

**Evaluación de la actividad antioxidante de compuestos naturales en  
cardiomiocitos para disminuir la muerte celular**

**Laura Sofía Ramírez Quintero  
Juan Esteban Romo Ruíz**

**UNIVERSIDAD ICESI**

**FACULTAD DE INGENIERIA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**Cali**

**2024**

**Evaluación de la actividad antioxidante de compuestos naturales en  
cardiomiocitos para disminuir la muerte celular**

**Laura Sofia Ramírez Quintero**

**Juan Esteban Romo Ruíz**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**Paola Andrea Neuta Arciniegas**

**Doctora en Ciencias Biomédicas**

**Cali**

**2024**

## AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

**Firma del Asesor:**



---

Paola Andrea Neuta Arciniegas, Ph.D.

**Firma Estudiante 1:**



---

Laura Sofia Ramirez Quintero

**Firma Estudiante 2:**



---

Juan Esteban Romo Ruiz

## **I. RESUMEN**

El presente proyecto de investigación se centró en la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos naturales en cardiomiocitos para reducir la muerte celular, con el objetivo de establecer una terapia *in vitro* que disminuya la mortalidad de cardiomiocitos y, por ende, la probabilidad de enfermedades cardíacas. El estudio se justifica en la importancia de comprender cómo diferentes compuestos afectan la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel celular, buscando identificar agentes terapéuticos potenciales y determinar las dosis óptimas para su eficacia. Se destaca la relevancia de evitar el uso inadecuado de antioxidantes, ya que dosis excesivas podrían ser contraproducentes. El proyecto de investigación buscó determinar si la incorporación de los antioxidantes quercetina, ácido ascórbico y diosmina en cultivos *in vitro* de cardiomiocitos, disminuye la síntesis de especies reactivas de oxígeno en estas células cardíacas. Se espera que este estudio contribuya a la prevención del daño celular causado por el estrés oxidativo, crucial en el desarrollo de enfermedades cardíacas, y a la formulación de pautas claras para el consumo adecuado de antioxidantes, maximizando su potencial terapéutico y minimizando riesgos asociados.

Palabras clave: Especies reactivas de oxígeno, cardiomiocitos, antioxidantes, investigación *in vitro*.

## **II. INTRODUCCIÓN**

La investigación *in vitro* brinda un análisis detallado de cómo diferentes compuestos afectan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) a nivel celular, posibilitando la identificación de agentes terapéuticos potenciales capaces de modular este proceso de manera beneficiosa. Asimismo, ofrece la oportunidad de evaluar la seguridad y eficacia de nuevas moléculas y terapias antes de su aplicación en modelos animales y ensayos clínicos, siendo esta una evaluación crucial para garantizar la viabilidad y eficacia de las intervenciones médicas, contribuyendo al desarrollo de nuevas terapias y minimizando los riesgos asociados a tratamientos ineficaces o tóxicos.

Por otro lado, es importante destacar que a pesar de que existen estudios que muestran los efectos de los antioxidantes, aún hay una brecha significativa en el conocimiento preciso de

las dosis requeridas para ejercerlos eficazmente. En muchos casos, las personas recurren al consumo de estas sustancias de forma empírica, sin una orientación clara sobre las cantidades óptimas que deberían ingerirse. Esta falta de información precisa puede conducir a un uso inadecuado de los antioxidantes, ya que las dosis excesivas pueden ser contraproducentes y generar efectos adversos en lugar de proporcionar beneficios para la salud. Además, diversos estudios han sugerido que el exceso de antioxidantes podría interferir con procesos celulares naturales y desequilibrar los sistemas de defensa antioxidante del organismo, lo que potencialmente podría contrarrestar los efectos protectores inicialmente buscados. Esta falta de conocimiento sobre las dosis óptimas y los posibles efectos adversos, incrementa la necesidad urgente de una investigación más profunda y detallada en este campo, ya que es fundamental realizar estudios rigurosos que no solo identifiquen los compuestos antioxidantes más efectivos, sino que también determinen las cantidades necesarias para obtener beneficios significativos para la salud, sin correr el riesgo de efectos no deseados. Este enfoque permitiría establecer pautas claras y basadas en evidencia para el consumo adecuado de antioxidantes, maximizando así su potencial terapéutico y minimizando los riesgos asociados<sup>1,2</sup>.

Con el fin de buscar una estrategia para prevenir el daño celular causado por el estrés oxidativo en cardiomiocitos, el proyecto buscó determinar mediante técnicas de viabilidad, expresión de ROS y morfología celular, la actividad antioxidante generada por diferentes compuestos naturales, para finales del año 2024.

Con este proyecto se pretendió establecer las bases *in vitro* de una terapia que permita disminuir la muerte de cardiomiocitos por producción de ROS, contribuyendo a la reducción de la probabilidad de padecer enfermedades cardíacas.

La cardiotoxicidad representa desafíos significativos en la salud humana, con impactos devastadores en la calidad de vida y la mortalidad. Las cardiopatías, como la insuficiencia cardíaca y las arritmias, son responsables de aproximadamente 2 millones de muertes cada año en todo el continente americano, constituyendo una de las principales causas de mortalidad según la Organización Mundial de la Salud<sup>3</sup>. Esta patología presenta un factor subyacente crucial: la influencia perjudicial de las especies reactivas de oxígeno, en su desarrollo y

progresión. Las ROS son moléculas altamente reactivas que pueden causar daño y disfunción celular, contribuyendo así al deterioro del tejido<sup>4</sup>. La comprensión del papel de las ROS en la fisiopatología de esta enfermedad ha sido fundamental para desarrollar estrategias efectivas de prevención y tratamiento que puedan disminuir en gran medida su impacto en la salud pública<sup>5</sup>, por lo que en este proyecto se planteó la siguiente pregunta: ¿Cómo influye la incorporación de antioxidantes como quercetina, ácido ascórbico y diosmina en la síntesis de especies reactivas de oxígeno en cultivos de cardiomiocitos a nivel in vitro?

### **Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas por el metabolismo aeróbico fisiológico normal. Sus principales fuentes de producción son la mitocondria, los peroxisomas, la NADPH oxidasa, la óxido nítrico sintasa libre y el sistema del citocromo P450<sup>6</sup>. Estas moléculas son altamente reactivas con radicales libres como el superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), generados en las células<sup>7</sup>. Un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidantes en los sistemas vivos puede provocar la degradación y el daño de las funciones celulares. Este desequilibrio se produce debido a la sobreproducción de ROS y la reducción de los mecanismos de defensa antioxidantes. Las ROS, especialmente el  $H_2O_2$ , actúan como moléculas mensajeras mediante la modificación oxidativa de las proteínas de señalización<sup>8</sup>. De tal manera, el equilibrio entre la generación y la eliminación de ROS garantiza la función celular normal, mientras que un desequilibrio provoca estrés oxidativo y conduce a consecuencias patológicas.

De lo anterior se evidencia la presencia del estrés oxidativo, el cual se define como un fenómeno causado por el desequilibrio entre la producción y acumulación de las ROS en las células y tejidos y una insuficiencia en la capacidad de un sistema biológico para desintoxicar estos productos reactivos. Además, estas se pueden producir por factores estresantes ambientales como pueden ser los rayos UV, las radiaciones ionizantes, los contaminantes y los metales pesados que pueden llegar a estar presentes en nuestro diario vivir<sup>9</sup>. A nivel celular, debido a demasiadas especies reactivas de oxígeno se pueden alterar las funciones celulares normales y causar daño permanente

a los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas celulares las cuales llevan a la muerte celular por apoptosis o necrosis<sup>10</sup>; por lo tanto, se busca evitar estos daños celulares para disminuir la aparición de patologías relacionadas a la pérdida de células.

### **Enfermedades cardiacas causadas por ROS**

Los cardiomiocitos son responsables de la formación del músculo cardíaco en la pared del corazón. Son los responsables de producir el bombeo que expulsa la sangre por la contracción y expansión que generan al producir la sístole y diástole del corazón, es decir la contracción y relajación de los ventrículos<sup>11</sup>. Ahora bien, las ROS tienen un papel importante en el normal desarrollo de los cardiomiocitos ya que hay varias quinasas que participan en la señalización redox. Por ejemplo, según un artículo publicado en la *National Library of Medicine*: “El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría activar la quinasa II dependiente de Ca/calmodulina (CAMKII), lo que lleva al acoplamiento excitación-contracción o la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38 MAPK) y la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) que conduce a la inhibición de la transducción de señales de insulina. La proteína quinasa A (PKA) inducida por AMPc también se activa mediante la oxidación de su subunidad reguladora R1 $\alpha$  y se transloca del citosol a la membrana, donde la PKA regula el acoplamiento de excitación-contracción cardíaca en el corazón y la vasodilatación en los vasos”<sup>12</sup>

De tal manera, cuando se presenta un desbalance de las ROS en los cardiomiocitos no solo lleva las células a la muerte, las cuales no tienen la capacidad de regenerarse, también significa un riesgo muy alto para la activación de las vías inmunobioquímicas activadas en la aterogénesis la cual es uno de los procesos patológicos más comunes que conducen a enfermedades cardiovasculares, incluidos el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca, el accidente cerebrovascular y la claudicación. En condiciones de estrés oxidativo crítico, el agotamiento de los sistemas amortiguadores redox endógenos es fundamental no sólo porque se activan las respuestas inmunes, sino también porque causa disfunción endotelial y del músculo liso, contribuyendo así a la progresión de la aterosclerosis<sup>13</sup>.

Actualmente, hay diferentes tratamientos para manejar el desequilibrio de las especies reactivas de oxígeno, siendo el manejo con antioxidantes el primordial en este caso, ya que previenen la

formación de radicales libres y su objetivo se logra a través de mecanismos enzimáticos capaces de metabolizar especies reactivas de oxígeno a estructuras más estables o mecanismos no enzimáticos como agentes quelantes que pueden neutralizar metales involucrados en la generación de radicales libres<sup>14</sup>. Primero, los antioxidantes enzimáticos son la primera defensa de las células al daño por estrés oxidativo la cual obtiene su acción al juntar tres enzimas para formar la “triada enzimática”, esta se compone de superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPX). Estos antioxidantes enzimáticos se encuentran naturalmente en algunos alimentos como la cebada, el brócoli, las coles de Bruselas, la col y el trigo, sin embargo, para que sean efectivos se debe tener un equilibrio entre dichas enzimas que por lo general no se logra solo con la dieta, por lo que se debe recurrir a suplementos los cuales tienen alto costo<sup>15</sup>.

Por otro lado, los antioxidantes exógenos también ayudan a prevenir los daños provocados por las ROS, estos pueden ser obtenidos directamente de la dieta como las vitaminas y los compuestos fenólicos. Entre estos se destacan la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides y compuestos fenólicos los cuales se encuentran en una gran variedad de alimentos como naranjas, pimientos rojos y verdes, kiwi, fresas, almendras, el maní, avellanas, semillas de girasol, zanahorias, etc<sup>14</sup>. Estos brindan una protección contra los daños generados por la acumulación de especies reactivas de oxígeno derivado del estrés oxidativo.

### **Antioxidantes (quercetina, diosmina, ácido ascórbico) como tratamiento para el estrés oxidativo**

Los flavonoides pueden prevenir el daño causado por los radicales libres mediante la eliminación de ROS, la activación de enzimas antioxidantes, la actividad quelante de metales, la reducción de los radicales  $\alpha$ -tocoferilo, la inhibición de las oxidasas y la mitigación del estrés oxidativo<sup>16</sup>.

La quercetina es un flavonoide el cual es una sustancia fenólica que presenta actividades biológicas catalogadas como antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias y vasodilatadoras. Además, los flavonoides ofrecen efectos antioxidantes beneficiosos para la salud. Por lo general, la quercetina se encuentra en frutas, vegetales de hojas verdes, semillas, trigo sarraceno, nueces, flores, pieles, brócoli, aceite de oliva, manzanas, cebollas, té verde, uvas

rojas, vino, cerezas negras y bayas. Las concentraciones más altas de esta se obtienen en vegetales como la cebolla y el brócoli, frutas como la manzana, cereza y bayas, y en bebidas como el té y el vino tinto. Este antioxidante presenta un color amarillo, es poco soluble en agua, pero soluble en alcohol y lípidos.

La diosmina es un flavonoide glucósido el cual se encuentra en una gran variedad de frutas cítricas, específicamente en la parte exterior del fruto de las plantas, que cubre las semillas. Este compuesto presenta diferentes acciones farmacológicas como antioxidante, antiinflamatorio, protector cardiovascular, incluso ha demostrado ser pro-apoptótico en cáncer de seno, próstata y colon. Por último, la diosmina presenta una coloración amarilla con una solubilidad en DMSO de 50mg/ml, para el agua es de 122mg/ml y en etanol es menor a 1mg/ml.<sup>18</sup>

El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C es una lactona de un azúcarácido derivado del ácido gulónico que se sintetiza a partir de la glucosa.<sup>19</sup> Este compuesto puede ser sintetizado endógenamente por diferentes organismos como algunos mamíferos y algunas plantas, sin embargo, los humanos no somos capaces de producir el ácido ascórbico debido a la falta de la enzima L-gulono- $\gamma$ -lactona la cual es fundamental para la síntesis de la vitamina<sup>20</sup>. La obtención de la vitamina C se logra mediante la dieta al consumir frutas cítricas como naranjas, limón, pomelos y toronjas incluidos sus jugos. Además, en el pimentón rojo y verde, kiwi, brócoli, fresas, melón, tubérculos y tomates también hay presencia alta de ácido ascórbico<sup>21</sup>. Por último, este compuesto es un polvo cristalino, blanco e inodoro, muy soluble en agua y poco soluble en disolventes orgánicos, en general presenta una estabilidad larga siempre este se mantenga seco y protegido de la luz.<sup>19</sup>

### **Viabilidad celular**

La viabilidad celular es un indicador de la proporción de células vivas y saludables en un cultivo celular, y estos ensayos resultan útiles para evaluar el estado general de las células. Esta información es clave para optimizar las condiciones del cultivo o el entorno experimental, así como para medir la supervivencia celular después del tratamiento con diferentes compuestos. La viabilidad se determina mediante diversas técnicas, como la incorporación de radioisótopos, la

adición de sales que producen un cambio de color al reaccionar, o el uso de colorantes fluorescentes o no fluorescentes<sup>22</sup>.

En el caso de los cardiomiocitos, la viabilidad puede evaluarse observando la densidad celular en la placa de cultivo. Las células vivas forman una capa que recubre el fondo de la placa debido a sus proteínas de adhesión; cuando mueren, estas proteínas se pierden, y las células flotan en el medio de cultivo.

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Evaluar la capacidad antioxidante de la quercetina, la diosmina y el ácido ascórbico en cultivos celulares de cardiomiocitos.

### **Específicos**

1. Determinar las concentraciones de antioxidantes en respuesta a la viabilidad y morfología celular, y disminución de la ROS.
2. Identificar el efecto de la combinación de la quercetina, ácido ascórbico y diosmina en su capacidad antioxidante en cultivos *in vitro* de cardiomiocitos.

## **III. METODOLOGÍA**

### **III.1 Cultivos celulares**

Los cardiomiocitos que se emplearon en el proyecto fueron obtenidos a partir de diferenciación de células mesenquimales (MSC), las cuales permanecieron en congelación en el laboratorio de cultivos celulares de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad del Valle. Las MSC fueron preservadas en nitrógeno líquido, las cuales fueron retiradas y descongeladas en un baño serológico hasta llegar a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, las MSC se vertieron por completo en un frasco de cultivo T-75 y se les adicionaron aproximadamente 15 mL de DMEM (Lonza) 1x suplementado con suero fetal bovino (SFB) de 20% de concentración. La mezcla anteriormente mencionada fue llevada a una incubadora previamente calentada a 37 °C y con un CO<sub>2</sub> graduado al 5%. Una vez las células se encontraban adheridas al fondo del frasco, el medio se removió y fue reemplazado en el mismo frasco hasta observar una confluencia de

aproximadamente 70%. Los cambios sucesivos de medio de cultivo se realizaron 2 veces a la semana.

Para determinar la cantidad de pruebas necesarias, se elaboró una matriz que permitió establecer el número total, resultando en 25 ensayos, considerando cada concentración de antioxidante por duplicado, las combinaciones de antioxidante en su mejor concentración obtenida, por triplicado, y un control negativo, al cual no se le realizó ninguna exposición antioxidante. Cabe resaltar que se realizaron 24 ensayos contemplando todas las pruebas: viabilidad celular, detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) y morfología celular. Las células de cada ensayo fueron utilizadas para todas las pruebas, ya que las evaluaciones de viabilidad y morfología no eran destructivas. Sin embargo, después de la detección de ROS, las células fueron descartadas, puesto que la prueba requería la incorporación del reactivo 2',7' Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Calbiochem Merck).

Después de contar con el número adecuado de células para iniciar con cada una de las pruebas, las células MSC fueron desprendidas con tripsina y posteriormente fueron llevadas a centrifugar durante 5 minutos a 2500 r.p.m. hasta obtener el botón de células, seguidamente, se descartó el sobrenadante y se agregó 3,5 mL de medio de cultivo MSCBM. Finalmente se tomaron 100  $\mu$ L de suspensión celular los cuales fueron agregados a pozos de platos de cultivo (Corning incorporated costar). Cabe resaltar que en total se sembraron 30 pozos (5 placas de 6 pozos).

Una vez pasados 5 días, las células lograron adherirse a la superficie de los pozos, por lo que se inició la diferenciación de MSC a cardiomiocitos. Para ello, se retiró el medio MSCBM y se agregaron 3 mL de medio de diferenciación a cardiomiocitos (SCM 102, Merck Millipore). Se observó y registró fotográficamente los cambios morfológicos durante la diferenciación de las MSC en cardiomiocitos, con el fin de evidenciar dichos cambios y confirmar la correcta diferenciación celular.

### **III.2 Preparación de soluciones antioxidantes**

Una vez las células se diferenciaron a cardiomiocitos completamente, se realizó la preparación de las soluciones antioxidantes. Para ello, fueron consideradas las diferentes concentraciones de antioxidante tomando como referencia los rangos expresados en la literatura (2, 8 y 15  $\mu$ M)<sup>23</sup>. Así

pues, cada una de las soluciones se obtuvo mediante diluciones a partir de una solución madre 1 mM para cada uno de los compuestos antioxidantes. Para lograr lo anterior, se pesaron aproximadamente 1.76 mg de ácido ascórbico, 3.02 mg de quercetina y 6.09 mg de diosmina, teniendo en cuenta que todas las cantidades se disolvieron en 10 mL de medio de cultivo de cardiomiocitos. Con la solución madre de cada antioxidante ya preparada, se realizaron las diluciones directamente en cada uno de los pozos de las placas de cultivo de 3 mL, tomando alícuotas de 45  $\mu$ L, 24  $\mu$ L y 6  $\mu$ L para obtener concentraciones de 15 $\mu$ M, 8  $\mu$ M y 2  $\mu$ M, respectivamente. Dicha exposición antioxidante se realizó durante 5 días para garantizar una buena absorción del compuesto por parte de las células.

### **III.3 Pruebas de estrés**

Seguidamente, pasados los 5 días de exposición antioxidante, se llevó a cabo la exposición al agente oxidativo, empleando peróxido de hidrógeno al 4%, durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para ello, se preparó una solución de 1mM, tomando una alícuota de 42,4  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno y se diluyó en un balón de 50 mL. Posteriormente, se tomó una alícuota de 75  $\mu$ L de la solución preparada previamente y se agregó junto a 2925  $\mu$ L de medio de cultivo de cardiomiocitos a cada pozo, obteniendo una concentración final de 25  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno.

### **III.4 Pruebas**

#### **III.4.1 Viabilidad celular**

Para determinar la viabilidad celular de cada ensayo, se midió la densidad celular en cada pozo de las placas de cultivo para determinar un antes y un después de la exposición al agente oxidativo. Para la medición, se tomaron los mismos campos de visión de medio de cultivo, considerando vivas las células que se encontraban adheridas, y muertas aquellas que se encontraban desprendidas del fondo del frasco.

#### **III.4.2 Morfología celular**

Para la determinación de la morfología de las células, se tomaron fotografías de varios campos de los pozos de las placas de cultivo para evidenciar la morfología de los cardiomiocitos, antes y después de la exposición al agente oxidativo. Las características morfológicas se documentaron cualitativamente, resaltando la forma, tamaño e integridad de las células.

### III.4.3 Detección de ROS

Se midieron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en las células después de inducir el estrés oxidativo. Para esto, se empleó una sonda fluorescente llamada Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (Clabiochem Meck). Se preparó una solución stock de este compuesto con una concentración de 10 mM diluido con DMSO, posteriormente se diluyó con DMEM hasta alcanzar una concentración de 10  $\mu$ M con la cual se trabajó para teñir las células. Al momento de adicionar el reactivo, se tomó 500  $\mu$ L y se dispuso en cada uno de los pozos, seguidamente, se incubó a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Una vez completado el tiempo se retiró medio que contenía el DCFH-DA y se hicieron lavados con un buffer fosfato salino (PBS)<sup>24</sup>. En este momento, por medio de un microscopio de fluorescencia se determinó cuantitativamente la cantidad emitida de fluorescencia con ayuda del programa Image J, considerando que, a mayor emisión, mayor ROS emitidas por las células.

### III. 5 Matriz de trabajo

La matriz de trabajo se realizó de manera aleatoria, así pues, se obtuvo la siguiente configuración:

**Tabla 1.** Matriz de trabajo para la adición de cada antioxidante en cada pozo

PLACA	POZO	TRATAMIENTO AOX
1	1	N.A
	2	N.A
	3	Control negativo
	4	N.A
	5	N.A
	6	Quercetina 2 $\mu$ M
2	1	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M
	2	Quercetina 2 $\mu$ M
	3	Ácido ascórbico 8 $\mu$ M
	4	Quercetina 8 $\mu$ M
	5	Ácido ascórbico 15 $\mu$ M

	6	Quercetina 15 $\mu$ M
3	1	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M
	2	Ácido ascórbico 8 $\mu$ M
	3	Ácido ascórbico 15 $\mu$ M
	4	Quercetina 8 $\mu$ M
	5	Diosmina 2 $\mu$ M
	6	Quercetina 15 $\mu$ M
4	1	Diosmina 2 $\mu$ M
	2	Diosmina 8 $\mu$ M
	3	Diosmina 15 $\mu$ M
	4	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M + Quercetina 8 $\mu$ M
	5	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M + Diosmina 8 $\mu$ M
	6	Quercetina 8 $\mu$ M + Diosmina 8 $\mu$ M
5	1	Diosmina 8 $\mu$ M
	2	N.A
	3	Diosmina 15 $\mu$ M
	4	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M + Quercetina 8 $\mu$ M
	5	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M + Diosmina 8 $\mu$ M
	6	Quercetina 8 $\mu$ M + Diosmina 8 $\mu$ M

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### IV. 1 Diferenciación de MSC a cardiomiocitos

Las MSC descongeladas y cultivadas en condiciones controladas mostraron una alta viabilidad y capacidad de adhesión. Después de la descongelación en baño serológico y el cultivo en frascos T-75, se logró evidenciar una adhesión exitosa al fondo del frasco dentro del periodo de incubación.



**Fig 1.** Células MSC recién sembradas refringentes, sin adherirse al frasco. (20X)

Durante el proceso de cultivo, se observó una proliferación celular adecuada, alcanzando una confluencia aproximada del 70% en el frasco. Además, no se detectaron signos de contaminación en las muestras, lo que sugiere que las condiciones de cultivo fueron óptimas para mantener la integridad y viabilidad de las MSC. Los cambios de medio se realizaron de manera regular, tres veces por semana, lo que contribuyó a la mantención de un ambiente propicio para el crecimiento celular.



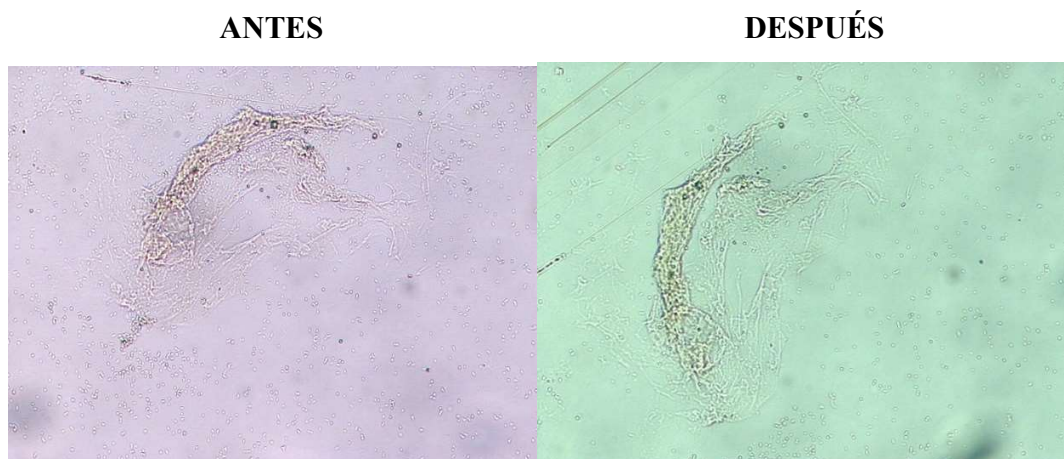
**Fig 2.** Células adheridas, vivas y en proceso de expansión del cultivo.

Una vez se obtuvo una confluencia adecuada, las células fueron desprendidas del frasco y se dispusieron en los pozos de las placas de cultivo en donde inició la diferenciación a cardiomiocitos. En este punto, las células dejaron de reproducirse puesto que los cardiomiocitos no se reproducen,

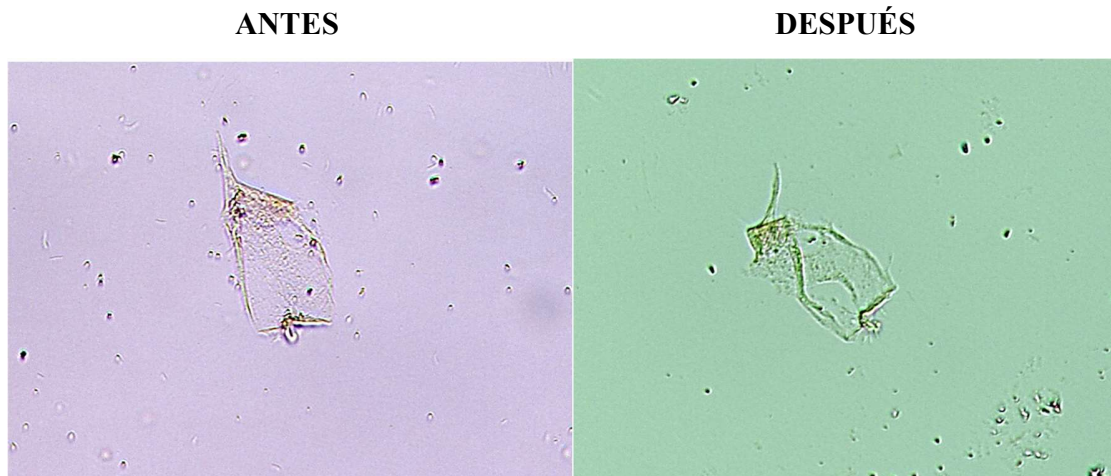
por lo que el número de células en cada pozo siempre fue la misma. No obstante, durante los 10 días de diferenciación, en algunos pozos se observó una menor cantidad de células vivas, lo cual no es atribuible al proyecto mismo, sino a la pérdida normal que puede darse durante un proceso de cultivo celular.

#### **IV. 1 Viabilidad celular**

Una vez se obtuvieron células diferenciadas a cardiomiocitos, se realizó la prueba de viabilidad, en donde se buscaba medir la densidad celular, comparando la cantidad de células adheridas (vivas) y muertas (flotantes). Sin embargo, cuando se observaron las células en el microscopio, se logró evidenciar que las células no morían, por lo que se puede decir que la viabilidad se mantuvo inalterada.



**Fig 3.** Células tratadas con ácido ascórbico 2  $\mu\text{M}$  + quercetina 8  $\mu\text{M}$ , antes y después de la exposición al estrés oxidativo.



**Fig 4.** Células tratadas con quercetina 8  $\mu\text{M}$  + diosmina 8  $\mu\text{M}$ , antes y después de la exposición al estrés oxidativo.

Como se muestra en la Figura 3 y 4, las células permanecen adheridas tanto antes como después de la inducción del estrés oxidativo, lo cual indica que no experimentan muerte celular bajo las condiciones de concentración y tiempo de exposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicadas en el estudio. Lo anterior, se logró evidenciar en todos los pozos, pues las células no se desprendían después de la exposición del agente oxidativo.

Los resultados obtenidos sugieren dos posibles explicaciones para la preservación de la viabilidad celular en los cardiomiocitos tratados con antioxidantes y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Primero, es posible que la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleada no haya sido suficiente para inducir un estrés oxidativo significativo, lo que limitó el daño celular y permitió que las células mantuvieran su adherencia y viabilidad. Esta posibilidad destaca la necesidad de optimizar las condiciones experimentales para garantizar un estímulo efectivo de estrés oxidativo, sin embargo, no era el objetivo del estudio.

En un estudio publicado en la revista Nature, se evaluaron diferentes tiempos de exposición al  $\text{H}_2\text{O}_2$  para inducir estrés oxidativo en células meningoteliales. Los resultados indicaron que exposiciones de 24 y 48 horas provocaron un aumento significativo en la producción de ROS y una disminución en la viabilidad celular. En particular, la exposición a una concentración de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 48 horas mostró los efectos más pronunciados, evidenciados por un

incremento notable en los niveles de ROS, lo que sugiere un estado de estrés oxidativo severo en las células tratadas<sup>25</sup>.

Sin embargo, en este análisis, el estrés oxidativo fue inducido únicamente durante un periodo de 1 hora. Esta breve duración pudo haber limitado la observación de respuestas significativas, dado que la literatura reporta que tanto el daño celular como las respuestas antioxidantes son procesos dinámicos que se intensifican con el tiempo. Por lo tanto, períodos de exposición más prolongados podrían ser necesarios para desencadenar respuestas celulares más marcadas y evidentes.

En segundo lugar, los resultados podrían indicar una actividad antioxidante eficiente de los compuestos evaluados (vitamina C, diosmina y quercetina). Estos antioxidantes pueden haber neutralizado las especies generadas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, restaurando el equilibrio redox celular y protegiendo a las células del daño. Este efecto es consistente con investigaciones previas que muestran la capacidad de estos compuestos para reducir el estrés oxidativo en células cardíacas y endoteliales, restaurando la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa y disminuyendo marcadores de peroxidación lipídica<sup>26</sup>.

### **Viabilidad del ácido ascórbico**

Según estudios, el ácido ascórbico es efectivo para reducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y prevenir la activación de vías proapoptóticas como p38 MAPK y p53. En modelos de cardiomiocitos sometidos a estrés oxidativo inducido por doxorubicina, la vitamina C protegió contra la apoptosis y necrosis celular al mitigar el daño estructural y funcional causado por ROS. Además, se observó que la vitamina C es capaz de estabilizar membranas celulares y mejorar la viabilidad de los cardiomiocitos tras el tratamiento con agentes oxidantes<sup>27</sup>.

### **Viabilidad de la quercetina**

Por otro lado, la quercetina ha demostrado ser un potente antioxidante que neutraliza ROS y previene la activación de vías inflamatorias y apoptóticas en cardiomiocitos. Un estudio investigó la actividad antioxidante de la quercetina utilizando cultivos primarios de células de hipocampo de ratas. Los ensayos mostraron que la quercetina nanovehiculizada tenía un efecto positivo en la viabilidad celular, debido a que la quercetina mejora la homeostasis redox y protege contra el daño

oxidativo al inhibir procesos como la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas. Estas propiedades podrían explicar su capacidad para prevenir la desadhesión y muerte celular incluso bajo niveles moderados de estrés oxidativo<sup>28</sup>.

### **Viabilidad de la diosmina**

Si bien la diosmina es menos estudiada en cardiomiocitos específicamente, su efecto antioxidante en otros modelos celulares es notable. En estudios realizados con células endoteliales sometidas a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, la diosmina mostró un impacto significativo en la disminución de los niveles de malondialdehído (un marcador de estrés oxidativo) y en el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes clave como el superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión peroxidasa. Este efecto está asociado con la capacidad de la diosmina y su metabolito, la diosmetina-3-O- $\beta$ -D-glucurónido, para modular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias, un componente crucial en la prevención del daño celular por estrés oxidativo<sup>29,26</sup>.

Adicionalmente, los efectos antioxidantes se correlacionan con una reducción en la inflamación y en el daño endotelial, sugiriendo que la diosmina puede tener aplicaciones protectoras en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación crónica. En el contexto de un modelo *ex vivo* y estudios clínicos, también se demostró que la diosmina puede reducir marcadores de daño oxidativo, como las isoprostanos plasmáticos, lo que refuerza su potencial como antioxidante y agente protector celular en un entorno más amplio de condiciones fisiológicas y patológicas<sup>29,30</sup>.

## **IV. 2 Observación de morfología celular**

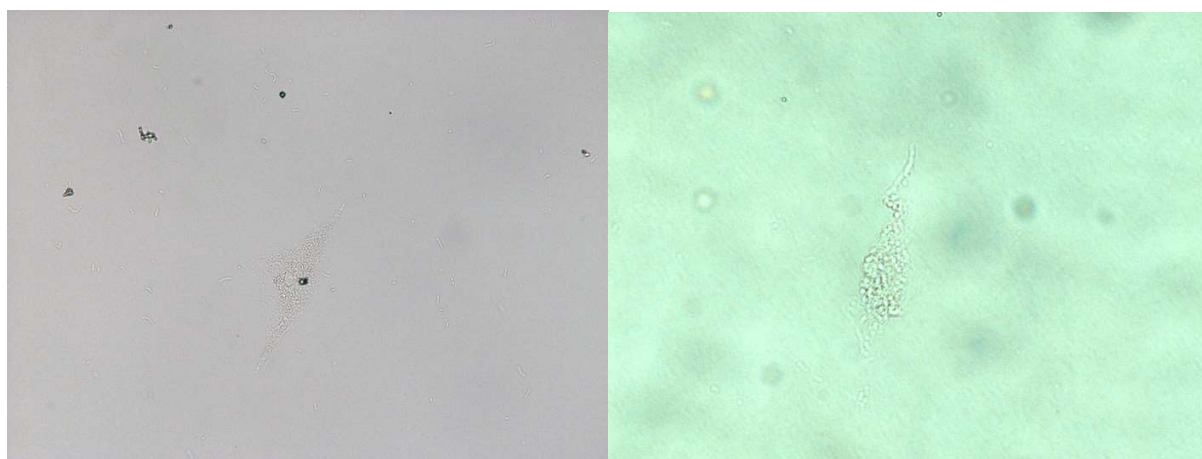
De igual manera, se evaluaron los cambios morfológicos que presentaron las células después de inducirles el estrés oxidativo con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> siendo tratadas con un solo antioxidante a cierta concentración. Según los resultados evidenciados en la tabla 2, la mayoría de los cardiomiocitos no presentó ningún cambio morfológico, sin embargo, para el ácido ascórbico 2  $\mu$ M y la quercetina 15  $\mu$ M sí se evidenció una alteración. Como se observa en las figuras 4 y 5 son afectaciones principalmente en la estructura del citoplasma donde se presentó la formación de vesículas al interior del cardiomiocito.

**Tabla 2.** Presencia de cambios morfológicos por cada tratamiento

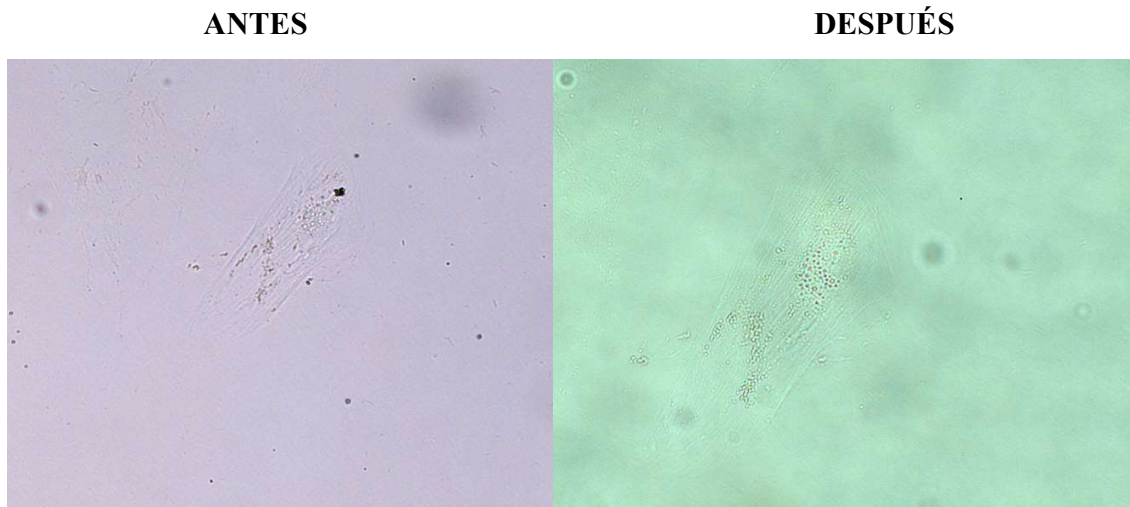
Tratamiento	Cambio Morfológico
Quercetina 2 $\mu\text{M}$	No presenta
Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$	Si presenta
Diosmina 2 $\mu\text{M}$	No presenta
Quercetina 8 $\mu\text{M}$	No presenta
Ácido ascórbico 8 $\mu\text{M}$	No presenta
Diosmina 8 $\mu\text{M}$	No presenta
Quercetina 15 $\mu\text{M}$	Si presenta
Ácido ascórbico 15 $\mu\text{M}$	No presenta
Diosmina 15 $\mu\text{M}$	No presenta
Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$ + Quercetina 8 $\mu\text{M}$	No presenta
Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$ + Diosmina 8 $\mu\text{M}$	No presenta
Quercetina 8 $\mu\text{M}$ + Diosmina 8 $\mu\text{M}$	No presenta

**ANTES**

**DESPUÉS**



**Fig 5.** Células tratadas con ácido ascórbico 2  $\mu\text{M}$  antes y después de la exposición al estrés oxidativo.



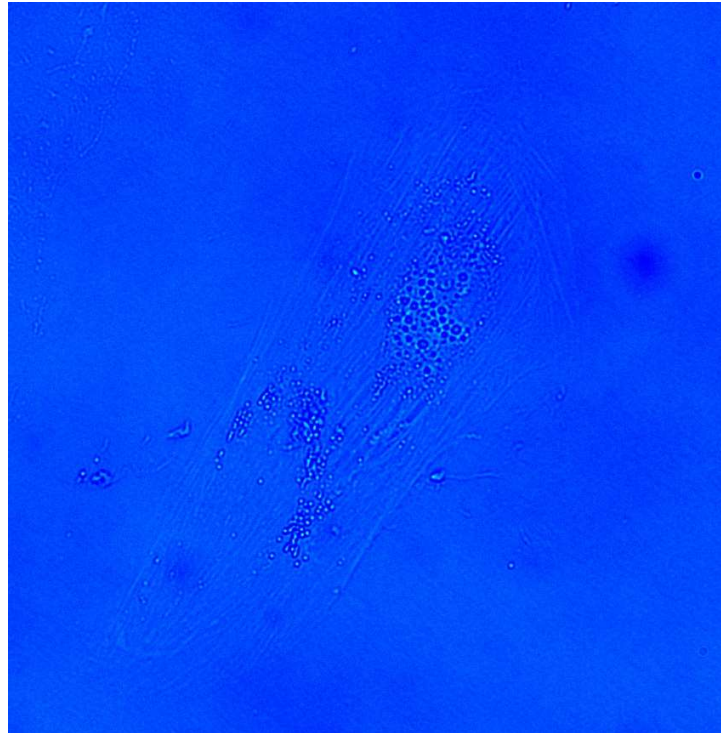
**Fig 6.** Células tratadas con quercetina 15  $\mu$ M, antes y después de la exposición al estrés oxidativo.

La formación de estas vesículas no se presentó en la mayoría de las células, en donde tampoco se evidenció una pérdida en la integridad de la membrana celular ni un cambio en el tamaño del cardiomiocito. Dentro del funcionamiento cardiovascular, las vesículas extracelulares (VE) juegan un papel importante en la comunicación cruzada entre células, dentro del sistema cardiovascular diferentes células cardíacas pueden generar las VE como las células del endotelio, fibroblastos, plaquetas y cardiomiocitos<sup>31</sup>. Estas vesículas extracelulares son pequeñas vesículas anucleares con una membrana lipídica bicapa que contienen diferentes especies de lípidos, metabolitos, proteínas, así como ácidos ribonucleicos (ARN) y ácidos desoxirribonucleicos (ADN)<sup>32</sup>. También, cuenta con dos clasificaciones: ectosomas y exosomas, la primera se caracteriza por iniciar en la membrana celular debido a una invaginación de la misma y posteriormente la expulsión de la vesícula hacia el espacio extracelular. Los ectosomas cuenta con 4 subclasificaciones: microvesículas, cuerpos apoptóticos y oncosomas siendo las microvesículas de nuestro interés debido a que recientemente se descubrió que estas son capaces de expulsar partículas mitocondriales como el ADNmt de células madre mesenquimales que fueron sometidas a estrés oxidativo<sup>33</sup>.

De lo anterior, hablando específicamente de las VE liberadas de cardiomiocitos se ha descubierto que las VE derivadas de cardiomiocitos están compuestas por proteínas de choque térmico (Hsp) que desempeñan papeles críticos en el crecimiento y la supervivencia de los cardiomiocitos, de igual manera, las VE transportan IL-6 y TNF- $\alpha$ , factores inflamatorios responsables de la

remodelación cardíaca<sup>33</sup>.

Por otro lado, al observar estas células bajo un microscopio de fluorescencia, en el caso de la quercetina 15  $\mu\text{M}$  (ver figura 7) se presenta una gran fluorescencia como se evidencia en la tabla 3 (placa 2, pozo 6) indicando la presencia de especies reactivas de oxígeno.



**Fig 7.** Célula después de tratamiento con quercetina 15  $\mu\text{M}$  e inducción del estrés oxidativo.

Ahora bien, estas vesículas formadas al interior del cardiomiocito puede ser el inicio de la respuesta de protección al daño que la célula está atravesando debido a la inducción del estrés oxidativo, según los tiempos de exposición con los que se trabajó en este proyecto se espera que si hubieran sido más largos, se podría evidenciar mejor el comportamiento de estas VE o bien otro tipo de cambio morfológico como en el tamaño y forma de la célula o en la estructura de la pared celular.

#### **IV. 3 Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante el uso de la sonda fluorescente DCFH-DA. Este análisis permitió evaluar los niveles de ROS generados bajo las condiciones experimentales establecidas, empleando el

sistema de análisis de imágenes Image J. En la Tabla 3, se detalla la cantidad de fluorescencia emitida, lo cual refleja directamente la presencia y concentración de estas especies en las muestras analizadas.

**Tabla 3.** Fluorescencia emitida por las células para la detección de ROS

Placa	Pozo	Tratamiento	Presencia/Ausencia	Cantidad (AU)
1	3	Control negativo	Presencia	42'863.715
1	6	Quercetina 2 $\mu$ M	Presencia	1'990.878
2	1	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M	Presencia	1'106.787
2	2	Quercetina 2 $\mu$ M	Presencia	2'359.516
2	3	Ácido ascórbico 8 $\mu$ M	Presencia	12'233.224
2	4	Quercetina 8 $\mu$ M	Presencia	1'235.418
2	5	Ácido ascórbico 15 $\mu$ M	Presencia	2'353.488
2	6	Quercetina 15 $\mu$ M	Presencia	20'836.116
3	1	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M	Presencia	1'770.365
3	2	Ácido ascórbico 8 $\mu$ M	Presencia	15'804.327
3	3	Ácido ascórbico 15 $\mu$ M	Presencia	8'179.017
3	4	Quercetina 8 $\mu$ M	Ausencia	0
3	5	Diosmina 2 $\mu$ M	Presencia	15'813.900
3	6	Quercetina 15 $\mu$ M	Presencia	20'135.709
4	1	Diosmina 2 $\mu$ M	Presencia	12'098.700
4	2	Diosmina 8 $\mu$ M	Ausencia	0
4	3	Diosmina 15 $\mu$ M	Presencia	7'351.592
4	4	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M + Quercetina 8 $\mu$ M	Ausencia	0
4	5	Ácido ascórbico 2 $\mu$ M + Diosmina 8 $\mu$ M	-	-
4	6	Quercetina 8 $\mu$ M + Diosmina 8 $\mu$ M	Ausencia	0
5	1	Diosmina 8 $\mu$ M	Presencia	1'009.872

5	3	Diosmina 15 $\mu\text{M}$	Presencia	7'090.121
5	4	Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$ + Quercetina 8 $\mu\text{M}$	Presencia	3'132.438
5	5	Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$ + Diosmina 8 $\mu\text{M}$	-	-
5	6	Quercetina 8 $\mu\text{M}$ + Diosmina 8 $\mu\text{M}$	Presencia	7'347.946

De acuerdo con los primeros hallazgos, se realizaron las combinaciones de las concentraciones de antioxidantes cuyos resultados arrojaron una menor intensidad fluorescente, que en este caso fueron ácido ascórbico 2  $\mu\text{M}$ , diosmina 8  $\mu\text{M}$  y quercetina 8  $\mu\text{M}$ .

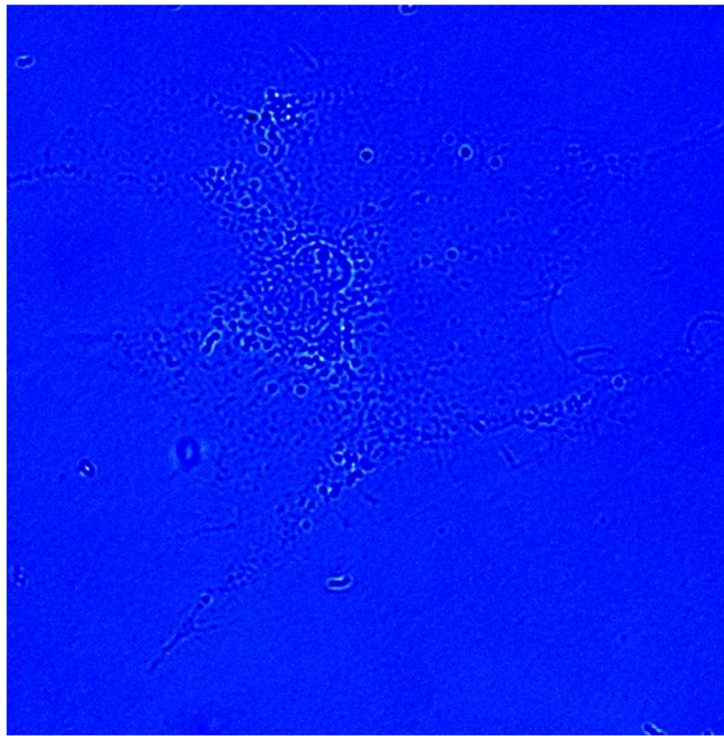
A continuación, se muestran los promedios del duplicado de cada tratamiento para así determinar cuál fue el tratamiento que emitió menos fluorescencia y cuál fue el efecto de la combinación.

**Tabla 4.** Promedio de emisión de fluorescencia por cada tratamiento

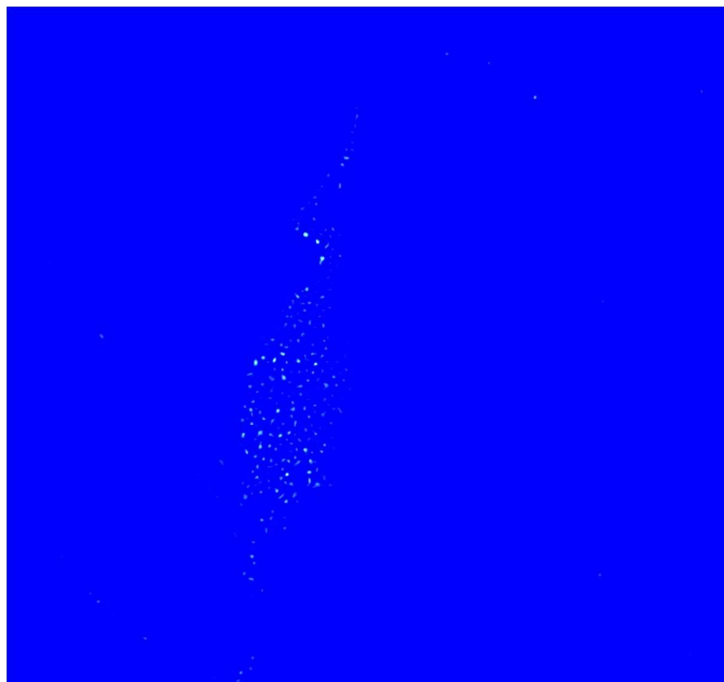
Tratamiento	Promedio (AU)
Quercetina 2 $\mu\text{M}$	2,175.197
Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$	1,438.576
Diosmina 2 $\mu\text{M}$	13,956.300
Quercetina 8 $\mu\text{M}$	617.709
Ácido ascórbico 8 $\mu\text{M}$	14,018.775
Diosmina 8 $\mu\text{M}$	704.936
Quercetina 15 $\mu\text{M}$	20,485.913
Ácido ascórbico 15 $\mu\text{M}$	5,266.253
Diosmina 15 $\mu\text{M}$	7,220.857
Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$ + Quercetina 8 $\mu\text{M}$	1,566.219
Ácido ascórbico 2 $\mu\text{M}$ + Diosmina 8 $\mu\text{M}$	Sin datos
Quercetina 8 $\mu\text{M}$ + Diosmina 8 $\mu\text{M}$	7,347.946

De acuerdo con los resultados expresados en la Tabla 4, la quercetina a 8  $\mu\text{M}$  presentó la menor emisión de ROS, con un promedio de 617.709 AU, siendo el mejor tratamiento individual. La combinación ácido ascórbico 2  $\mu\text{M}$  + quercetina 8  $\mu\text{M}$  tiene el promedio más bajo de fluorescencia (1,566.219 AU), sugiriendo ser la más efectiva entre las combinaciones. Finalmente, comparando la combinación ácido ascórbico 2  $\mu\text{M}$  + quercetina 8  $\mu\text{M}$  con los tratamientos individuales, se obtuvo que el promedio de la combinación (1,566.219 AU) es mayor que el de quercetina 8  $\mu\text{M}$  sola (617.709 AU), indicando que no hay efecto sinérgico en esta combinación, ya que el tratamiento individual con quercetina fue más efectivo. Además, en las combinaciones de ácido ascórbico (2  $\mu\text{M}$ ) con diosmina (8  $\mu\text{M}$ ), no se observaron células presentes antes ni después de la inducción del estrés oxidativo, lo que sugiere un posible efecto antagónico entre ambos compuestos. Este comportamiento podría indicar que la interacción entre el ácido ascórbico y la diosmina genera condiciones desfavorables para la supervivencia celular, llevando a la muerte celular en lugar de protegerlas del daño oxidativo.

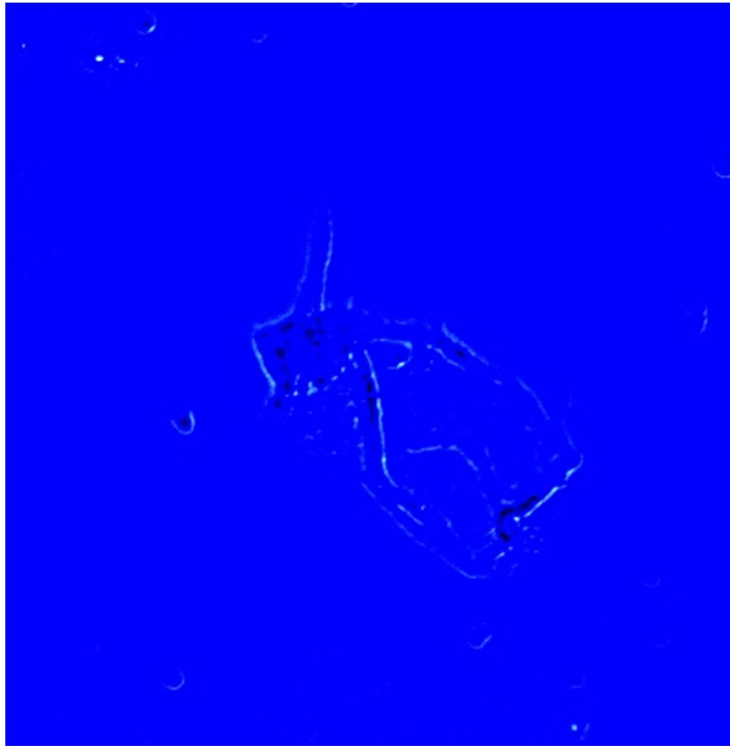
En las figuras 8-11 se muestran algunas de las células bajo el microscopio de fluorescencia después de la exposición al peróxido de hidrógeno y la tinción con la sonda fluorescente.



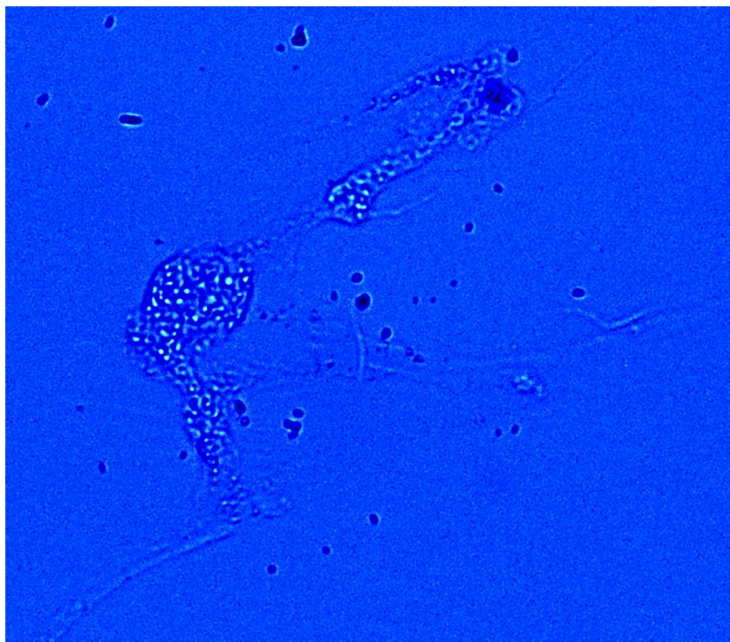
**Fig 8.** Célula después de tratamiento con ácido ascórbico 8  $\mu\text{M}$  e inducción del estrés oxidativo.



**Fig 9.** Célula después de tratamiento con ácido ascórbico 2  $\mu\text{M}$  e inducción del estrés oxidativo.



**Fig 10.** Célula después de tratamiento con quercetina 8  $\mu\text{M}$  + diosmina 8  $\mu\text{M}$  e inducción del estrés oxidativo.



**Fig 11.** Célula después de tratamiento con diosmina 15  $\mu\text{M}$  e inducción del estrés oxidativo.

## **Uso de DCFH-DA para medir fluorescencia emitida por ROS**

Inicialmente, es importante hablar acerca de la utilización de la sonda de fluorescencia DCFH-DA, pues esta ha sido empleada en diferentes estudios para medir la cantidad de ROS generadas en las células al ser expuestas a diferentes tratamientos. El DCFH-DA es un compuesto que penetra las membranas celulares y es convertido por esterasas intracelulares en un derivado fluorescente (DCF) en presencia de ROS, lo que permite una cuantificación precisa y visualización mediante microscopía de fluorescencia o citometría. Un estudio analizó la producción de ROS en células de miocardio ventricular de rata (H9c2) tras la estimulación con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Utilizando DCFH-DA, se determinó que las células incubadas durante 30 minutos con  $H_2O_2$  mostraron un aumento significativo en la fluorescencia, lo que indica una alta producción de ROS. Este protocolo incluyó la medición de diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  y su efecto sobre la generación de ROS<sup>34</sup>. Este estudio y demás, soporta el uso de la sonda para realizar mediciones de fluorescencia en células a nivel *in vitro*, especialmente, en cardiomiocitos.

## **Quercetina 8 $\mu$ M como mejor protector oxidante**

De acuerdo con los resultados presentados, se determinó que la quercetina a una concentración de 8  $\mu$ M proporcionó una protección superior contra el daño oxidativo. Este hallazgo concuerda con la literatura, que resalta el uso de la quercetina para proteger cardiomiocitos frente al estrés oxidativo. Un estudio evidenció que la administración de quercetina en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol redujo significativamente los marcadores de daño oxidativo y promovió la expresión de genes antioxidantes como UCP-2 (proteína desacoplante 2) y HO-1 (heme oxigenasa-1) en el corazón<sup>34</sup>.

Además, otros estudios han identificado a la quercetina como uno de los flavonoides más efectivos debido a su alta capacidad antioxidante, incluso a concentraciones bajas, en comparación con otros compuestos antioxidantes. Por ejemplo, aunque la rutina comparte estructura química con la quercetina, sus efectos antioxidantes son considerablemente inferiores. La capacidad antioxidante medida de la quercetina es hasta cinco veces mayor, lo que explica su destacada eficacia en la experimentación a 8  $\mu$ M. Esto respalda la hipótesis de que la forma aglicona de la quercetina es más activa debido a su mayor biodisponibilidad y reactividad en sistemas biológicos<sup>35</sup>.

De manera similar, las catequinas, reconocidas por su papel antioxidante en el té verde, resultan menos efectivas que la quercetina tanto en la eliminación de radicales libres como en la protección de lipoproteínas de baja densidad (LDL) frente a la oxidación. Los resultados obtenidos a 8  $\mu$ M reafirman que la quercetina logra un impacto antioxidante igual o superior con concentraciones significativamente más bajas<sup>36</sup>.

En conjunto, estos resultados subrayan la capacidad de la quercetina para actuar eficientemente a concentraciones reducidas, destacándola como un compuesto prometedor en aplicaciones experimentales y con un considerable potencial clínico.

### **Efecto de la mejor combinación**

En los resultados del presente estudio, se observó una respuesta favorable en la combinación de quercetina y ácido ascórbico, lo que respalda la existencia de una interacción entre estos compuestos. Estudios previos han demostrado que esta interacción, involucra la isoquercetina (un derivado de la quercetina), pues contribuye significativamente a la eficacia conjunta de ambos compuestos en tejidos humanos. Esta interacción redox no solo potencia las propiedades antioxidantes de ambos, sino que también ayuda a mantener niveles adecuados de ácido ascórbico en los tejidos, mejorando su biodisponibilidad y efectividad<sup>37</sup>. Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan la idea de que la combinación de estos dos compuestos puede ser eficaz lo que abre nuevas posibilidades para su aplicación en contextos terapéuticos y preventivos.

### **Efectos antagónicos potenciales entre el ácido ascórbico y la quercetina**

Aunque no se han documentado específicamente interacciones antagónicas entre el ácido ascórbico y la diosmina, es plausible que, en ciertas condiciones bioquímicas, un exceso de un antioxidante pueda interferir con los efectos del otro. Esto es especialmente relevante en contextos donde ambos compuestos están presentes en altas concentraciones.

## **V. CONCLUSIONES**

Se logró concluir que la mejor concentración antioxidante para disminuir la emisión de ROS fue la quercetina 8  $\mu$ M. Por otro lado, se encontró que las células expuestas a ácido ascórbico 2  $\mu$ M y

quercetina 15  $\mu\text{M}$ , expresaron cambios morfológicos significativos, mientras que los otros antioxidantes a las demás concentraciones no evidenciaron ningún tipo de morfología diferente. Finalmente, en cuanto a viabilidad celular, todos los antioxidantes a todas las concentraciones evaluadas permitieron preservar la viabilidad de estas.

Por otro lado, no se encontraron efectos sinérgicos entre los antioxidantes a sus mejores concentraciones, sin embargo, si se evidenció una protección significativa por parte de la combinación ácido ascórbico 2  $\mu\text{M}$  y quercetina 8  $\mu\text{M}$ .

## **VI. AGRADECIMIENTOS**

A lo largo del desarrollo de este proyecto de grado, hemos contado con el apoyo invaluable de muchas personas a quienes queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento.

En primer lugar, agradecemos profundamente a nuestras familias, quienes con su amor, paciencia y apoyo incondicional fueron nuestra principal fuente de motivación durante esta etapa académica.

Manifestamos nuestra gratitud a nuestra tutora, Paola Andrea Neuta, por su guía, dedicación y constante disposición para orientarnos en el desarrollo de este trabajo. Su conocimiento y sus valiosos consejos fueron esenciales para alcanzar este logro. De igual manera, extendemos un especial agradecimiento a la profesora Laura Rodríguez, por su orientación que enriqueció significativamente este proyecto.

A la Universidad Icesi y la Universidad del Valle, por brindarnos los recursos, el conocimiento y el entorno necesario para llevar a cabo este trabajo. Su compromiso con la formación académica y profesional ha sido clave en nuestro desarrollo.

Finalmente, agradecemos a nuestros amigos y compañeros, quienes con su compañía, apoyo y palabras de aliento nos ayudaron a hacer de este camino una experiencia memorable.

## **VII. REFERENCIAS**

1. García Alonso, F. J. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. (Universidad de Murcia, 2001).
2. Niño Giraldo, V. Evaluación de la actividad antioxidante de la quercetina

- nanovehiculizada en sistemas lisosomales sobre las células de hipocampo de ratas. (Universidad Icesi, 2018).
3. OPS. La carga de las enfermedades cardiovasculares en la Región de las Américas, 2000-2019. Portal de Datos de NMH. Organización Panamericana de la Salud; 2021.
  4. Giraldo, A. Papel del estrés oxidativo y nitrosativo en la hipertrofia cardiaca y remodelación ventricular. (Escuela Ciencias de la Salud, Colombia, 2010).
  5. Ortiz Machuca, D. V. & Ramirez Montenegro, D. F. Implementación del ensayo de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para la evaluación de estrés oxidativo intracelular en modelos in vitro de cáncer colorrectal y seno. (Universidad El Bosque, 2021)
  6. Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* 24, 981–990 (2012).
  7. Agilent Technologies. An introduction to reactive oxygen Species measurement of ROS in cells. [https://www.agilent.com/cs/library/whitepaper/public/ROS%20White%20Paper\\_2015\\_5994-3454EN.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/whitepaper/public/ROS%20White%20Paper_2015_5994-3454EN.pdf) (2022).
  8. Celia Andrés Juan, Pérez, M., Plou, F. J. & Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International journal of molecular sciences* 22, 4642–4642 (2021).
  9. Pizzino, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 1–13 (2017).
  10. Klein, J. A. & Ackerman, S. L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation/The journal of clinical investigation* 111, 785–793 (2003).
  11. Universidad de Vigo - Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Tipos celulares. Cardiomiocito. Atlas de Histología Vegetal y Animal. <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/cardiomiocito.php#:~:text=Los%20cardiomiocitos%2C%20o%20c>

- %C3%A9lula,relajaci%C3%B3n%20de%20los%20ventr%C3%ADculos%20cardiacos. (2024).
12. Dubois-Deruy, E., Victoriane Peugnet, Turkieh, A. & Pinet, F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* 9, 864–864 (2020).
  13. Harald Mangge, Becker, K., Fuchs, D. & Gostner, J. M. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World journal of cardiology* 6, 462–462 (2014).
  14. A. San-Miguel & F.J. Martin-Gil. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta médica de Bilbao/Gaceta médica de Bilbao* 106, 106–113 (2009).
  15. Superóxido Dismutasa (SOD) - El antioxidante natural más potente. TetraSOD® <https://tetrasod.com/es/superoxido-dismutasa/> (2023).
  16. Lopez Luengo, M. T. Flavonoides. *Offarm* 21, <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-flavonoides-13028951> 108-113 (2002).
  17. Victor, A., Radhakrishnan Arulmoli & Subramani Parasuraman. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews/Bioinformatics Trends/Pharmacognosy review* 10, 84–84 (2016).
  18. Huwait, E. & Mobashir, M. Potential and therapeutic roles of Diosmin in human diseases. *Biomedicines* (2022). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9138579/>. (Accessed: 18th September 2024)
  19. F. Valdés. Vitamina C. *Actas dermo-sifiliográficas/Actas dermo-sifiliográficas* 97, 557–568 (2006).
  20. Serra, H. M. & Cafaro, T. A. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Sistema de Información Científica Redalyc* <https://www.redalyc.org/pdf/535/53541410.pdf> (2006).
  21. National institute of health, office of dietary supplements. Datos sobre la vitamina

- C ¿Qué es la vitamina C? ¿Para qué sirve?  
<https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminC-DatosEnEspañol.pdf> (2019).
22. Análisis de viabilidad y proliferación celulares. *Sigmaaldrich.com* (2016)  
 doi:<https://doi.org/dogri>.
  23. Caracterización molecular de los efectos antioxidantes del ácido oleanólico en cardiomiocitos. Relevancia en miocarditis. *Revista Española de Cardiología*  
<https://www.revespcardiol.org/es-congresos-sec--el-congreso-de-las-enfermedades-car-13-sesion-nuevos-conocimientos-en-enfermedades-de--1117-caracterizacion-molecular-de-los-efectos-11901> (2014)
  24. Kim, H. & Xue, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *Journal Of Visualized Experiments* (2020) doi:10.3791/60682.
  25. Xin, X., Gong, T. & Hong, Y. Hydrogen peroxide initiates oxidative stress and proteomic alterations in meningotheial cells. *Scientific Reports* **12**, (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-18548-3
  26. Wójciak, M. *et al.* Antioxidant Potential of Diosmin and Diosmetin against Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Molecules* **27**, 8232 (2022).  
<https://doi.org/10.3390/molecules27238232>
  27. Ludke, A., Akolkar, G., Ayyappan, P., Sharma, A. K. & Singal, P. K. Time course of changes in oxidative stress and stress-induced proteins in cardiomyocytes exposed to doxorubicin and prevention by vitamin C. *PLoS ONE* **12**, (2017)  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179452>
  28. V, Niño Giraldo. Evaluación de la actividad antioxidante de la quercetina nanovehiculizada en sistemas liposomales sobre las células de hipocampo de ratas. Trabajo de grado, Universidad ICESI, Santiago de Cali (2018)
  29. Boisnic, S. *et al.* Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Diosmetin-3-O- $\beta$ -d-Glucuronide, the Main Metabolite of Diosmin: Evidence from Ex Vivo Human Skin Models. *Molecules* **28**, 5591 (2023).

<https://doi.org/10.3390/molecules28145591>

30. Huwait, E. & Mobashir, M. Potential and Therapeutic Roles of Diosmin in Human Diseases. *Biomedicines* 10, 1076 (2022). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051076>
31. Fu, S. et al. Extracellular vesicles in cardiovascular diseases. *Cell Death Discovery* 6, 68 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00305-y>
32. Chong, S. Y. et al. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Alternative Biomarker Sources, Therapeutic Agents, and Drug Delivery Carriers. *International Journal Of Molecular Sciences* 20, 3272 (2019). doi: 10.3390/ijms20133272
33. Saheera, S., Jani, V. P., Witwer, K. W. & Kutty, S. Extracellular vesicle interplay in cardiovascular pathophysiology. *AJP Heart And Circulatory Physiology* 320, H1749-H1761 (2021). doi: 10.1152/ajpheart.00925.2020
34. Antonieta, C. P. C., Sol, M. S. M. & Sergio, B. V. Efecto de la quercetina sobre la expresión génica relacionada con el metabolismo energético en diferentes tejidos de ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol. Trabajo de grado, Universidad de Chile, (2016).
35. Vincente-Vicente, Prieto & Morales. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista de Toxicología* 30, 171-181 (2013).
36. Camilla, F. Todo sobre la quercetina – efectos, necesidades, ingesta y dosis. BIOGENA [https://biogena.com/es-es/saber/guia/quercetina\\_bba\\_3982999](https://biogena.com/es-es/saber/guia/quercetina_bba_3982999) (2024).
37. Buchholz, H., Meduski, J. Composición que comprende isoquercetina y ácido ascórbico en una forma de liberación sostenida. Merck Patent GmbH. (2020).