

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

DESARROLLO DE UN MODELO DE DAÑO CELULAR POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN IN VITRO

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Unai Montejo Insausti

Facultad de Medicina y Enfermería

UPV/EHU

Curso 2021-2022

Directores:

Ana Alonso Varona

Borja Herrero de la Parte

Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos.....	3
3. Materiales y métodos	4
3.1. Cultivos celulares.....	4
3.2. Cuantificación de la viabilidad celular	4
3.2.1. PrestoBlue™	4
3.2.2. MTT	5
3.2.3. Selección del método de medición de viabilidad celular	5
3.2.4. Curvas de calibración.....	5
3.3. Cuantificación de los niveles de ROS	6
3.4. Determinación de la densidad óptima de siembra	6
3.5. Inducción de estrés oxidativo mediante privación de glucosa y tratamiento con H ₂ O ₂	7
3.6. Privación de oxígeno y glucosa y reperfusión	8
3.7. Análisis de los datos.....	9
4. Resultados.....	10
4.1. Selección del método para la medición de la viabilidad celular.....	10
4.2. Determinación de la densidad óptima de siembra.	12
4.3. Modelo de inducción de estrés oxidativo por privación de glucosa y tratamiento con H ₂ O ₂ en células IEC-6	12
4.4. Privación de oxígeno y glucosa y reperfusión (OGD/R) en células IEC-6	14
5. Discusión	18
6. Conclusión	22
7. Bibliografía	23

Resumen

El síndrome de isquemia/reperfusión (SIR) mesentérica es una consecuencia grave de la isquemia mesentérica, causada por una insuficiente perfusión sanguínea del intestino. En la última década se han llevado a cabo diversos estudios sobre el daño producido por el SIR en diferentes órganos y su posible prevención o reversión. El control del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria resultan claves para el abordaje etiopatogénico de este proceso. De hecho, se ha demostrado que determinados sistemas antioxidantes celulares, son capaces de prevenir los efectos adversos de ROS asociados a SIR.

En este trabajo se ha desarrollado un modelo de daño celular por isquemia/reperfusión *in vitro*, basado en privación de oxígeno y glucosa/reperfusión (OGD/R) para, en un futuro, evaluar la eficacia terapéutica de distintos fármacos o tratamientos aplicados al SIR. Para ello, se ha estudiado el efecto de la privación de oxígeno y glucosa, y su posterior restitución, sobre la viabilidad celular y los niveles de ROS intracelulares de células derivadas del epitelio intestinal.

Se ha determinado que un periodo de 4 h de privación de oxígeno o glucosa provocaban, por separado, un daño objetivable sobre la viabilidad de las células IEC-6 además de un aumento de los niveles intracelulares de ROS. Sin embargo, su efecto combinado no fue sumatorio.

Tras la restauración de la glucosa y la reoxigenación, la viabilidad de las células sometidas a OGD disminuyó aún más respecto a las de control, pero no se encontraron diferencias en los niveles intracelulares de ROS.

1. Introducción

La isquemia mesentérica es una patología manifestada de forma aguda o crónica, causada por una insuficiente perfusión sanguínea del tejido intestinal. Formando parte de la categoría de isquemias mesentéricas agudas se encuentra la isquemia mesentérica no oclusiva (*non occlusive mesenteric ischemia*, NOMI), producida en algunos pacientes con insuficiencia cardíaca, sepsis o que hayan sufrido una pérdida considerable de volumen sanguíneo. Durante la NOMI, el flujo sanguíneo se ve reducido drásticamente por una causa ajena a la oclusión de los vasos sanguíneos, como la pérdida de un gran volumen de sangre. Este tipo de isquemia puede llegar a provocar la pérdida de la integridad de la mucosa intestinal, desencadenar una respuesta inflamatoria y ocasionar necrosis del tejido (Tilsed et al., 2016). El flujo sanguíneo debe ser restablecido lo antes posible para evitar que el intestino quede dañado de forma irreversible (Halladin, 2015). Sin embargo, tras un periodo de isquemia como en la NOMI, el tejido se ha adaptado a un metabolismo anaeróbico (Miranda et al., 2018), y al restablecer el flujo sanguíneo, se desencadenan una cascada de reacciones que dan lugar a un aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando así estrés oxidativo (Halladin, 2015; Miranda et al., 2018). El daño tisular producido y el consiguiente cuadro clínico se conocen como Síndrome de Isquemia/Reperusión (SIR).

El estrés oxidativo provoca daño en los lípidos, proteínas y ADN a causa del desequilibrio entre el exceso de producción de ROS y la capacidad del sistema antioxidante celular de hacerle frente (Chen et al., 2019). Esta situación provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias y la infiltración de neutrófilos, de forma que se agrava el daño provocado por la isquemia (Kalogeris et al., 2012). Este daño puede llegar a provocar la pérdida de la integridad de la barrera mucosa lo que facilita la translocación bacteriana desde el lumen intestinal a la circulación sanguínea. En consecuencia, se desencadenan respuestas inflamatorias locales y remotas que terminan en síndromes de respuesta inflamatoria sistémica o en síndromes de disfunción multiorgánica (Halladin, 2015; Miranda et al., 2018).

El control del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria resultan claves para el abordaje etiopatogénico de este proceso. Este control recae, en gran medida, en la modulación de vías de señalización intracelular, entre las que destacan el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y el factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Así mismo, mecanismos represores de la vía de transducción NF- κ B,

permite inducir una respuesta antiinflamatoria. Por otro lado, la activación del factor NrF2 resulta fundamental para la síntesis de agentes antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), sus enzimas relacionadas, como la glutatión peroxidasa (GPx) y otras enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), además de otras proteínas citoprotectoras imprescindibles para responder al estrés oxidativo (Meng et al., 2017).

Actualmente no existe un tratamiento estandarizado que pueda revertir los efectos del SIR mesentérica, excluyendo las terapias sintomáticas de mantenimiento (Derikx et al., 2018). En la última década se han llevado a cabo diversos estudios sobre el daño producido por el SIR en diferentes órganos y su posible prevención o reversión. Estos estudios han demostrado que determinados sistemas antioxidantes celulares, como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa (CAT) son capaces de prevenir los efectos adversos de ROS asociados a SIR (Özkan, 2017).

Aunque los modelos animales siguen siendo imprescindibles para el desarrollo de nuevos tratamientos, los modelos *in vitro* basados en cultivos celulares proporcionan una forma de estudiar el efecto directo de un fármaco sobre las células, a la vez que se aíslan o controlan los factores externos (Chen & Vunjak-Novakovic, 2018).

Para simular las condiciones isquémicas *in vitro*, las células se cultivan en soluciones salinas deficientes en sustratos orgánicos con el objetivo de privar de glucosa y nutrientes a las células. Así mismo, los cultivos se introducen en una cámara hermética con una atmósfera hipóxica (Chen & Vunjak-Novakovic, 2018; Yang & Xie, 2021; Wang et al., 2020).

En los modelos animales la duración de la isquemia suele ser corta y bien definida; sin embargo, los tiempos necesarios para lograr una isquemia *in vitro* no están bien definidos, existiendo una gran variabilidad entre diferentes estudios (Chen & Vunjak-Novakovic, 2018).

La reperfusión en el ámbito clínico consiste en restablecer el flujo sanguíneo para restaurar el transporte de nutrientes y oxígeno en el tejido isquémico, además de deshacerse de los desechos metabólicos. *In vitro*, este proceso se simula cambiando el medio de privación de nutrientes por un medio de cultivo completo, y continuando el cultivo de las células en condiciones de normoxia (Chen & Vunjak-Novakovic, 2018; Yang & Xie, 2021; Wang et al., 2020).

Este modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa, y reperfusión (OGD/R, *Oxygen and Glucose Deprivation/Reperfusion*) ha sido utilizado con considerable éxito para replicar el síndrome de Isquemia/Reperusión mesentérica y probar la efectividad de distintos tratamientos (Yang & Xie, 2021; Wang et al., 2020; Liu et al., 2017; Li et al. 2017; Shen et al., 2016).

2. Objetivos

En este contexto, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un modelo de daño celular por isquemia/reperfusión *in vitro*, basado en OGD/R. En un futuro, este modelo debería servir para evaluar la eficacia terapéutica de distintos fármacos o tratamientos.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos secundarios: *i)* evaluar el efecto de la privación de oxígeno y de glucosa, de manera independiente y asociados, sobre la viabilidad celular y los niveles de ROS intracelulares en células de la línea IEC-6, *ii)* evaluar el efecto de la restauración de la glucosa y el oxígeno sobre la viabilidad celular y los niveles de ROS de células de la línea IEC-6 y, finalmente, *iii)* determinar la duración de los periodos de OGD/R que produzcan un daño potencialmente reversible mediante tratamiento farmacológico.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivos celulares

Los ensayos de este trabajo se realizaron con células de la línea IEC-6 (CRL-1592, American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Esta línea deriva de células del epitelio intestinal de *Rattus norvegicus* y expresan antígenos característicos de este tipo de epitelio. Además, es el modelo de referencia para estudiar el síndrome de isquemia/reperfusión intestinal *in vitro* (Li et al., 2017; Liu et al., 2017; Shen et al., 2016; Wang et al., 2020).

El mantenimiento del cultivo se realizó en frascos T-75 (Standard, Sarstedt, Alemania) a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ y humedad a saturación. El medio utilizado fue DMEM (*Dubelcco's modified Eagle medium*, Gibco, EE. UU.), suplementado con piruvato sódico 1 mM, GlutaMAX 2 mM, 0,1 U/mL de insulina bovina (Sigma-Aldrich, EE. UU.), 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza, Bélgica) y 10% de suero bovino fetal (FBS, Biochrom, Alemania).

Se realizaron subcultivos al 80% de confluencia. Para ello, las células se recolectaron mediante Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, EE. UU.), centrifugación a 450 g y siembra a una densidad de $2 \cdot 10^3$ células/cm².

3.2. Cuantificación de la viabilidad celular

3.2.1. PrestoBlue™

El reactivo PrestoBlue™ (Invitrogen, EE. UU.) está basado en la resazurina, un colorante azul ($\lambda_{\max}=600$ nm) que es reducido por enzimas del citoplasma de las células viables a resorufina, de color rojo ($\lambda_{\max}=570$ nm).

Para medir la viabilidad celular en placa de 96 pocillos (Standard, Sarstedt, Alemania), se añadieron 10 µL del reactivo sobre el medio de cada pocillo a medir y se incubaron a 37°C y en oscuridad durante 2 h. Después se realizó la medida de la absorbancia en lector de placas (Synergy HT, Bio-Tek, EE. UU.) a 570 y 600 nm, de acuerdo con el protocolo de la sonda.

3.2.2. MTT

El reactivo MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, EE. UU.) produce una solución de color amarillo que es convertida a formazán, de color azul oscuro ($\lambda_{\max}=570$ nm), mediante deshidrogenasas mitocondriales en las células vivas.

Para cuantificar la viabilidad celular en placa de 96 pocillos se añadieron 10 μ L de una solución de MTT (5 mg/mL en PBS) sobre el medio de los pocillos a medir y se incubaron a 37°C durante 3 h. Pasado el periodo de incubación, se sustituyó el medio de los pocillos por 100 μ L de DMSO y se incubaron 3-5 min en oscuridad para disolver los cristales de formazán. Después se midió la absorbancia a 570 nm en lector de placas.

3.2.3. Selección del método de medición de viabilidad celular

Se realizó un ensayo con células de la línea IEC-6 para determinar cuál de estos dos métodos era el más apropiado para las condiciones experimentales diseñadas, así como los medios utilizados: medio completo (DMEM) como medio de cultivo control y HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*, Gibco, EE. UU.) como medio de privación de glucosa y sustratos metabólicos (Yang & Xie, 2021; Liu et al., 2017; Li et al. 2017).

En una placa de 96 pocillos se sembraron por quintuplicado $3 \cdot 10^3$ células/pocillo en 100 μ L de medio completo. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C para permitir la adecuación de las células al cultivo y, posteriormente, se les cambió el medio de siembra por 100 μ L de medio DMEM o HBSS. También se dispusieron cinco pocillos adicionales con 100 μ L de DMEM o HBSS como blancos. Se incubaron durante 3 h a 37°C para permitir la adaptación de las células al nuevo medio y después se cuantificó la viabilidad celular mediante los métodos PrestoBlue™ y MTT, de la forma descrita previamente.

3.2.4. Curvas de calibración

Se elaboraron unas curvas de calibración para conocer la relación entre la densidad celular y la absorbancia obtenida mediante el reactivo PrestoBlue™ en medio estándar (DMEM) y medio de privación de glucosa (HBSS).

Para ello, en placa de 96 pocillos, se sembraron diluciones seriadas de $4 \cdot 10^4$ a 10^3 células/pocillo por quintuplicado en 100 μ L de DMEM. Se incubaron las placas durante 1 h a 37°C para permitir la adhesión de las células y posteriormente se les cambió el medio de siembra por 100 μ L de medio DMEM o HBSS. También se dispusieron cinco pocillos adicionales con 100 μ L de DMEM o HBSS como blancos. Se incubaron durante 1

h para permitir la adaptación de las células al nuevo medio y después se cuantificó la viabilidad celular mediante el método PrestoBlue™.

3.3. Cuantificación de los niveles de ROS

Un alto nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) es una característica fundamental del síndrome de isquemia/reperfusión. Para cuantificar los niveles de ROS intracelulares se empleó diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA, Invitrogen, Life technologies, Reino Unido). Este reactivo penetra en la célula, es deacetilado por esterasas y después es oxidado por ROS a 2,7-diclorofluoresceína, que es altamente fluorescente ($\lambda_{ex}=485$ nm, $\lambda_{em}=535$ nm).

Para cuantificar los niveles intracelulares de ROS en placa de 96 pocillos, se desechó el medio de los pocillos a medir, se lavaron con 100 μ L de PBS y se añadieron 100 μ L de DCF-DA (50 μ M en PBS). A los blancos se les añadió 100 μ L de PBS. Tras incubar la placa a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos, se aspiró el reactivo de los pocillos, se lavaron una vez más con PBS y se les aplicó el tratamiento correspondiente. Pasado este periodo, se midió la fluorescencia de los pocillos en lector de placas a $\lambda_{ex}=485$ nm y $\lambda_{em}=528$ nm.

3.4. Determinación de la densidad óptima de siembra

Para determinar la densidad óptima de siembra de las células IEC-6 se realizó un ensayo de proliferación utilizando densidades crecientes de células.

Así, en placa de 96 pocillos, se sembraron cuatro pocillos por densidad celular ($6 \cdot 10^3$, $4 \cdot 10^3$, $3 \cdot 10^3$ y $2 \cdot 10^3$ células/pocillo) y tiempo de cultivo (0, 24, 48 y 72 h) en 100 μ L de medio completo. También se dispusieron cuatro pocillos adicionales por tiempo con 100 μ L de medio como blanco, para poder normalizar la absorbancia.

Tras la siembra, se incubaron las placas a 37°C durante 24 h para permitir la adaptación de las células al cultivo y se tomó la primera medida de viabilidad (0 h) de la forma descrita en el apartado 3.2.1. Se tomaron medidas sucesivas a las 24, 48 y 72 h posteriores para cuantificar la proliferación celular, como se expresa en el diagrama de la Figura 1.

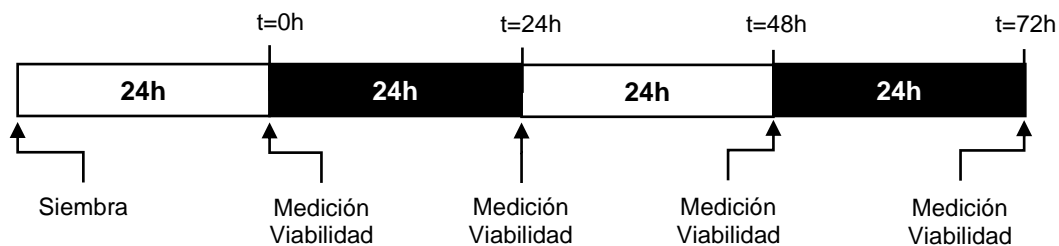


Figura 1. Esquema del ensayo de proliferación para determinar la densidad óptima de siembra.

3.5. Inducción de estrés oxidativo mediante privación de glucosa y tratamiento con H_2O_2

En placas de 96 pocillos, se sembraron cinco pocillos por condición experimental con $3 \cdot 10^3$ células/pocillo en 100 μ L de medio completo. Se usó una placa para la medición de viabilidad y otra para ROS. En la placa de ROS se sembraron cinco pocillos adicionales por condición como blanco. En la placa de viabilidad, sin embargo, solo se añadió medio (HBSS o DMEM) como blanco. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C para permitir la adecuación de las células al cultivo.

Como se muestra en la Figura 2, en primer lugar, los pocillos de la placa de ROS se trataron con DCF-DA de la forma descrita en el apartado 3.3. Después se añadieron 100 μ L de HBSS (privación de glucosa) o medio completo (control). Adicionalmente, para inducir un estrés oxidativo, se añadieron 10 μ L de H_2O_2 diluido en PBS para alcanzar una concentración final de 0,1 mM en el pocillo o 10 μ L de PBS como control. Al mismo tiempo, para estudiar el efecto de los tratamientos sobre la proliferación, se cambió el medio de los pocillos de la placa de viabilidad por DMEM o HBSS y se les añadió H_2O_2 o PBS según se ha descrito previamente.

Tras 1 h de tratamiento con H_2O_2 y HBSS se cuantificaron los niveles de ROS y se sustituyó el medio de los pocillos de la placa de viabilidad por medio completo para eliminar el H_2O_2 y restaurar la glucosa. La placa de viabilidad se incubó durante 24 h a 37°C, y después se midió la viabilidad celular.

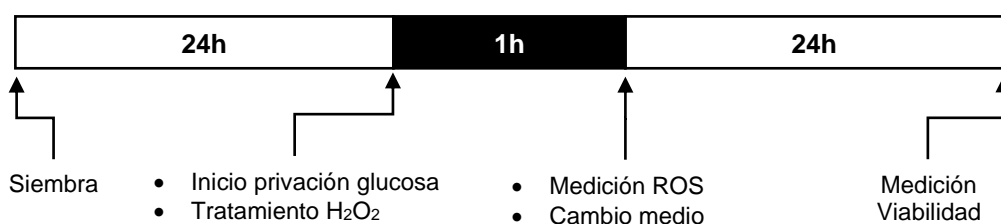


Figura 2. Esquema del ensayo de privación de glucosa e inducción de estrés oxidativo con H_2O_2 .

3.6. Privación de oxígeno y glucosa y reperusión

Para simular el proceso de isquemia/reperusión (SIR) *in vitro*, se ha empleado un modelo de privación de oxígeno y glucosa y reperusión (OGD/R, *Oxygen and Glucose Deprivation/Reperfusion*). Este modelo consta de dos fases: un periodo de privación de oxígeno y glucosa, análogo de una situación de isquemia, seguido de otro periodo en el que se restauran el oxígeno y los sustratos metabólicos, para simular la fase de reperusión del SIR (Yang & Xie, 2021; Liu et al., 2017; Li et al. 2017).

En primer lugar, se sembraron cinco pocillos por condición experimental con $3 \cdot 10^3$ células/pocillo en 100 μ L de medio completo. Se utilizaron placas distintas para la medición de ROS y viabilidad, en hipoxia y en normoxia, por lo que se sembraron un total de cuatro placas. En las placas de ROS se sembraron cinco pocillos adicionales por condición como blanco, para poder restar la autofluorescencia de las células. En las placas de viabilidad solo se añadió medio (HBSS o DMEM) como blanco. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C para permitir la adhesión celular.

Antes del periodo de OGD, como se muestra en la Figura 3, los pocillos de la placa de ROS se trataron con DCF-DA de la forma descrita en el apartado 3.3. Después se les añadió 100 μ L de HBSS, para inducir una privación de glucosa, o medio completo como control. En las placas de hipoxia, los pocillos vacíos se llenaron con 100 μ L de PBS para mantener la humedad en la placa y evitar la evaporación del medio. Para provocar la privación de oxígeno, las placas se incubaron durante 4 o 24 h en una incubadora con atmósfera de nitrógeno a 37 °C, o en una incubadora convencional en normoxia como control. Pasado el periodo de OGD, se cuantificaron la viabilidad celular y los niveles de ROS. En el ensayo realizado con 24 h de hipoxia la viabilidad se estudió mediante tinción con azul tripán 0,04% (Gibco, EE. UU.).

Posteriormente, se incubaron los pocillos correspondientes al periodo de reperusión con el reactivo DCF-DA para cuantificar la generación de ROS durante este periodo. Después, se sustituyó el medio los pocillos por DMEM para restaurar la glucosa y los nutrientes, y se incubaron las placas en una incubadora convencional a 37 °C para permitir la reoxigenación. Tras 1 h desde el inicio de la reperusión, se midieron los niveles de ROS intracelulares y, al día siguiente, se midió la viabilidad celular.

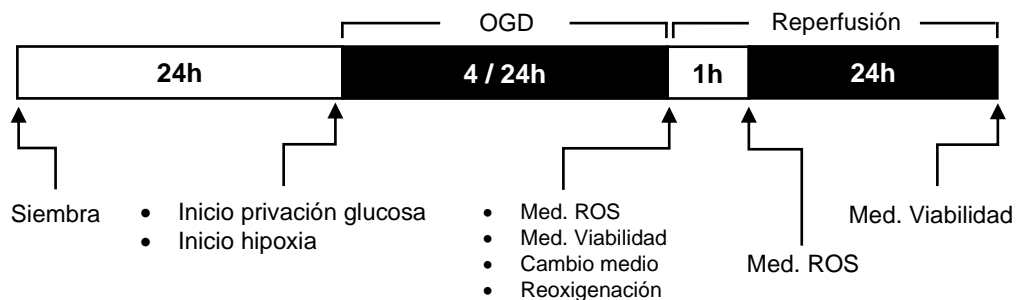


Figura 3. Esquema de los ensayos de privación de oxígeno y glucosa y reperfusión.

3.7. Análisis de los datos

Los datos se analizaron mediante Microsoft Excel 2021 y Python Anaconda 4.11. Las figuras se hicieron utilizando el paquete Matplotlib 3.5.1 para Python y para el análisis estadístico se utilizó el paquete SciPy 1.7.3.

Los datos de absorbancia obtenidos en las mediciones de viabilidad celular se procesaron como indica el protocolo del reactivo PrestoBlue™: primero se restó la absorbancia de 600 nm a la de 570 nm para cada pocillo. Posteriormente, se restó la media de la absorbancia de los blancos a la absorbancia de cada pocillo, para obtener así las absorbancias normalizadas respecto al blanco. Los valores de absorbancia, representativos de la viabilidad celular, se representaron como la media de los pocillos \pm su desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$). Alternativamente, se relativizó la viabilidad de los tratamientos al control: se dividió la absorbancia de cada pocillo entre la media del control y se representó la media y la desviación de los valores relativizados. Los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo con MTT se procesaron de la misma forma, pero sin restar la absorbancia a 600 nm.

En cuanto a la medición de ROS intracelulares, se restó la media de la fluorescencia de los blancos a la fluorescencia de cada pocillo para desprejar la autofluorescencia de la placa, las células y el medio. Al igual que con los valores de viabilidad, se representaron los niveles de ROS relativizados: se dividió la fluorescencia de cada pocillo entre la media del control y se calculó la media y la desviación de los valores relativizados.

Con el fin de determinar la significancia estadística de los resultados obtenidos, se utilizó la prueba *t* de Student para comparar la media de las distintas muestras. El umbral de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Selección del método para la medición de la viabilidad celular

MTT y PrestoBlue™ son dos reactivos ampliamente utilizados para medir la viabilidad celular, basados en la medida de la actividad metabólica de las células; sin embargo, al no ser una medida directa del número de células, pueden existir factores dependientes del tipo celular empleado que hacen que los valores de viabilidad se puedan ver afectados por otras variables. Por tanto, se realizó un ensayo con células de la línea IEC-6 para determinar cuál de estos dos métodos era el más apropiado para las condiciones experimentales diseñadas, DMEM como medio de cultivo control y HBSS como medio de privación de glucosa.

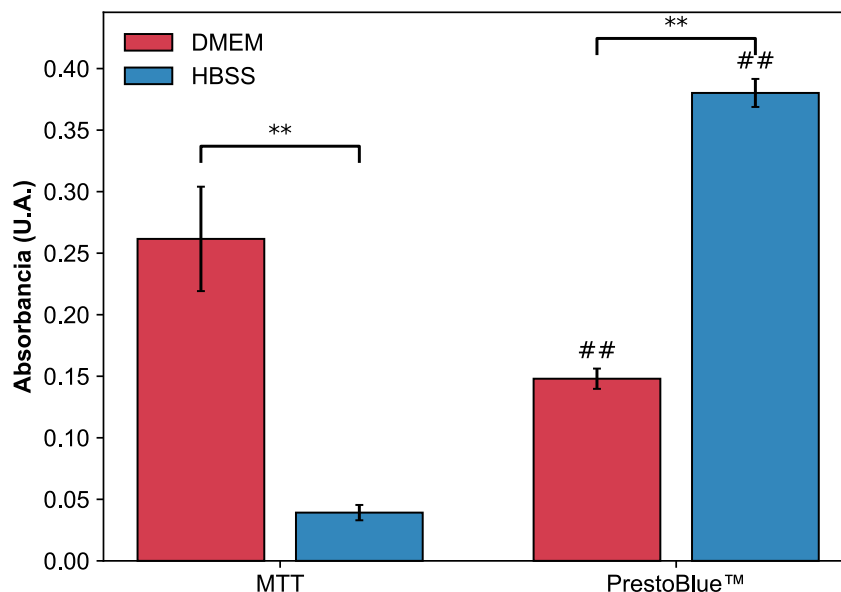


Figura 4. Medidas de absorbancia (U.A.) de células IEC-6 mantenidas en DMEM o HBSS durante 3 h, utilizando MTT y PrestoBlue™. $\bar{X} \pm DE$ (n=5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Diferencia respecto MTT: # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$.

Como se observa en la Figura 4, existe una diferencia significativa ($p < 0,0005$) entre los datos de absorbancia obtenidos con DMEM y HBSS, tanto utilizando MTT como utilizando PrestoBlue™. Así mismo, se puede observar que los valores de absorbancia obtenidos con el método MTT y PrestoBlue™ difieren de forma más evidente cuando se utiliza el medio HBSS. De hecho, el método MTT parece que infravalora los resultados de absorbancia cuando se utiliza el medio de cultivo HBSS, lo que dificultaría considerablemente ver el efecto de un tratamiento sobre un valor de absorbancia tan bajo.

Por ello, se decidió utilizar el reactivo PrestoBlue™ para medir la viabilidad celular en los ensayos posteriores y corregir los valores de absorbancia en HBSS mediante una curva de calibración.

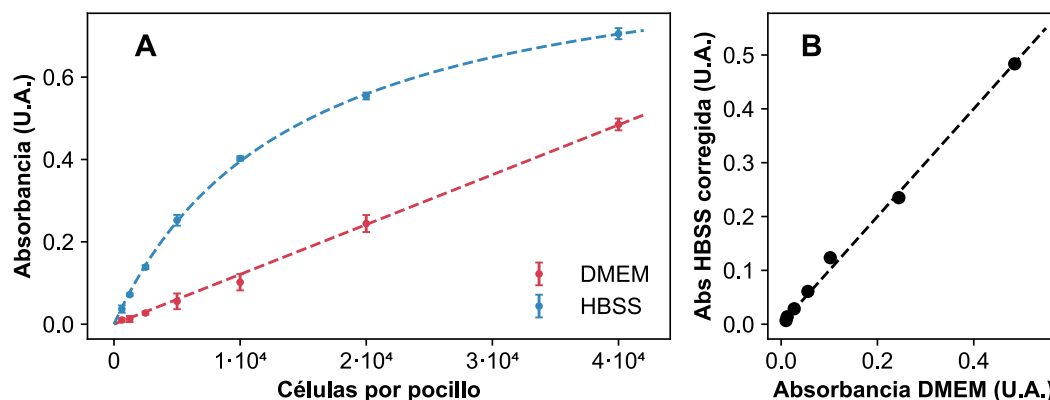


Figura 5. Curvas de calibración para la cuantificación de la viabilidad de células IEC-6 en DMEM y HBSS. Se muestra la absorbancia (U.A.) obtenida mediante ensayo PrestoBlue™ para un rango de células/pocillo (A). $\bar{X} \pm DE$ (n=5). Después se representó la absorbancia en HBSS corregida mediante las curvas de calibración frente a la absorbancia en DMEM real para la misma densidad celular (B).

Como puede observarse en la Figura 5A, los valores de absorbancia medidos en DMEM son proporcionales al número de células sembradas. Sin embargo, la absorbancia de las células mantenidas en HBSS es considerablemente mayor y no es proporcional al número de células, sobre todo a densidades celulares altas.

Para corregir la discrepancia entre los dos medios de cultivo, se realizó una regresión lineal para los valores de absorbancia en DMEM y una regresión no lineal para los de HBSS. Después, se resolvió el sistema de ecuaciones formado por ambas regresiones para obtener una función matemática que relacionara la absorbancia en DMEM con la absorbancia en HBSS. Esta expresión se utilizó para corregir los valores obtenidos en HBSS a la misma escala que las absorbancias en DMEM.

$$A_{\text{corregida}} = A_{\text{DMEM}} = \frac{0,169 \cdot A_{\text{HBSS}}}{0,953 - A_{\text{HBSS}}}$$

Finalmente, para evaluar la precisión de la función de corrección anterior, se representaron los valores de absorbancia de HBSS corregidos frente a los valores de absorbancia en DMEM para cada densidad celular y se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,998$ (Figura 5B).

4.2. Determinación de la densidad óptima de siembra.

Se realizó un ensayo de proliferación para estudiar el efecto de la densidad de siembra en la cinética de proliferación y determinar la densidad óptima de siembra para los ensayos posteriores.

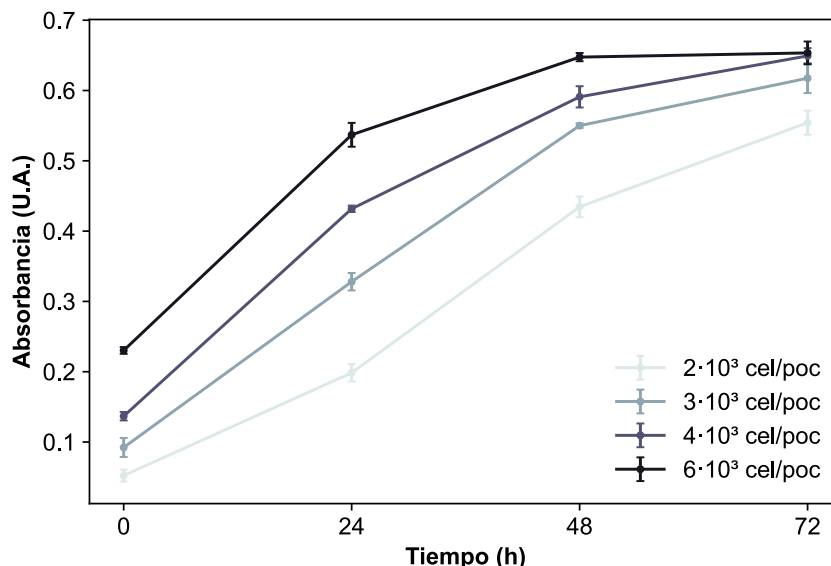


Figura 6. Ensayo de proliferación de células IEC-6. Se muestra la evolución de la absorbancia (U.A.) en el tiempo (h) de muestras sembradas con distinto número de células/pocillo. $\bar{X} \pm DE$ (n=4).

Como puede observarse en la Figura 6, existe una relación directa entre el número de células sembrado y la absorbancia obtenida a lo largo del tiempo. Así mismo, todos los cultivos mostraron crecimiento exponencial durante las primeras 24 h. Sin embargo, a medida que los cultivos se aproximaron a la confluencia, la proliferación se redujo considerablemente, alcanzando la fase estacionaria. De hecho, en los cultivos sembrados con $6 \cdot 10^3$ células/pocillo no hubo proliferación durante las últimas 24 h del cultivo, mientras que, en el otro extremo, la muestra de $2 \cdot 10^3$ células/pocillo no había alcanzado la fase estacionaria a las 72 h.

Es de destacar que los pocillos sembrados con $3 \cdot 10^3$ células/pocillo mostraron un rápido crecimiento a lo largo de todo el ensayo. Por esta razón, se seleccionó esta densidad de siembra para realizar los ensayos posteriores.

4.3. Modelo de inducción de estrés oxidativo por privación de glucosa y tratamiento con H₂O₂ en células IEC-6

Antes de pasar al modelo definitivo con privación de oxígeno y glucosa, se realizó un ensayo para estudiar el efecto del estrés oxidativo inducido y la privación de glucosa

sobre la viabilidad celular y los niveles de ROS. Se utilizó H_2O_2 para inducir un estrés oxidativo controlado y así validar el protocolo de medición de ROS intracelulares.

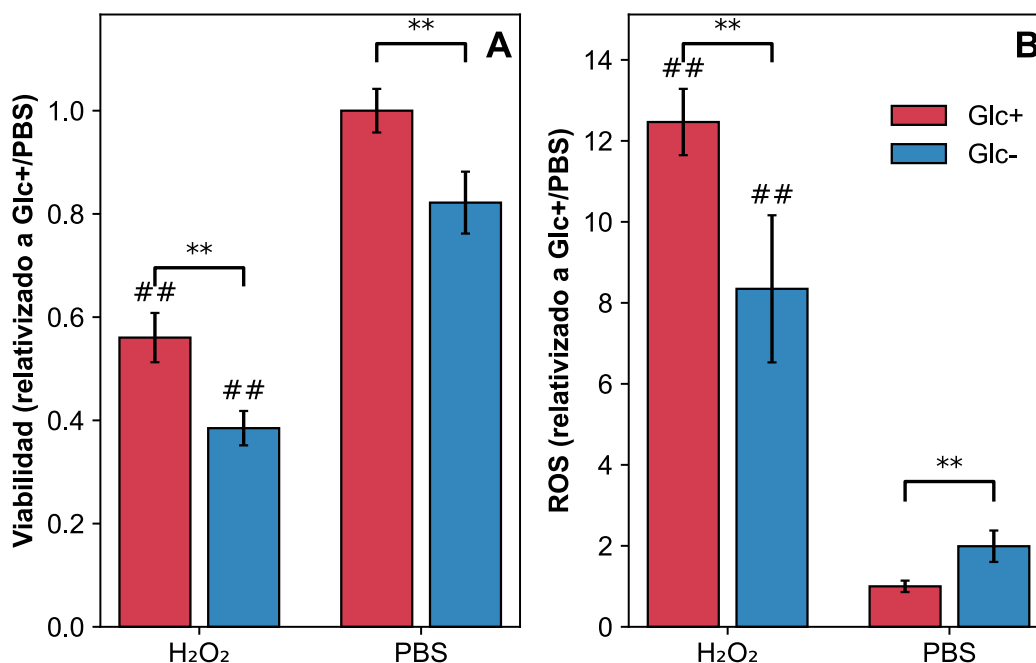


Figura 7. Viabilidad (A) y ROS intracelulares (B) de células IEC-6 sometidas a privación de glucosa y estrés oxidativo. Se muestran los ROS de células sometidas a 1 h de privación de glucosa (Glc-) y tratamiento con 0,1 mM H_2O_2 o vehículo (PBS) y su viabilidad 24 h después. $\bar{X} \pm DE$ (n=5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Diferencia respecto PBS: # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$.

En la Figura 7A se muestran los valores de viabilidad de células IEC-6 tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno y privación de glucosa. El tratamiento con 0,1 mM H_2O_2 supuso una disminución de la viabilidad del 44% respecto al control con glucosa y vehículo (Glc+/PBS). Por otra parte, la privación de glucosa también supuso una disminución significativa ($p < 0,005$) de la viabilidad respecto al control. En conjunto, el tratamiento con peróxido y privación de glucosa (Glc-/ H_2O_2) supuso una disminución del 61%.

En cuanto a los niveles de ROS intracelulares (Figura 7B), el tratamiento con peróxido supuso un aumento de hasta 12 veces con respecto al control. La privación de glucosa también supuso un aumento de los ROS intracelulares ($p < 0,005$), doblando los valores del control. Sin embargo, los cultivos con el tratamiento combinado de privación de glucosa y H_2O_2 mostraron menos ROS que los sometidos únicamente al peróxido de hidrógeno ($p < 0,005$).

4.4. Privación de oxígeno y glucosa y reperusión (OGD/R) en células IEC-6

Una vez establecidas la metodología de medición de viabilidad y ROS, y seleccionada la densidad de siembra, se procedió a optimizar los tiempos de privación de oxígeno y glucosa.

Con el objetivo de determinar las condiciones que provocaran el máximo daño posible por OGD, se sometieron células IEC-6 a un periodo de 24 h de privación de oxígeno y glucosa.

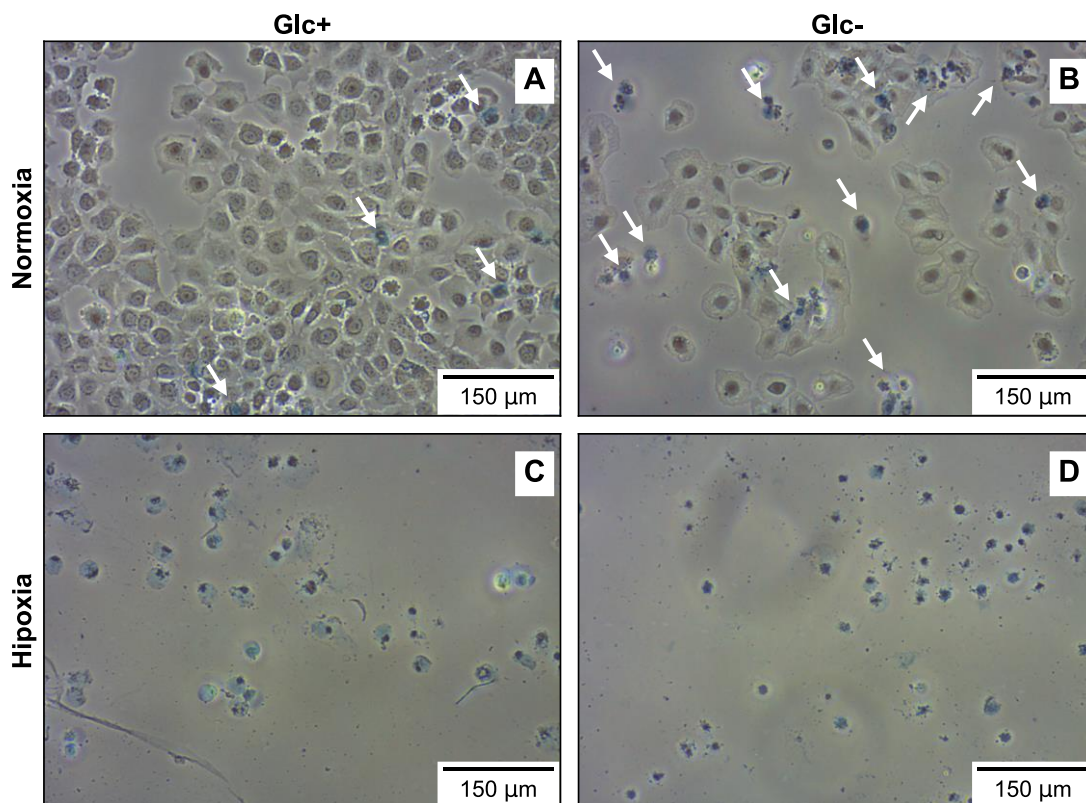


Figura 8. Micrografías de contraste de fases de células IEC-6 tras 24 h de privación de oxígeno y glucosa. (A)-Control, (B)-Privación de glucosa, (C)-Privación de oxígeno, (D)-Privación de oxígeno y glucosa. Tinción con azul tripán para mostrar la viabilidad.

Tras 24 h de cultivo, las células control (Glc+/Normoxia) proliferaron con normalidad y la tinción con azul tripán reveló escasas células muertas (Figura 8A). Sin embargo, tras 24 h de privación de glucosa (Glc-/Normoxia) se observó una reducción de la densidad celular en el cultivo y la presencia de numerosas células que habían incorporado colorante azul, lo que demuestra una ausencia de viabilidad (Figura 8B). Además, las escasas células viables mostraban variaciones morfológicas como el ensanchamiento del citoplasma, la presencia de fibras de estrés y el núcleo condensado. Por último, en los cultivos sometidos a 24 h de hipoxia no se encontró ninguna célula viable,

independientemente de que las células se hubieran mantenido en medio completo o en situación de privación de glucosa (Figura 8C y D).

Una vez determinadas las condiciones que provocaron el máximo daño posible, se decidió reducir el tiempo de OGD para encontrar un mejor equilibrio entre el daño producido y la probabilidad de recuperación de las células tras la reperfusión al aplicar un tratamiento. Se estableció un periodo de hipoxia y privación de glucosa de 4 h de duración y un periodo de reperfusión de 24 h.

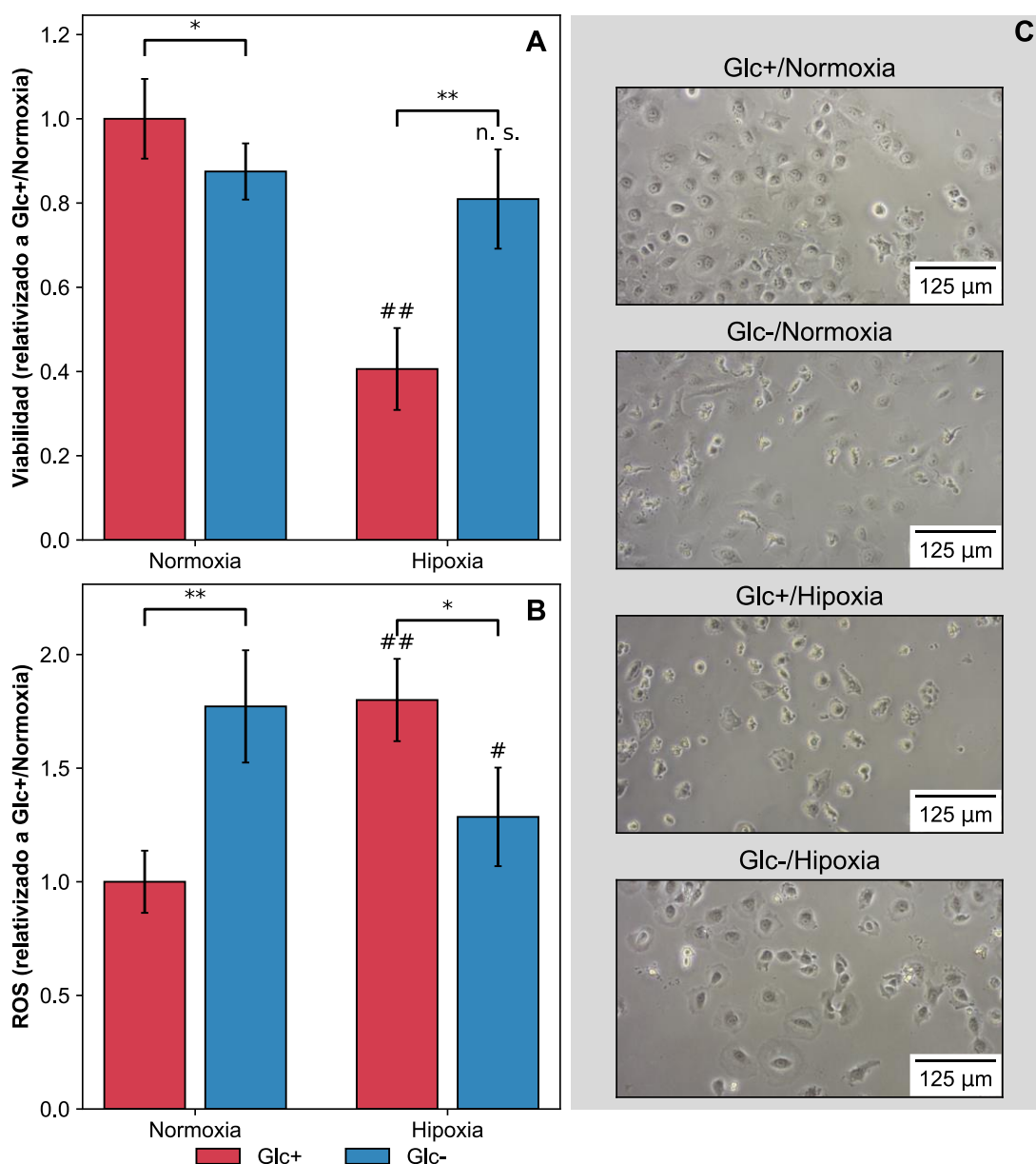


Figura 9. Ensayo de privación de oxígeno y glucosa en células IEC-6. Se muestran la viabilidad (A), los niveles de ROS intracelulares (B) y micrografías de contraste de fases de células IEC-6 (C) inmediatamente después del periodo de OGD. $\bar{X} \pm \text{DE}$ (n=5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Diferencia respecto normoxia: # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$.

La Figura 9 muestra la viabilidad celular, los niveles de ROS y la morfología de los cultivos inmediatamente después de someter a las células IEC-6 al periodo de hipoxia y privación de glucosa.

La privación de oxígeno supuso una pérdida de viabilidad del 59% con respecto al control en normoxia (Figura 9A); de hecho, en la imagen de las células sometidas a hipoxia (Glc+/Hipoxia) se observa una pérdida de adhesión celular al sustrato (Figura 9C). Por otro lado, la población celular mantenida en condiciones de normoxia y privación de glucosa también mostró una disminución de la viabilidad celular ($p < 0,05$), aunque de menor magnitud (13%). De hecho, no se observan grandes diferencias entre las micrografías de las células control (Glc+/Normoxia) y las privadas de glucosa.

No obstante, las células sometidas a privación de oxígeno y glucosa no mostraron una viabilidad significativamente distinta de las sometidas únicamente a privación de glucosa (Glc-/Normoxia) (Figura 9A). Además, no mostraban problemas de adhesión (Figura 9C), a diferencia de los cultivos sometidos únicamente a hipoxia.

En la Figura 9B se puede observar que las células sometidas a hipoxia (Glc+/Hipoxia) mostraron niveles de ROS intracelulares 1,8 veces superiores las mantenidas en normoxia. Al mismo tiempo, la privación de glucosa (Glc-/Normoxia) también provocó un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ROS ($p < 0,05$). Sin embargo, la población celular sometida a privación de oxígeno y glucosa mostró unos niveles de ROS inferiores a las privadas únicamente de glucosa (Glc-/Normoxia) u oxígeno (Glc+/Hipoxia) ($p < 0,05$).

Una vez determinado el daño por hipoxia y privación de glucosa, se analizó el efecto de la restauración de las condiciones basales de cultivo, equivalente al periodo de reperfusión *in vivo*. Transcurridas 1 y 24 horas, se volvieron a analizar los parámetros anteriores.

Como puede observarse en la Figura 10C, todos los cultivos mostraron proliferación en las 24 h posteriores a la restauración de las condiciones basales. Sin embargo, como se muestra en la Figura 10A, se mantuvieron las diferencias de viabilidad celular observadas tras el periodo de privación. Por un lado, las células sometidas a hipoxia siguieron mostrando menos viabilidad que las de control (Glc+/Normoxia) ($p < 0,0005$), pudiéndose observar, además, un mayor número de células muertas (Figura 10C). Por otro, la viabilidad de las células sometidas a la privación de glucosa fue un 30% inferior al control. No obstante, la viabilidad de las células sometidas a privación de oxígeno y

glucosa siguió siendo similar a la de las tratadas únicamente con medio de baja glucosa y, a su vez, superior a las sometidas únicamente a hipoxia ($p < 0,05$).

Los niveles de ROS intracelulares se volvieron a cuantificar 1 h después de la restauración del oxígeno y la glucosa (Figura 10B), pero en este periodo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los distintos grupos experimentales.

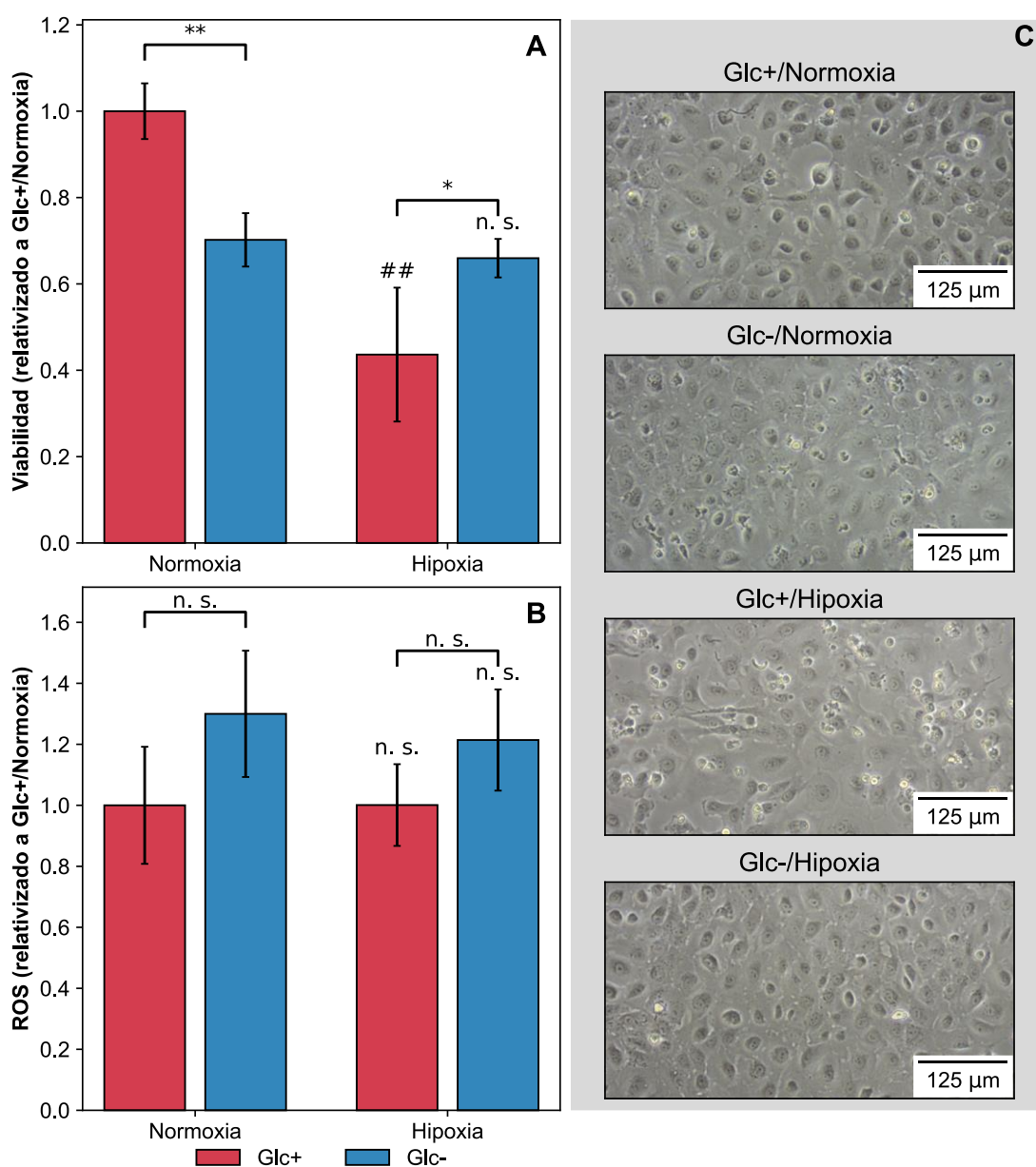


Figura 10. Ensayo de privación de oxígeno y glucosa y reperusión en células IEC-6. Se muestran la viabilidad celular (A) e imágenes de contraste de fases (C) de células IEC-6 sometidas a OGD y 24 h de reperusión. Se muestran los niveles de ROS intracelulares 1 h después del inicio de la reperusión. $\bar{X} \pm$ DE (n=5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Diferencia respecto normoxia: # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$.

5. Discusión

El objetivo de este trabajo ha sido diseñar un modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión mesentérica aplicado a células de la línea IEC-6. Los primeros pasos consistieron en validar los protocolos para la medición de ROS y viabilidad celular, dos marcadores habituales en los modelos *in vitro* de isquemia reperfusión (Yang & Xie, 2021; Wang et al., 2020).

Para ello, en primer lugar, se compararon dos métodos de medición de viabilidad celular, ambos basados en la actividad metabólica de las células: MTT y PrestoBlue™. El método MTT subestimó significativamente la viabilidad de las células mantenidas en medio de privación de glucosa (HBSS) respecto a las mantenidas en medio estándar ($p < 0,0005$), lo que dificultaría cuantificar el efecto de un tratamiento debido a la baja sensibilidad. El método PrestoBlue™ también mostró valores de absorbancia significativamente diferentes entre las células mantenidas en DMEM y HBSS, pero con una sensibilidad mucho mayor. Este hecho demuestra la importancia de comprobar la validez de distintos métodos para unas condiciones experimentales concretas. Esta situación es especialmente relevante en el caso de los métodos indirectos, como la cuantificación de la viabilidad celular basada en la actividad metabólica, en los que puede haber factores externos que alteren los resultados (Quent et al., 2010). Para el resto del trabajo se decidió continuar con el método PrestoBlue™ y corregir la discrepancia entre la absorbancia en DMEM y HBSS mediante unas curvas de calibración.

Así, se sembraron distintas densidades celulares y, tras cambiar el medio de siembra por DMEM o HBSS, se cuantificó su viabilidad celular. Se realizó una regresión lineal para la absorbancia en DMEM y una regresión no lineal para HBSS. Ambas regresiones mostraron un excelente ajuste a los datos experimentales. Tras resolver el sistema de ecuaciones formado por ambas ecuaciones se obtuvo una fórmula matemática para relacionar la absorbancia en HBSS con la absorbancia en DMEM teórica para la misma densidad celular. Al aplicar dicha fórmula de corrección a los valores de absorbancia obtenidos en HBSS para cada densidad celular, se obtuvieron unos valores extremadamente similares a los medidos en DMEM, con una correlación de $R^2 = 0,998$.

Después se realizó un ensayo de proliferación para estudiar el efecto de la densidad de siembra sobre la cinética proliferativa de las células IEC-6 durante 72 h de cultivo, y así determinar la densidad óptima de siembra. Los resultados obtenidos mostraron claras diferencias entre las cinéticas de proliferación de las muestras sembradas a distintas

densidades celulares. Se encontró que la densidad de siembra de $3 \cdot 10^3$ células/pocillo mostraba un rápido crecimiento desde la siembra hasta alcanzar la confluencia a las 72 h. Estas condiciones son ideales para estudiar el efecto de un tratamiento sobre la proliferación, y por tanto se utilizó esta densidad de siembra en los ensayos posteriores.

Se procedió a determinar el efecto de la inducción de estrés oxidativo por privación de glucosa y tratamiento con peróxido de hidrógeno sobre células IEC-6. El peróxido supuso una disminución de la viabilidad del 44% y la privación de glucosa del 18% respecto al control (Glc+/PBS). El tratamiento combinado Glc-/H₂O₂ supuso una disminución del 61%, por lo que parece que la privación de glucosa y el tratamiento con peróxido tuvieron un efecto sumatorio sobre la viabilidad.

También se cuantificaron los niveles intracelulares de ROS. Como era de esperar, el peróxido de hidrógeno provocó un enorme aumento de hasta 12 veces los niveles de ROS del control. La privación de glucosa también provocó un modesto aumento de los niveles de ROS ($p < 0,005$). Otros autores también han encontrado un aumento de ROS provocado por la privación de glucosa (Owada et al., 2013), en este caso, la baja concentración de sustratos metabólicos parece activar la fosforilación oxidativa, lo que aumenta la generación de ROS en la mitocondria (Aykin-Burns et al., 2009; Liu et al., 2003). Además, las células tumorales parecen ser más susceptibles a este tipo de estrés oxidativo que las células normales (Aykin-Burns et al., 2009). Al tratarse de células inmortalizadas, las células IEC-6 podrían mostrar un comportamiento similar al de células tumorales.

Paradójicamente, el tratamiento combinado de H₂O₂ y privación de glucosa no tuvo el efecto sumatorio que se observaba sobre la viabilidad celular, sino que mostró 33% menor cantidad de ROS que el tratamiento único de H₂O₂. Esto podría deberse a que había menos células viables en la muestra y, por tanto, la generación de ROS era menor.

Tras haber validado toda la metodología, se realizó un primer ensayo de privación de oxígeno y glucosa y reperfusión (OGD/R). Con el objetivo de determinar las condiciones que provocaran el máximo daño posible por OGD, se sometieron células IEC-6 a un periodo de 24 h de privación de oxígeno y glucosa. Como era de esperar, esta duración resultó excesiva. Así, los cultivos mantenidos en medio con baja glucosa mostraban una densidad celular muy inferior a los cultivos con medio completo, y las células encontradas presentaban una morfología compatible con sufrimiento celular (Tojkander et al., 2012). En cuanto a los cultivos sometidos a 24 h de hipoxia, no se encontró ninguna célula viable, indistintamente del medio de cultivo utilizado.

Finalmente, una vez determinadas las condiciones que provocaron el máximo daño posible, se realizó un nuevo ensayo con un periodo de hipoxia y privación de glucosa de 4 h de duración y un periodo de reperfusión de 24 h. De esta forma, se esperaba encontrar un mejor equilibrio entre el daño producido y la probabilidad de recuperación de las células al aplicar un tratamiento.

Tras 4 h de privación de glucosa, la viabilidad celular disminuyó significativamente respecto al control ($p < 0,05$). Las células sometidas a hipoxia mostraron una viabilidad aún menor (41% del control), pero las células mantenidas en medio de privación de glucosa, además de hipoxia, mostraron mayor viabilidad que las sometidas únicamente a hipoxia ($p < 0,0005$). No obstante, hay que tener en cuenta que el método utilizado para la medición de viabilidad mostraba distinta sensibilidad dependiendo del medio de cultivo, por lo que, pese a haber corregido los valores de viabilidad de los cultivos en medio de privación de glucosa mediante las curvas de calibración, la comparación entre Glc+ y Glc- está sujeta a cierta incertidumbre.

Los niveles de ROS intracelulares de los cultivos mantenidos privados de glucosa (Glc-/Normoxia) se vieron aumentados un 80% respecto al control, coincidiendo con el aumento de ROS observado en la muestra Glc-/PBS del ensayo de privación de glucosa y tratamiento con H₂O₂. La población celular sometida a hipoxia (Glc+/Hipoxia) también mostró un aumento considerable de los niveles de ROS respecto al control ($p < 0,0005$). La generación de ROS en hipoxia es un fenómeno controvertido y no se conocen bien sus mecanismos; sin embargo, parece contribuir a la estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), por lo que podría cumplir una función señalizadora importante (Bell et al., 2007; Clanton, 2007; Zepeda et al., 2013). No parece probable que un aumento de ROS de tal magnitud se deba a una rápida reoxigenación, ya que no transcurrieron más de 3 minutos desde el momento en que los cultivos fueron expuestos a condiciones de normoxia y la medida de fluorescencia.

Por último, las células sometidas al tratamiento completo con privación de oxígeno y glucosa también mostraron un incremento de ROS con respecto al control ($p < 0,05$), aunque significativamente menor que las sometidas únicamente a privación de oxígeno o de glucosa ($p < 0,05$). Sería lógico pensar que la generación de ROS asociada a la fosforilación oxidativa se viese inhibida en condiciones de hipoxia, lo que explicaría por qué se observaron menos niveles de ROS en Glc-/Hipoxia que en Glc-/Normoxia; sin embargo, esto no explica por qué también disminuyen los ROS respecto a las células mantenidas en normoxia y privación de glucosa.

A continuación, se restablecieron el oxígeno y la glucosa para simular la fase de reperfusión. Se volvieron a cuantificar los niveles de ROS intracelulares 1 h después, ya que la generación de ROS comienza justo en el momento en el que hay oxígeno disponible (Kalogeris et al., 2012). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ROS de las muestras. Los grupos de Wang (2020) y Yang y Xie (2021) obtuvieron grandes aumentos de ROS tras el periodo de reperfusión utilizando la misma línea celular y el mismo reactivo DCF-DA; no obstante, para cuantificar sus resultados utilizaron microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, en lugar de fluorimetría. Esta discrepancia podría resolverse relativizando los niveles de ROS obtenidos a los datos sobre viabilidad celular de los cultivos. Una vez realizado el cálculo (datos no aportados) sí que se observan niveles de ROS significativamente mayores en los cultivos sometidos a OGD/R, aunque este aumento sigue siendo considerablemente inferior a los valores reportados por otros autores (Wang et al., 2020; Yang y Xie, 2021).

El efecto de la reperfusión (OGD/R) se evaluó cuantificando la viabilidad celular transcurridas 24 h desde el daño inducido en los cultivos. Los resultados fueron similares a los obtenidos tras el periodo de OGD: hubo una importante disminución de la viabilidad celular (56%) en los cultivos sometidos a hipoxia (Glc+/Hipoxia) respecto a los control (Glc+/Normoxia). Por otra parte, la viabilidad de los cultivos mantenidos previamente en medio de baja glucosa disminuyó aún más respecto a los resultados obtenidos tras el periodo de OGD. Sin embargo, la viabilidad celular de las células sometidas a privación de oxígeno y glucosa siguió siendo significativamente mayor a las que sufrieron únicamente hipoxia ($p < 0,05$). Por lo tanto, parece que la privación de glucosa protegió contra el daño provocado por la hipoxia y la reperfusión.

Wen y colaboradores (2017) encontraron que cultivos de células IEC-6 sometidas a 4 h de OGD seguidas de 24 h de reperfusión mostraban una disminución de la viabilidad del 50% respecto al control, similar a los resultados obtenidos en este trabajo para las células sometidas únicamente a hipoxia.

Es probable que un periodo de reperfusión de menor tiempo, como el utilizado por otros grupos (Li et al., 2017; Liu et al., 2017; Yang & Xie, 2021), permita observar un mayor daño sobre la viabilidad, ya que en el curso de las 24 h de reperfusión las células probablemente hayan tenido tiempo de recuperarse, enmascarando el daño. Esto es especialmente probable teniendo en cuenta la rápida tasa de división de las células de la línea IEC-6.

6. Conclusión

En este trabajo se ha diseñado un modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión mesentérica aplicado a células de la línea IEC-6. Para ello, se ha estudiado el efecto de la privación de oxígeno y glucosa y su posterior restauración sobre la viabilidad celular y los niveles de ROS intracelulares.

Se ha determinado que un periodo de 4 h de privación de oxígeno o glucosa provocaban, por separado, un daño objetivable sobre la viabilidad de las células IEC-6 además de un aumento de los niveles intracelulares de ROS. Sin embargo, su efecto combinado no fue sumatorio.

24 h después de la restauración del oxígeno y la glucosa, la viabilidad celular de los cultivos sometidos a OGD disminuyó aún más respecto al control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de ROS de las muestras.

Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de buscar parámetros adicionales que permitan evaluar con mayor precisión el daño ocurrido en la reperfusión. Se proponen como han sugerido otros autores, la cuantificación del malondialdehído, la actividad de superóxido dismutasa, LDH, entre otros (Wang et al., 2020; Yang & Xie, 2021).

7. Bibliografia

- Aykin-Burns, N., Ahmad, I. M., Zhu, Y., Oberley, L. W., & Spitz, D. R. (2009). Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochemical Journal*, 418(1), 29-37. <https://doi.org/10.1042/BJ20081258>
- Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Schumacker, P. T., & Chandel, N. S. (2007). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Extension of the Replicative Life Span during Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 27(16), 5737-5745. <https://doi.org/10.1128/MCB.02265-06>
- Chen, T., & Vunjak-Novakovic, G. (2018). In vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 4(3), 142-153. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0056-0>
- Chen, Y., Xiong, S., Zhao, F., Lu, X., Wu, B., & Yang, B. (2019). Effect of magnesium on reducing the UV-induced oxidative damage in marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(6), 1253-1263. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36634>
- Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102(6), 2379-2388. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01298.2006>
- Halladin, N. L. (2015). Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries. *Danish Medical Journal*, 62(4).
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Chapter Six—Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. En K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 298, pp. 229-317). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Li, Y., Wen, S., Yao, X., Liu, W., Shen, J., Deng, W., Tang, J., Li, C., & Liu, K. (2017). MicroRNA-378 protects against intestinal ischemia/reperfusion injury via a mechanism involving the inhibition of intestinal mucosal cell apoptosis. *Cell Death & Disease*, 8(10), e3127-e3127. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.508>
- Liu, Y., Song, X.-D., Liu, W., Zhang, T.-Y., & Zuo, J. (2003). Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(1), 49-56. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00202.x>
- Liu, Z.-M., Zhang, X.-Y., Chen, J., Shen, J.-T., Jiang, Z.-Y., & Guan, X.-D. (2017). Terlipressin protects intestinal epithelial cells against oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation injury via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(1), 260-266. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4502>
- Meng, Q.-T., Chen, R., Chen, C., Su, K., Li, W., Tang, L.-H., Liu, H.-M., Xue, R., Sun, Q., Leng, Y., Hou, J.-B., Wu, Y., & Xia, Z.-Y. (2017). Transcription factors Nrf2 and NF-κB contribute to inflammation and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion in mice. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3170>
- Miranda, C. T. C. B. C. de, Fagundes, D. J., Miranda, E. de, Simões, R. S., & Taha, M. O. (2018). The role of ischemic preconditioning in gene expression related to inflammation in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 33, 1095-1102. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180120000007>

- Owada, S., Shimoda, Y., Tsuchihara, K., & Esumi, H. (2013). Critical Role of H₂O₂ Generated by NOX4 during Cellular Response under Glucose Deprivation. *PLoS ONE*, 8(3), e56628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056628>
- Özkan, N. (2017). Melatonin exhibit supportive effects on oxidants and anastomotic healing during intestinal ischemia reperfusion injury. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*. <https://doi.org/10.5505/tjtes.2017.23539>
- Quent, V. M. C., Loessner, D., Friis, T., Reichert, J. C., & Huttmacher, D. W. (2010). Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 1003-1013. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01013.x>
- Shen, J.-T., Li, Y.-S., Xia, Z.-Q., Wen, S.-H., Yao, X., Yang, W.-J., Li, C., & Liu, K.-X. (2016). Remifentanyl preconditioning protects the small intestine against ischemia/reperfusion injury via intestinal δ - and μ -opioid receptors. *Surgery*, 159(2), 548-559. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.07.028>
- Tilsed, J. V. T., Casamassima, A., Kurihara, H., Mariani, D., Martinez, I., Pereira, J., Ponchiatti, L., Shamiyeh, A., Al-Ayoubi, F., Barco, L. a. B., Ceolin, M., D'Almeida, A. J. G., Hilario, S., Olavarria, A. L., Ozmen, M. M., Pinheiro, L. F., Poeze, M., Triantos, G., Fuentes, F. T., ... Yanar, H. (2016). ESTES guidelines: Acute mesenteric ischaemia. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery: Official Publication of the European Trauma Society*, 42(2), 253-270. <https://doi.org/10.1007/s00068-016-0634-0>
- Tojkander, S., Gateva, G., & Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science*, jcs.098087. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>
- Wang, H., Cai, D., Chen, Z., & Wang, Y. (2020). GTS-21 Promotes $\alpha 7$ nAChR to Alleviate Intestinal Ischemia-Reperfusion-Induced Apoptosis and Inflammation of Enterocytes. *Medical Science Monitor*, 26. <https://doi.org/10.12659/MSM.921618>
- Wen, S., Ling, Y., Yang, W., Shen, J., Li, C., Deng, W., Liu, W., & Liu, K. (2017). Necroptosis is a key mediator of enterocytes loss in intestinal ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(3), 432-443. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12987>
- Yang, J., & Xie, X. (2021). Tofacitinib protects intestinal epithelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury by inhibiting the JAK/STAT3 signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(4), 1108. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10542>
- Zepeda, A. B., Pessoa, A., Castillo, R. L., Figueroa, C. A., Pulgar, V. M., & Farías, J. G. (2013). Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: Role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochemistry and Function*, 31(6), 451-459. <https://doi.org/10.1002/cbf.2985>