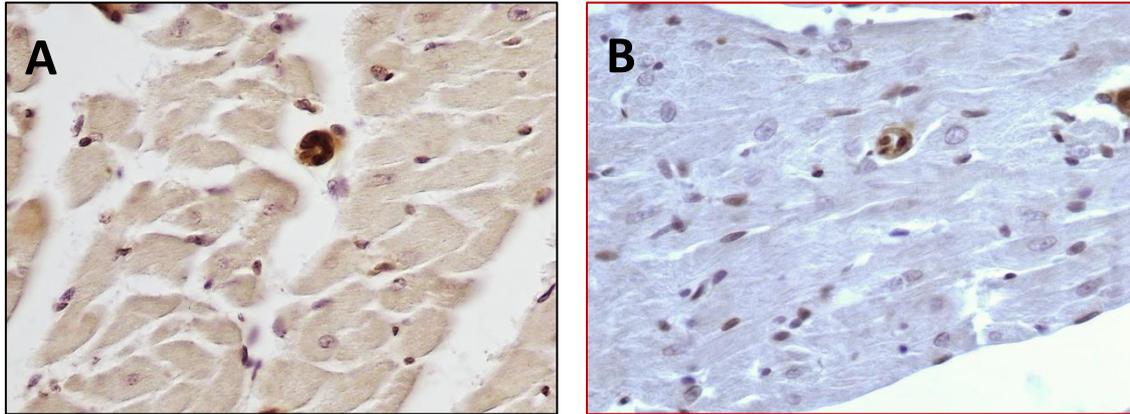


Figura 16. Corazón de ratas adultas agudo marcado con MPO. Animales control (marco negro) o tratados (rojo). Objetivo x20. Neutrófilos marcados en un color marrón oscuro (del mismo color se marca como ruido la capa epitelial de los vasos sanguíneos).

## DISCUSIÓN

La COVID-19 genera un SIRS con síntomas que podrían indicar una sepsis viral, causando insuficiencia multiorgánica y muerte en los enfermos críticos (Sosa-Medellín et al, 2021). Para poder estudiar este proceso en profundidad se pensó que un modelo a partir de la administración de LPS, ATP e imiquimod replicaría las complicaciones de la enfermedad en corazón.

En estudios similares en los que se pretendía producir sepsis en tejido cardíaco de ratones mediante la administración de LPS (50mg/kg), se comenzaron a ver efectos importantes cuatro días después de la inyección, encontrándose una desorganización del músculo cardíaco (Chen et al, 2020). En otra investigación se ve como 48 horas después de la administración a ratones de LPS (6mg/kg) el 40% fallecen (Fujimura et al, 2023). Igualmente, en un experimento con ratas a las que se inyectaba LPS (1mg/kg/día) durante 14 días se observa infiltración de linfocitos (Abareshi et al, 2017). Se observa en otro trabajo infiltración de células inflamatorias y necrosis de cardiomiocitos de ratones 12 horas después de la administración de LPS (10mg/kg) (Liu et al, 2021). En el presente estudio nos encontramos en un caso opuesto, ya que con la tinción de H-E no se encontraron cantidades ni diferencias significativas de infiltrados de linfocitos ni daño en las muestras. Esta negatividad en los resultados puede deberse a que la dosis de LPS inyectada durante nuestra investigación es menor y por lo tanto, produce menos efectos. Se valoró la posibilidad de que las pocas zonas eosinofílicas que se encontraron, unido al bajo infiltrado inflamatorio pudieran ser indicativos de una cardiopatía temprana. Por esto se realizaron los dos análisis adicionales con los anticuerpos ATF3 e iNOS respectivamente. En el caso de ATF3, nuestros resultados apoyaron los resultados negativos de la tinción de H-E. En otras investigaciones se ha visto como la presencia de ATF3 está relacionada con un aumento de la función cardíaca, hipertrofia y fibrosis (Koren et al, 2013), pero estas diferencias pueden

deberse a que este trabajo se ha llevado a cabo con ratones transgénicos para mayor expresión de ATF3. En el caso de iNOS en nuestro estudio se obtuvo también un resultado negativo, que concuerda con la falta de daño mencionada anteriormente, ya que iNOS suele expresarse en corazones con procesos inflamatorios y no expresarse en corazones sanos (Brown & Borutaite, 2007) debido a que la presencia de iNOS produce la síntesis de NO que puede inhibir la contractibilidad de los miocitos y producir insuficiencia cardíaca. Aún así, la ausencia de iNOS no es sinónimo de salud, pues como se ve en un artículo en ratones, la ausencia de iNOS no provoca diferencias en la mortalidad por inflamación inducida por LPS (Laubach et al, 1995). Al contrario que en nuestro caso, otros trabajos han demostrado que en corazón de ratones se presentan niveles altos de iNOS después de 6 horas del tratamiento (lo que se aproximaría a nuestros grupos de agudo) con LPS (10mg/kg) (Zhang et al, 2020). Al igual que en el caso anterior, estas diferencias pueden deberse a que la dosis de LPS inyectada en nuestro caso es bastante menor.

En cuanto a la fibrosis, nos encontramos con la misma situación que en el caso anterior, nuestro estudio dio como resultado una fibrosis escasa y sin diferencias en ninguno de los grupos, lo que indica una baja muerte de los cardiomiocitos. Esto indicaría que no hay disfunción contráctil y, por lo tanto, no se habría producido insuficiencia cardíaca por esta causa. Lo que coincide con la ausencia de daño encontrada en H-E. En contraposición, encontramos estudios en rata en los que LPS (1mg/kg/día durante 14 días) induce el aumento de fibrosis en el tejido del corazón (Abareshi et al, 2017). Estas diferencias pueden deberse a que la dosis inyectada en nuestro experimento es bastante menor, como en los casos anteriores.

En cuanto a la función cardíaca, se sabe que la conexina 43 media las uniones gap entre cardiomiocitos y que su distribución alterada está asociada a enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca. En un trabajo con ratones se ha visto que el LPS (10mg/kg) induce la reducción de la expresión de Conexina 43 y aumentado la apoptosis de las células 12 horas después (lo que se aproximaría a nuestra fase aguda) de la administración del fármaco (Liu et al, 2021). En nuestro estudio se observó lo contrario, pues no se vieron efectos del LPS sobre la conexina como se espera en un corazón sano, lo que podría indicar una función cardíaca normal. Esto apoyaría los resultados de los análisis anteriores en los que no se veía daño, y una vez más, la explicación podría ser una baja dosis de LPS inyectado en nuestro caso. De todos modos, solo se ha valorado la distribución mediante microscopio óptico, pero no se ha hecho una cuantificación de esta o un análisis de microscopía electrónica para comprobar que no había anomalías estructurales en los gaps.

En el caso del tamaño celular, en una investigación con ratones se ve que el LPS (5 mg/kg) produce hipertrofia de los cardiomiocitos entre 7 y 9 horas después de la inyección (Wang et al, 2016). En otro

estudio en rata, se ve que el LPS (10 mg/mL) aumenta los marcadores de hipertrofia de manera proporcional al tiempo que se realizaron las valoraciones, 6, 12, 24 y 48 horas (Sun et al, 2021). En nuestro trabajo, ambos casos se corresponderían con nuestros grupos agudos, en jóvenes se ha visto ese aumento de tamaño, pero no fue significativo, esta falta de significación podría deberse a que la dosis de fármaco inyectada es menor. Al contrario, en el caso de adultos, llama la atención una reducción del tamaño de los cardiomiocitos en el grupo de tratados respecto al control. Quizás sería necesario un estudio con un mayor número de animales para corroborar este dato.

En el caso de las células cebadas, un estudio en ratones refleja un aumento en el número de células cebadas en pulmón 12 horas después de la inoculación de LPS (Pooladanda et al, 2021). En otro artículo se ha visto que el LPS (6 mg/kg) disminuye la cantidad de células cebadas en sangre 6 horas después de la administración de LPS (Fujimura et al, 2023). En nuestro trabajo se observó también un aumento de células cebadas en los individuos tratados con LPS, ATP e imiquimod, pero solo fue significativo en el caso de jóvenes secuelas, es decir, entre tres y cuatro semanas después, a diferencia del primer caso mencionado, que se correspondería mejor con nuestra cohorte de agudo. Se sabe que la presencia de células cebadas suele ir asociada a procesos proinflamatorios (Legere et al, 2019), por lo que podría parecer incoherente que el número de células cebadas sea mayor en la fase de secuelas, ya que la inflamación debería ser mayor en la fase de agudo. Este resultado puede deberse al bajo número de células cebadas encontradas por zona, por lo que la estadística podría no ser fiable y deberían ser consideradas, en todo caso, no significativas.

En cuanto a la infiltración de macrófagos, en un estudio en ratones, se ve como el tratamiento con LPS reduce la expresión de CD163 (anticuerpo marcador de macrófagos) en el corazón 6 horas después de la administración de la endotoxina (10mg/kg). Se ve también que la no expresión de CD163 aumenta la mortalidad de los ratones, posiblemente debido a una producción menor de IL-10, ya que CD163 regula la inflamación producida por LPS. En esa investigación se muestra también que la expresión de CD163 aumenta durante la fase de resolución de la respuesta inflamatoria, como es lógico, al ser un marcador de macrófagos antiinflamatorios (Zhang et al, 2020). En autopsias de pacientes humanos se ha observado que hay un mayor número de macrófagos positivos para CD163 en aquellos que han muerto por *shock* séptico (Fujiwara et al, 2020). En otro trabajo con ratones se ve que la expresión máxima de CD163 se produce entre las 12 y 48 horas tras la administración de LPS (50 µg) (Fujiwara et al, 2020). En nuestro estudio se vio un aumento del número de macrófagos positivos para CD163 significativo únicamente en el caso de jóvenes agudo, es decir, 24 horas después de la administración de LPS. Esto concuerda con lo descrito anteriormente y nos haría pensar que nos encontramos en la fase de resolución de la respuesta inflamatoria.

Para terminar, en cuanto al número de neutrófilos, un trabajo en pulmón de ratones refleja el aumento del número de neutrófilos 12 horas después de la administración de LPS (Pooladanda et al, 2021). Otro artículo sobre ratones muestra el aumento de neutrófilos en sangre tras la inoculación del LPS (6mg/kg) (Fujimura et al, 2023). En un trabajo con ratas se observa que el LPS (0,5 mg/kg) provoca un aumento significativo del número de neutrófilos en el corazón 9 horas después de su administración (Vaez et al, 2016). En otro estudio en bazo e hígado de ratones también se observa un aumento de MPO debido a la inoculación del LPS (1mg/kg), este refleja que MPO es un buen marcador de inflamación en la sepsis (Jafari-Khataylou et al, 2021), ya que esta enzima se encuentra en los gránulos de los neutrófilos y sirve para destruir patógenos (Wali et al, 2020). En nuestra investigación hemos observado una cantidad de neutrófilos muy baja y constante, sin diferencias entre grupos, esto podría indicar una baja inflamación que no se explica por una baja dosis de LPS inyectado, ya que en el ejemplo de Vaez et al (2016), con una dosis menor se observa un aumento mayor. Podría ser que el efecto sea muy efímero, y el número de neutrófilos disminuya rápidamente, ya que en ese artículo se mide el número de neutrófilos a las 9 horas y nosotros lo medimos a las 24 horas y entre tres y cuatro semanas después.

En resumen, nuestros resultados no muestran muchos signos de inflamación significativos, a excepción del aumento de células cebadas en la fase de secuelas en jóvenes y el aumento del número de macrófagos en la fase aguda también en los animales jóvenes. Esto último podría ser indicativo de que el modelo produce una inflamación muy leve en el corazón en jóvenes, mientras que el aumento de células cebadas en la fase de secuelas es probable que se deba al bajo número de células cebadas encontradas por muestra, de modo que es más fácil que la estadística se desajuste. Este punto merecería un futuro estudio con una n mayor que lo aclare.

## **CONCLUSIÓN**

En conclusión, en este estudio se ha observado que apenas hay complicaciones cardíacas en ninguno de los grupos de estudio. En jóvenes agudo encontramos el aumento de macrófagos que podría indicar que se ha producido inflamación tras la inyección del *cocktail*. En el grupo de jóvenes secuelas se encuentra un aumento de células cebadas debido probablemente al bajo número encontrado. En el caso de los adultos, no se ha encontrado ninguna complicación cardíaca significativa, esto podría deberse a que los efectos en el corazón adulto se manifiestan más tarde como indicaría el hecho de que el grupo de adultos secuelas falleciera sin que pudiésemos realizar los experimentos. Este es un aspecto que merecería un estudio más intenso. Para futuras investigaciones podrían probarse otras dosis de LPS, ATP e imiquimod o variar el tiempo que transcurre entre la inyección y el sacrificio para ver si se consigue una mayor respuesta inflamatoria en el corazón. También podría hacerse un estudio con una n mayor para ver si esa puede ser la causa de la falta de significancia y las incoherencias en algunos de los resultados.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos aquellos que han colaborado en la realización de este Trabajo de Fin de Grado. En especial a mi tutor José Antonio Uranga por su confianza y paciencia y por transmitirme tantos conocimientos en este breve período.

Me gustaría agradecer también a los técnicos del laboratorio de Histología de la Universidad Rey Juan Carlos, Raquel, Antonio y Julio, y a Bianca por toda la ayuda y los consejos que he recibido de ellos durante la realización de este TFG y por el excelente ambiente de trabajo.

Y para terminar me gustaría agradecer también a la Dra. Raquel Ábalo, a mi tutor nuevamente, y al grupo NeuGut por darme la posibilidad de trabajar y aprender con el proyecto: Modelo preclínico en rata de pseudoinfección y sepsis por *cocktail* proinflamatorio: caracterización de secuelas in vivo e in vitro en ratas jóvenes y viejas (dentro del proyecto Machine Learning sobre Single Cell Multi-ómico para Relacionar COVID-19, Envejecimiento y Cardiopatías: Mecanismos y Validación de Modelo Preclínico. Comunidad de Madrid-UE (REACT-UE). IP: Sergio Muñoz Romero y José Luis Rojo Álvarez, Comunidad de Madrid. 2022. 3.968.000 euros.), dentro del cual se engloba mi TFG.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abareshi, A.; Norouzi, F.; Asgharzadeh, F.; Beheshti, F.; Hosseini, M.; Farzadnia, M.; Khazaei, M. (2017). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on cardiac fibrosis and oxidative stress status in lipopolysaccharide-induced inflammation model in rats. *International Journal of Preventive Medicine*, 8(1), 69. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm\\_322\\_16](https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm_322_16)
- Alcaíno Von Hausen, M. A. (2016). SIRS, Sepsis Y Shock Séptico. *Síntesis*.
- Alfaro-Murillo, A.; Lazo-Paéz, G. (2021). Linfocitosis hemofagocítica secundaria y síndrome de liberación de citoquinas en COVID-19, ¿entidades iguales o diferentes? *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología* 38(2), 271–278. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182021000200271>
- Arzola, L.; Villalón, M. J.; Iturriaga, R. M. (2020). *La inflamación de la vía aérea aumenta la liberación de atp mediada por canales de panx1 y hemicanales de cx, produciendo hiperreactividad y alteraciones de la actividad ciliar y del clearance mucociliar*. [Tesis doctoral, Pontificia Universidad Católica De Chile]. Repositorio.uc.cl <https://repositorio.uc.cl/xmlui/bitstream/handle/11534/45769/Tesis%20Lilian%20Arzola%20Mart%3%adnez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bhatia, M.; He, M.; Zhang, H.; Mochhala, S. (2009). Sepsis as a model of SIRS. *Frontiers in Bioscience* 14(12), 4703-4711. <https://doi.org/10.2741/3561>

- Brown, G.; Borutaite, V. (2007). Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular Research* 75(2), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.022>
- Chen, C.; Weng, J.; Fang, D.; Chen, J.; Chen, M. (2020). Transcriptomic study of lipopolysaccharide-induced sepsis damage in a mouse heart model. *Experimental and Therapeutic Medicine* 20(4) 3782-3790. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9086>
- Cleary, S.; Pitchford, S.; Amison, R.; Carrington, R.; Robaina, C.; Magnen, M.; Looney, M.; Gray, E.; Page, C. (2020). Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology. *British Journal of Pharmacology* 177(21), 4851-4865. <https://doi.org/10.1111/bph.15143>
- DeCS/MeSH Descriptores en ciencias de la salud. (2006, 5 julio). Endotoxemia. En *DeCS/MeSH Descriptores en ciencias de la salud*. Recuperado 31 de mayo de 2023, de <https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=32929>
- Di Virgilio, F.; Vuerich, M. (2015). Purinergic signaling in the immune system. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 191, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.011>
- Fink M.; Heard S. (1990). Laboratory models of sepsis and septic shock. *Journal of Surgical Research* 49(2), 186-196. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(90\)90260-9](https://doi.org/10.1016/0022-4804(90)90260-9)
- Fujimura, K.; Karasawa, T.; Komada, T.; Yamada, N.; Mizushina, Y.; Baatarjav, C.; Matsumura, T.; Otsu, K.; Takeda, N.; Mizukami, H.; Kario, K.; Takahashi, M. (2023). NLRP3 inflammasome-driven IL-1 $\beta$  and IL-18 contribute to lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 180, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2023.05.003>
- Fujiwara, Y.; Ohnishi, K.; Horlad, H.; Saito, Y.; Shiraishi, D.; Takeya, H.; Yoshii, D.; Kaieda, S.; Hoshino, T.; Komohara, Y. (2020). CD163 deficiency facilitates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and endotoxin shock in mice. *Clinical & translational immunology*, 9(9). <https://doi.org/10.1002/cti2.1162>
- Gancedo, I; Alcalde, M.P. (2021). *Reacción inflamatoria del covid-19 comparada con otras respuestas inflamatorias graves*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Zaragoza]. Zaguán.unizar. <https://zaguán.unizar.es/record/111214/files/TAZ-TFG-2021-816.pdf>
- García, A.; López, J.; Sánchez, M. (2000). Respuesta inflamatoria sistémica: definiciones, marcadores inflamatorios y posibilidades terapéuticas. *Medicina intensiva* 24(8), 361-370. [https://doi.org/10.1016/s0210-5691\(00\)79623-9](https://doi.org/10.1016/s0210-5691(00)79623-9)
- Gotts, J.; Matthay, M. (2016). Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353(1585). <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>
- Jafari-Khataylou, Y.; Emami, S.; Mirzakhani, N. (2021). Troxerutin attenuates inflammatory response in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Research in Veterinary Science* 135, 469-478. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.11.020>

- Jaramillo-Bustamante, J.; Piñeres-Olave, B.; González-Dambrauskas, S. (2020). SIRS o no SIRS: ¿es esa la infección? Una revisión crítica de los criterios de definición de sepsis. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 77(6), 293-302. <https://doi.org/10.24875/bmhim.20000202>
- Koren, L.; Elhanani, O.; Kehat, I.; Hai, T.; Aronheim, A. (2013). Adult Cardiac Expression of the Activating Transcription Factor 3, ATF3, Promotes Ventricular Hypertrophy. *PLOS ONE* 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068396>
- Laubach, V.; Shesely, E.; Smithies, O.; Sherman, P. (1995). Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(23), 10688-10692. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10688>
- Legere, S.; Haidl, I.; Légaré, J. F.; Marshall, J. (2019). Mast Cells in Cardiac Fibrosis: New Insights Suggest Opportunities for Intervention. *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00580>
- Liu, L.; Yan, M.; Yang, R.; Qin, X.; Chen, L.; Li, L.; Si, J.; Li, X.; Ma, K. (2021). Adiponectin Attenuates Lipopolysaccharide-induced Apoptosis by Regulating the Cx43/PI3K/AKT Pathway. *Frontiers in Pharmacology* 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.644225>
- Liu, Z. J.; Liu, H.; Wu, C.; Xue, K. (2019). Effect of sepsis on the action potential and cardiac serotonin response in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 18(3), 2207–2212. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7810>
- López-Bojorquez, L. N. (2004). La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de investigación clínica* 56(1), 83-92. ISSN 2564-8896.
- Lush, C.; Kvietys, P. (2010). Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation* 7(2), 83-101. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7300096>
- Medeiros, A.; Daponte-Codina, A.; Moreira, D.; Pinheiro, R.; Costa, K.; Gil-García, E. (2021). Factores asociados a la incidencia y la mortalidad por COVID-19 en las comunidades autónomas. *Gaceta sanitaria* 35(5), 445-452. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2020.05.004>
- Moreno-Eutimio, M. (2016). Inflamación y sepsis. *Revista Hospital Juárez de México* 83(3), 86-91.
- Muñoz-Carrillo, J.; Villalobos-Gutiérrez, P.; Puebla-Pérez, A.; López-Luna, A.; Flores-de la Torre, J.; Alvarez-Barreto, I.; Gutiérrez-Coronado, O. (2021). El tratamiento con resiniferatoxina exhibe propiedades antiinflamatorias en un modelo murino de inflamación inducida por lipopolisacárido. *Revista Biomédica* 32(3).
- Navarrete, M. L.; Cerdeño, M. S. V.; Serra, M.; Conejero, R. (2013). Síndrome de distrés mitocondrial y de la microcirculación en el paciente crítico. Implicaciones terapéuticas. *Medicina Intensiva*. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2013.03.001>

- Pérez Ruiz, A.; Rodríguez Calzadilla, A.; Sanjurjo Gómez, V. M., & Padrón Chacón, R. (1997). El papel de óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*, 34(2), 84-86. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v32i3.882>
- Pooladanda, V.; Thatikonda, S.; Muvvala, S.; Devabattula, G.; Godugu, C. (2021). BRD4 targeting nanotherapy prevents lipopolysaccharide induced acute respiratory distress syndrome. *International Journal of Pharmaceutics* 601. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120536>
- Riteau, N.; Gasse, P.; Fauconnier, L.; Gombault, A.; Couegnat, M.; Fick, L.; Kanellopoulos, J.; Quesniaux, V.; Marchand-Adam, S.; Crestani, B.; Ryffel, B.; Couillin, I. (2010). Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X<sub>7</sub> Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182(6), 774-783. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0359oc>
- Schön, M.; Schön, M. (2007). Imiquimod: mode of action. *The British Journal of Dermatology* 157 (2), 8–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x>
- Shenoy, S. (2020). Coronavirus (Covid-19) sepsis: revisiting mitochondrial dysfunction in pathogenesis, aging, inflammation, and mortality. *Inflammation Research* 69, 1077-1085. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01389-z>
- Singer, M.; Deutschman, C.; Warren, C.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G.; Chiche, J.; Coopersmith, C.; Hotchkiss, R.; Levy, M.; Marshall, J.; Martin, G.; Opal, S.; Rubenfeld, G.; Van Der Poll, T.; Vincent, J.; Angus, D. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8), 801-810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Sosa-Medellín, M.; Ponce-Mendoza, R.; Luviano-García, J.; Almanza-Valdez, H.; Maheda-García, H.; Santos-Macías, J.; Tobías-Ortega, J.; Cavazos-Obregón, O.; Olvera-Carranza, E.; Rodríguez-Segovia, A.; Vázquez-Ramírez, R.; Garcés-Estrada, L.; Pérez-Pérez, L. (2021). COVID-19: ¿tormenta de citocinas o sepsis viral? *Medicina interna de México*, 37(4), 580-585. <https://doi.org/10.24245/mim.v37i4.4817>
- Sun, F.; Chen, G.; Yingyao, Y.; Lei, M. (2021). Fatty acid-binding protein 4 silencing protects against lipopolysaccharide-induced cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis by inhibiting the Toll-like receptor 4–nuclear factor-κB pathway. *Journal of International Medical Research* 49(3). <https://doi.org/10.1177/0300060521998233>
- Vaez, H.; Rameshrad, M.; Najafi, M.; Barar, J.; Barzegari, A.; Garjani, A. (2016). Cardioprotective effect of metformin in lipopolysaccharide-induced sepsis via suppression of toll-like receptor 4 (TLR4) in heart. *European Journal of Pharmacology* 772, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.030>

- Villarroel, P. (2009). Sepsis y riesgo de enfermedad cardiovascular. En López A. y Macaya C. (Eds.). *Libro de la salud cardiovascular del hospital clínico San Carlos y la fundación BBVA* (pp. 187- 194). Nerea.
- Wali, A.; Rehman, M.; Raish, M.; Kazi, M.; Rao, P.; Alnemer, O.; Ahmad, P.; Ahmad, A. (2020). Zingerone [4-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-butan-2] Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Protects Rats from Sepsis Associated Multi Organ Damage. *Molecules* 25(21), 5127. <https://doi.org/10.3390/molecules25215127>
- Wang, H.; Bei, Y.; Shen, S.; Huang, P.; Shi, J.; Zhang, J.; Sun, Q.; Chen, Y.; Yang, Y.; Xu, T.; Kong, X.; Xiao, J. (2016). miR-21-3p controls sepsis-associated cardiac dysfunction via regulating SORBS2. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 94, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.03.014>
- Wichterman, K.; Baue, A.; Chaudry, I. (1980). Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research* 29(2), 189-201. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0022-4804(80)90037-2)
- Zhang, J.; Wang, M.; Ye, J.; Liu, J.; Xu, Y.; Wang, Z.; Ye, D.; Zhao, M.; Wan, J. (2020). The Anti-inflammatory Mediator Resolvin E1 Protects Mice Against Lipopolysaccharide-Induced Heart Injury. *Frontiers in Pharmacology* 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00203>

©2023 <Nombre de autor o autora>

Algunos derechos reservados

Este documento se distribuye bajo la licencia "Atribución 4.0 Internacional" de Creative Commons,

disponible en: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>