

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Rol de la mitofagia en la desdiferenciación de las
células musculares lisas inducida por PDGF-BB***

Memoria presentada a la Universidad de Chile para optar al Título de
Bioquímico por:

Tamara Isidora González Rivera

Director de Tesis: Dr. Mario Chiong Lay

Santiago-Chile

Enero 2024

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecerles a mis padres, mis hermanos y a toda mi familia, especialmente a mi abuelita, que siempre han sido un gran pilar en mi existencia, gracias por su apoyo y cariño incondicional, por confiar en mis capacidades cuando yo no lo hice.

Quisiera agradecer sobre todo a mi director de tesis, el profesor Mario Chiong, que desde el primer momento no dudó en aceptarme en su laboratorio aun cuando tenía cero experiencia. Gracias por su infinita paciencia y disposición a enseñarme siempre. Sinceramente no estaría aquí sin su apoyo y confianza.

A todas las personas del laboratorio, que siempre fueron muy amables y comprensivos, dispuestos a enseñarme y darme consejos, de ellos aprendí la importancia del trabajo colaborativo en la investigación. A don Fidel y a la señora Gindra, por siempre estar dispuestos a ayudarme y a solucionar los problemas que surgían. A la Feña por apadrinarme cuando recién llegué al laboratorio. A el profesor Roberto, por toda su paciencia y enseñanzas. A el profesor Jaime, por sus consejos y por alentarme a persistir frente a las dificultades que surgieron. Y sobre todo quisiera agradecerle profundamente al Apu, quien me guio durante este proceso y me salvó en múltiples ocasiones, no lo hubiera logrado sin su apoyo.

A mis compañeras de viaje, que tuve el honor de conocer durante el primer semestre y con las he recorrido este largo camino. Su dedicación a la investigación siempre me ha motivado. Gracias de corazón por su amistad y apoyo incondicional, que han sido parte fundamental en este viaje, y sin las que no habría llegado aquí.

Además, quisiera agradecer a todas las personas, cuya presencia en mi vida me han animado a recorrer este camino, especialmente a Fardina, Tamara, Tesla, Darwin y Lewis por su apoyo inconmensurable.

Muchas gracias a todos.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Remodelado y Metabolismo Vascular, Advanced Center of Chronic Diseases (ACCDiS), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1220392, y FONDAP ACCDiS 15130011 y 1523A0008.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades cardiovasculares	1
1.2. Células musculares lisas vasculares	1
1.3. Cambio de fenotipo y ECV	2
1.4. Regulación del cambio de fenotipo	3
1.5. Autofagia.....	4
1.6. Mitocondrias y cambio de fenotipo	6
1.7. Metabolismo mitocondrial y cambio de fenotipo.	6
1.8. Morfología mitocondrial y cambio de fenotipo.	6
1.9. Mitofagia	7
1.10. Mitofagia y VSMC	10
2. HIPÓTESIS.....	11
3. OBJETIVO GENERAL	11
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
5. METODOLOGÍA.....	12
5.1. Reactivos y Anticuerpos.....	12
5.2. Cultivo de células.....	12
5.3. Tratamientos.....	12

5.4. Aislamiento de mitocondrias.....	12
5.5. Preparación de muestras para Western blot.	13
5.6. Western blot.....	13
6. RESULTADOS	15
6.1 Efecto de PDGF-BB sobre la dediferenciación de las VSMC.....	15
6.2. Efecto de PDGF-BB sobre la autofagia en VSMC	16
6.3. Efecto de PDGF-BB sobre la mitofagia en VSMC	16
6.4. Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de proteína mitocondrial en VSMC.....	19
7. DISCUSIÓN.....	21
8. CONCLUSIONES	26
9. REFERENCIAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema simplificado de las vías de mitofagia.....	9
Figura 2.	Efecto de PDGF-BB en los niveles de α -SMA, calponina y SM22 α en A7r5. .	15
Figura 3.	Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de p62 en A7r5.	16
Figura 4.	Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de PINK1 y Parkin en A7r5.	17
Figura 5.	Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de PINK1 en extracto mitocondrial de A7r5.....	18
Figura 6.	Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de BNIP3 en extracto mitocondrial de A7r5.....	19
Figura 7.	Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de mtHsp70 en A7r5.	20

ABREVIATURAS

α -SMA	: α - actina del músculo liso
Atg	: Proteína relacionada con la autofagia
CCCP	: Carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona
ECV	: Enfermedades cardiovasculares
FBS	: Suero fetal bovino
HASMC	: Células musculares lisas aórticas humanas
kDa	: Kilo Dalton
KLF4	: Factor 4 Kruppel-like
LC3	: Proteína 1 asociada al microtúbulo 3
LDL	: Lipoproteínas de baja densidad
LIR	: Región común de interacción con LC3
MAPK	: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	: Matriz extracelular
mtHSP70	: Proteína de shock térmico 70 mitocondrial
MYOCD	: Miocardina
OXPPOS	: Fosforilación oxidativa
PASMC	: Células musculares lisas vasculares de la arteria pulmonar
PBS	: Amortiguador fosfato salino
PDGFR	: Receptor de PDGF
PDGF-BB	: PDGF isoforma BB
PINK1	: Quinasa putativa 1 inducida por PTEN
RASMC	: Células musculares lisas vasculares de rata
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
rpm	: Revoluciones por minuto
SM22 α	: Músculo liso 22 α
SRF	: Factor de transcripción de respuesta sérica
TBS-T	: Amortiguador Tris salino 0,1% Tween 20
TGF- β	: Factor de crecimiento transformante- β
TOM	: Translocasas de la membrana externa
VSMC	: Células musculares lisas vasculares

RESUMEN

Las células musculares lisas vasculares (VSMC) son el componente principal de la capa media de vasos sanguíneos. Gracias a su capacidad de contracción, se encargan de la regulación del tono vascular y la presión arterial. Estas células son capaces de modificar su fenotipo frente a señales ambientales. Al producirse daño vascular, las VSMC se desdiferencian a un fenotipo sintético proliferativo, caracterizado por una alta tasa de proliferación y migración celular, un aumento de la síntesis de componentes de matriz extracelular (ECM) y una reducción de marcadores específicos de VSMC, como son las proteínas contráctiles. La desdiferenciación desregulada/persistente de las VSMC corresponde a un evento común de distintas enfermedades cardiovasculares (ECV), principal causa de muerte tanto en Chile como en el mundo.

El principal factor desdiferenciador de las VSMC es el factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma BB (PDGF-BB), que se libera al producirse una lesión vascular por las células endoteliales y las plaquetas. PDGF-BB se une a su receptor en la membrana de las VSMC, activando diferentes vías de señalización que culminan en la inhibición de la expresión de genes específicos del músculo liso y la inducción de la expresión de genes asociados a la proliferación. Se ha demostrado que en VSMC, PDGF-BB induce la autofagia, un mecanismo de degradación y reciclaje de los componentes citoplasmáticos. La inhibición de este proceso evita la adquisición del fenotipo sintético-proliferativo. Por otro lado, durante el cambio de fenotipo de las VSMC se han demostrado cambios tanto en la función como en la morfología mitocondrial. PDGF-BB induce la fisión mitocondrial, proceso de fragmentación de la red mitocondrial en mitocondrias de menor tamaño, y esta es requerida para la adquisición del fenotipo desdiferenciado en las VSMC. *Sin embargo, todavía no se ha estudiado si existe una relación entre el cambio de fenotipo en las VSMC y el proceso de la mitofagia, un tipo autofagia selectiva que implica la degradación de las mitocondrias y que es precedida por la fisión mitocondrial.* En este sentido, se propuso como hipótesis que: **“En la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares de rata inducida por el factor derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) ocurre la activación de mitofagia”**. Para ello se plantearon como objetivos específicos: 1) Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la inducción de desdiferenciación en A7r5, 2) Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la inducción de autofagia en A7r5 y 3) Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la inducción de mitofagia en A7r5.

Se utilizó como modelo de estudio de la línea de celular de VSMC de aorta de rata A7r5. Las células se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB a distintos periodos de tiempo, desde 0 a 360 minutos, y se evaluaron mediante Western blot marcadores de desdiferenciación (calponina, α -SMA y SM22), marcador de autofagia (p62), marcadores de mitofagia (PINK1, Parkin y BNIP3), y la proteína mitocondrial mtHsp70. Se determinó que la estimulación de las células con PDGF-BB disminuyó los niveles de proteínas contráctiles, produjo el aumento moderado de los niveles de p62 y el aumento de los niveles de PINK1, Parkin y BNIP3, pero no tuvo efecto en los niveles de la proteína mitocondrial mtHsp70.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento se podría concluir que durante el proceso de la desdiferenciación de las células A7r5 inducida por PDGF-BB, se activaría la mitofagia mediada por PINK y Parkin y probablemente también por BNIP3.

SUMMARY

Role of mitophagy in the vascular smooth muscle cell dedifferentiation induced by PDGF-BB

Vascular smooth muscle cells (VSMC) are the main component of the media layer of blood vessels. Thanks to their contractile ability, they are responsible for regulating vascular tone and blood pressure. These cells can modify their phenotype in response to environmental signals. In vascular damage, VSMC dedifferentiate to a proliferative synthetic phenotype, characterized by a high rate of cell proliferation and migration, increased synthesis of extracellular matrix (ECM) components, and a reduction in specific VSMC markers, such as contractile proteins. The uncontrolled/persistent dedifferentiation of VSMC is a common event in various cardiovascular diseases (CVD), a leading cause of death both in Chile and worldwide.

The main dedifferentiating factor for VSMC is platelet-derived growth factor isoform BB (PDGF-BB), which is released during vascular injury by endothelial cells and platelets. PDGF-BB binds to its receptor on the VSMC membrane, activating different signaling pathways that result in the inhibition of smooth muscle-specific gene expression and the induction of genes associated with proliferation. It has been demonstrated that PDGF-BB induces autophagy in VSMC, a mechanism for the degradation and recycling of cytoplasmic components. Inhibition of this process prevents the acquisition of the synthetic-proliferative phenotype. Additionally, changes in mitochondrial function and morphology have been observed during the phenotypic transition of VSMC. PDGF-BB induces mitochondrial fission, a process involving the fragmentation of the mitochondrial network into smaller mitochondria, which is required for the acquisition of the dedifferentiated phenotype in VSMC. However, it has not yet been studied whether there is a relationship between the phenotypic transition in VSMC and the mitophagy, a selective autophagy involving the degradation of mitochondria that is preceded by mitochondrial fission. Therefore, the proposed hypothesis is that: 'Mitophagy is activated during the dedifferentiation of rat vascular smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB).' The specific objectives were: 1) To determine the effect of PDGF-BB on the induction of dedifferentiation in A7r5, 2) To determine the effect of PDGF-BB on the induction of

autophagy in A7r5, and 3) To determine the effect of PDGF-BB on the induction of mitophagy in A7r5.

The VSMC cell line from rat aorta, A7r5, was used as the study model. Cells were treated with 20 ng/mL of PDGF-BB at different time periods, from 0 to 360 minutes, and evaluated using Western blot for dedifferentiation markers (calponin, α -SMA, and SM22), autophagy marker (p62), mitophagy markers (PINK1, Parkin, and BNIP3), and the mitochondrial protein mtHsp70. It was determined that PDGF-BB stimulation decreased contractile protein levels, moderately increased p62 levels, and increased PINK1, Parkin, and BNIP3 levels, but had no effect on the levels of the mitochondrial protein mtHsp70.

Based on the results obtained so far, it could be concluded that during the dedifferentiation process of A7r5 cells induced by PDGF-BB, mitophagy mediated by PINK and Parkin, and probably also by BNIP-3, is activated.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) corresponden al conjunto de patologías crónicas que afectan al sistema circulatorio. Son la principal causa de muerte a nivel mundial, ocasionando alrededor de 17,9 millones de defunciones cada año (WHO, 2019). A nivel nacional, las ECV fueron responsables del 29.035 de las muertes durante el año 2020 que corresponde al 23%, de acuerdo con el Departamento de Estadísticas e Información de Salud (MINSAL, 2023). Se proyecta que estas cifras podrían aumentar, debido el incremento en la prevalencia de factores de riesgo asociados al padecimiento de ECV como la obesidad, sedentarismo, tabaquismo y alcoholismo, entre otros (Mendoza-Torres *et al.*, 2019; MINSAL, 2017). De modo que comprender los procesos fisiopatológicos asociados al desarrollo y progresión de estas enfermedades se ha convertido en el objetivo central de diversas investigaciones, con el fin de prevenirlas y encontrar posibles objetivos terapéuticos. Si bien la fisiopatología de ECV implica la participación de múltiples componentes, uno de los que juega un rol clave corresponde a las células musculares lisas vasculares (VSMC).

1.2. Células musculares lisas vasculares

Las VSMC son el principal componente de la capa media de los vasos sanguíneos, están rodeadas por matriz extracelular (MEC) (Yap *et al.*, 2021). Estas células tienen la capacidad de contraerse y relajarse, regulando el diámetro de los vasos sanguíneos y con ello el flujo sanguíneo y la presión arterial (Owens *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2020).

Las VSMC diferenciadas adquieren un fenotipo “contráctil” que se caracteriza por una baja tasa de proliferación y migración, además de la reducción de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (ECM). Estas células presentan proteínas contráctiles específicas del músculo liso como calponina, transgelina o músculo liso 22 α (SM22 α), cadena pesada de miosina del músculo liso y α -actina del músculo liso (α -SMA), que en su conjunto pueden ser utilizados como marcadores de diferenciación celular (Owens *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2020).

Las VSMC presentan una alta plasticidad, a diferencia de otras células musculares, por lo que son capaces de modificar su fenotipo en respuesta a la integración de las señales

ambientales. Las VSMC pueden adquirir una diversidad de fenotipos como contráctil-quiescente, proliferativo-sintético, osteogénico, macrófago o similar a células madre mesenquimal y con ello desempeñar distintas funciones de acuerdo con el contexto específico (Frismantiene *et al.*, 2018; Owens *et al.*, 2004; Yap *et al.*, 2021). Al producirse daño vascular, las VSMC se desdiferencian, adquiriendo un fenotipo “sintético-proliferativo”, caracterizado por una alta tasa de proliferación y migración, aumento de la síntesis de MEC como el colágeno y la osteopontina, la reducción de la expresión y contenido de las proteínas específicas de VSMC que forman parte de la maquinaria contráctil. Estos cambios ocurren mientras se produce el aumento de la expresión de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular como la calmodulina y las ciclinas (Frismantiene *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020). La adquisición de este fenotipo desdiferenciado corresponde a un proceso fisiológico, al ocurrir en una baja tasa de eventos y de forma transitoria, dado que permite que las VSMC restauren la integridad del tejido vascular (Frismantiene *et al.*, 2018; Owens *et al.*, 2004).

1.3. Cambio de fenotipo y ECV

En condiciones patológicas, existe una desregulación de la transición de fenotipo, y se produce una desdiferenciación persistente de las VSMC. La desdiferenciación de las VSMC es un evento común en las distintas ECV, contribuyendo significativamente en su desarrollo y progresión (Frismantiene *et al.*, 2018; Owens *et al.*, 2004). En la aterosclerosis, producto de la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) aterogénicas en la capa íntima, se liberan factores de crecimiento y citoquinas inflamatorias que promueven la desdiferenciación de las VSMC. Las VSMC desdiferenciadas migran a la capa íntima donde proliferan y secretan colágeno, contribuyendo al estrechamiento del vaso sanguíneo y con ello a la progresión de la enfermedad (Frismantiene *et al.*, 2018; Owens *et al.*, 2004; Rzucidlo *et al.*, 2007). En la reestenosis, el estrechamiento del vaso es causado principalmente por la proliferación y migración de VSMC desdiferenciadas (Rzucidlo *et al.*, 2007). En la hipertensión, la desdiferenciación de las VSMC desencadena el remodelado vascular, principalmente de los vasos de resistencia, y en conjunto al aumento del tono vascular, producen el aumento de la resistencia vascular, característica esencial de esta enfermedad (Owens *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2017).

1.4. Regulación del cambio de fenotipo

El cambio de fenotipo de las VSMC es resultado de la integración de múltiples señales, por lo que corresponde a un proceso altamente regulado a distintos niveles. A nivel transcripcional, el factor de transcripción de respuesta sérica (SRF), en conjunto con su cofactor miocardina (MYOCD) se unen a la secuencia de cajas CArG de los promotores de los genes específicos de VSMC e inducen su expresión (Frisantiene *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2008; Miano, 2015). Estos dos factores son mediadores claves en la adquisición de fenotipo contráctil de las VSMC. Otro factor transcripcional fundamental en el cambio del fenotipo es el factor 4 Kruppel-like (KLF4), que regula negativamente la expresión de genes específicos de VSMC a través de distintos mecanismos: al inhibir la expresión de MYOCD, al unirse al elemento represor G/C en los promotores de genes específicos de VSMC o interaccionando con SRF para impedir su unión CArG (Liu *et al.*, 2005; Salmon *et al.*, 2012).

A nivel epigenético, un regulador maestro del cambio de fenotipo es el factor Tet metilcitosina dioxigenasa 2 que actúa río arriba de MYOCD/SRF y KLF4. Este factor, mediante el control de la accesibilidad a la cromatina, promueve la expresión de genes asociados a la diferenciación y reprime los genes asociados a la desdiferenciación (Liu *et al.*, 2013).

A nivel ambiental, la regulación es mediada por factores humorales que participan en la mantención del fenotipo contráctil, como por ejemplo el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Frisantiene *et al.*, 2018). Esta citoquina es fundamental en el desarrollo y estabilidad vascular (Pardali *et al.*, 2010). TGF- β induce la diferenciación de VSMC activando las vías Smad3 y p38/MAPK, que conllevan a la expresión de genes marcadores de VSMC (Pardali *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010). Otra proteína que mantiene el fenotipo contráctil es el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) que a través de la vía PI3K/Akt reprime la expresión de genes asociados a la desdiferenciación en VSMC (Hayashi *et al.*, 1999).

Por otro lado, existen factores humorales capaces de inducir el fenotipo sintético-proliferativo. El factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma BB (PDGF-BB) se ha descrito como el principal factor de la desdiferenciación de las VSMC. Es liberado principalmente por las plaquetas, macrófagos y células endoteliales al producirse una lesión vascular (Mack, 2011; Owens *et al.*, 2004). Este factor es un homodímero que se une a su receptor de tipo tirosina quinasa (PDGFR β) presente en la membrana de las

VSMC, activando la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK e induciendo la expresión de genes de desdiferenciación y la represión de genes específicos de las VSMC (Frismantiene *et al.*, 2018; Mack, 2011). En el cambio de fenotipo inducido por PDGF-BB participan los factores de transcripción KLF4 y Elk-1. PDGF-BB induce la expresión de KLF4 y la fosforilación de Elk-1. Ambos factores son capaces de interactuar con SRF, impidiendo la formación del complejo SRF-MYOC y con ello inhibir la expresión de marcadores contráctiles. Estudios *in vitro* con VSMC de aortas de ratas (RASMC) y humanas (HASMC) han demostrado que PDGF-BB estimula la proliferación y migración celular, además de inducir el cambio a un fenotipo sintético-proliferativo (Li *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2019; Salabei *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2016). También, en HASMC, PDGF-BB induce la fosforilación de mTOR/P70S6K y este último, al ser inhibido con rapamicina, atenúa el efecto de PDGF-BB sobre la proliferación y migración celular, y los niveles de proteínas contráctiles de las VSMC (Liu *et al.*, 2019).

1.5. Autofagia

La autofagia corresponde a un proceso de degradación y reciclaje intracelular, fundamental para la homeostasis celular, debido a que permite mediante la degradación de organelos dañados la obtención de metabolitos que pueden volver a ser utilizados por la célula (Parzych & Klionsky, 2014). La autofagia ocurre en forma basal a bajos niveles y es inducida frente a distintos estímulos como falta de nutrientes, infecciones, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático, presencia o ausencia de factores de crecimiento e hipoxia (Mizushima *et al.*, 2008; Yang & Klionsky, 2010). Debido a que la autofagia actúa como una respuesta protectora frente a condiciones estresantes, la desregulación de este proceso se encuentra relacionada con distintas patologías (Mizushima *et al.*, 2008; Parzych & Klionsky, 2014).

La autofagia consiste en la captura de componentes citoplasmáticos en autofagosomas, vesículas citosólicas de doble membrana, que transportan los componentes a los lisosomas. Los autofagosomas provienen de una estructura inicial denominada fagoforo, la cual requiere del complejo Beclin1/PI3KIII/Atg14 para su formación (Gatica *et al.*, 2015; Parzych & Klionsky, 2014). El fagoforo se expande mediante la participación de un complejo formado por las proteínas relacionadas con la autofagia Atg5-Atg12-Atg16 y la proteína 1 asociada al microtúbulo 3 (LC3) (Gatica *et al.*, 2015). El alargamiento permite rodear completamente el material citoplasmático y formar finalmente

el autofagosoma (Parzych & Klionsky, 2014; Yang & Klionsky, 2010). La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana de los lisosomas formando el autofagolisosoma. Las hidrolasas y el ambiente ácido dentro del lisosoma permiten la degradación los componentes capturados y los metabolitos obtenidos son exportados al citoplasma a través de permeasas, proteínas integradas en la membrana del autofagolisosoma, para que sean utilizados por la célula (Mizushima, 2007; Yorimitsu & Klionsky, 2005).

La autofagia se encuentra involucrada en distintas funciones de las VSMC, como la proliferación y la migración. En varios estudios realizados en HASMC y RASMC, demuestran que PDGF-BB induce la autofagia y que esta es requerida para la desdiferenciación inducida por este factor de crecimiento (Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2019; Salabei *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2016). Las VSMC tratadas con PDGF-BB por 24 y 48 horas presentan un aumento de los niveles de LC3-II, Atg5, y autofagosomas, marcadores que son indicativos de autofagia. Al inhibir la autofagia farmacológicamente usando 3-metiladenina, bafilomicina A1 y spautin-1, se reprime la adquisición del fenotipo sintético-proliferativo (Li *et al.*, 2014; Salabei *et al.*, 2013). La activación de la autofagia generalmente es mediada por la inhibición de mTOR. Sin embargo, en VSMC tratadas con PDGF-BB se observó un aumento de la fosforilación de mTOR y con ello su activación (Liu *et al.*, 2019). Esto que sugiere que la autofagia inducida por PDGF-BB es independiente de la vía mTOR (Liu *et al.*, 2019; Salabei *et al.*, 2013). Se ha descrito que U0126, inhibidor de Erk1/2, disminuye la expresión de marcadores de autofagia como LC3 I/II y Atg, demostrando así que PDGF-BB induce la autofagia de VSMC a través de Erk1/2 (Han *et al.*, 2021).

La autofagia puede ser un proceso específico, eliminando selectivamente agregados proteicos, organelos y componentes celulares dañados. En este proceso, el componente celular específico es reconocido por los receptores de autofagia. Éstos tienen un motivo de interacción Atg8 o la región común de interacción con LC3 (LIR) que permite la unión selectiva con las proteínas Atg8/LC3 para que se produzca el reconocimiento y la captura de la carga al interior de los autofagosomas (Li *et al.*, 2021). Dentro de las cargas específicas se encuentran los peroxisomas, las proteínas ubiquitinadas, los ribosomas y las mitocondrias (Parzych & Klionsky, 2014).

1.6. Mitocondrias y cambio de fenotipo

Las mitocondrias son organelos que tienen como principal función la regulación del metabolismo energético, se encargan de la producción de adenosina trifosfato a partir de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Además, las mitocondrias contribuyen en la biosíntesis de distintas moléculas como lípidos, ácidos nucleicos y aminoácidos, regulan la apoptosis y participan en la homeostasis del calcio en conjunto con el retículo endoplásmico (Brand & Nicholls, 2011). Dado que las mitocondrias cumplen un rol central en la homeostasis celular, se encuentran estrechamente relacionadas con el cambio de fenotipo de VSMC.

1.7. Metabolismo mitocondrial y cambio de fenotipo.

Las VSMC desdiferenciadas presentan un metabolismo celular alterado, que se caracteriza por un aumento de la glucólisis y una disminución de la oxidación de la glucosa, en conjunto con un aumento de la oxidación de los ácidos grasos (Jia *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020). Estos cambios en el metabolismo, lleva a un aumento de la producción de lactato, que se ha descrito como inductor del fenotipo sintético (Yang *et al.*, 2017). Un estudio *in vitro* realizado en VSMC de rata, describió que PDGF-BB disminuye la respiración mitocondrial, reduciendo la tasa de consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial a las 24 horas de tratamiento (Sanhueza-Olivares, 2017). Estos resultados concuerdan con lo observado en las placas ateroscleróticas, en que las VSMC presentan alteraciones en la respiración mitocondrial, que se manifiesta en la disminución de OXPHOS (Docherty *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020). De hecho, un estudio en VSMC de los ratones deficientes de proteína de la matriz oligomérica del cartílago, describió que el tratamiento con un inhibidor de la OXPHOS promueve la desdiferenciación de VSMC, que se ve reflejado en la disminución de los niveles de las proteínas contráctiles (Jia *et al.*, 2018). Estos antecedentes permiten sugerir que el metabolismo mitocondrial participa en la transición fenotipo de las VSMC, lo que respalda la idea de que las mitocondrias son esenciales en la modulación del fenotipo de las VSMC.

1.8. Morfología mitocondrial y cambio de fenotipo.

La función mitocondrial se encuentra directamente asociada a la estructura mitocondrial. Este organelo modifica su morfología de acuerdo con los requerimientos energéticos de la célula en respuesta a estímulos ambientales (Vasquez-Trincado *et al.*, 2016). La dinámica mitocondrial se produce mediante el proceso de fisión, fragmentación

de la red mitocondrial en mitocondrias pequeñas, y el proceso de fusión, unión de mitocondrias de menor tamaño formando mitocondrias más alargadas (Luan *et al.*, 2021).

La dinámica mitocondrial se encuentra involucrada en el cambio de fenotipo en las VSMC, dado que el equilibrio entre la fisión y fusión mitocondrial regula la migración y proliferación celular, características principales de las VSMC desdiferenciadas (Xia *et al.*, 2023). Se ha demostrado que la disminución de la fragmentación mitocondrial reduce la hiperplasia de la íntima en modelos de ratones con lesión arterial (Wang *et al.*, 2015). Esto concuerda con lo observado en un modelo de hipertensión pulmonar, donde el aumento de la fisión mitocondrial promueve la proliferación de VSMC de la arteria pulmonar, mientras que la inhibición de la fisión mitocondrial disminuye la proliferación celular (Liu *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2023). En la calcificación vascular, la inhibición de la fisión mitocondrial con Mdivi-1 reduce la adquisición de las características del fenotipo osteogénico de VSMC (Liu *et al.*, 2022). En el remodelado vascular, el fenotipo sintético-proliferativo de las VSMC se encuentra asociado con alteraciones en la morfología mitocondrial. Las VSMC desdiferenciadas presentan mitocondrias fragmentadas. De hecho, se ha demostrado que PDGF-BB induce la fisión mitocondrial dependiente de proteína relacionada con la dinamina-1, al promover la fosforilación de esta proteína en la serina 616 y con ello estimular su interacción con la red mitocondrial (Salabei & Hill, 2013; Torres *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015). Se ha propuesto que la fisión mitocondrial es un proceso necesario para que se produzca la adquisición del fenotipo sintético-proliferativo. Su inhibición reduce la proliferación y la migración celular inducida por PDGF-BB, a pesar de que no se evita la disminución de los niveles de proteínas contráctiles (Salabei & Hill, 2013; Torres *et al.*, 2016).

1.9. Mitofagia

La mitofagia, o degradación selectiva de las mitocondrias por autofagia, elimina las mitocondrias dañadas, para su posterior renovación por biogénesis (Pickles *et al.*, 2018). La mitofagia se lleva a cabo principalmente mediante dos mecanismos: mitofagia mediada por receptores o mediada por ubiquitinación (Onishi *et al.*, 2021). En la mitofagia mediada por receptores, las proteínas integradas en la membrana mitocondrial interactúan directamente con LC3 mediante el motivo LIR, permitiendo el reclutamiento de las mitocondrias dañadas al autofagosoma (Killackey *et al.*, 2020). Los principales receptores de mitofagia identificados corresponden a BNIP3, NIX (BNIP3L), FUNDC1 y BCL2L13. La

proteína BNIP3 participa específicamente en la mitofagia inducida por la hipoxia, sus niveles son inducidos por el factor inducible por hipoxia 1α . BNIP3 es una proteína citosólica que se transloca a la mitocondria integrándose en su membrana externa, además presenta un dominio LIR, que permiten su interacción con LC3 (Onishi *et al.*, 2021; Pickles *et al.*, 2018). NIX es una proteína mitocondrial que participa en la mitofagia durante la maduración de los eritrocitos, e interacciona con LC3 mediante su motivo LIR. La proteína NIX presenta una alta homología con BNIP3 y, al igual que este, participa en la mitofagia mediada por hipoxia (Onishi *et al.*, 2021; Pickles *et al.*, 2018). En condiciones de hipoxia, FUNDC1 es fosforilada por ULK1 y desfosforilada por PGAM5 en residuos cercanos a la región LIR, lo que estabiliza su interacción con LC3 y promueve la mitofagia (Li *et al.*, 2021; Onishi *et al.*, 2021). También se ha descrito a Bcl2L13, una proteína relacionada con la fisión mitocondrial, actúa como un receptor de la mitofagia, ya que interacciona con LC3 mediante sus motivos LIR (Onishi *et al.*, 2021).

La mitofagia mediada por ubiquitinación es un proceso donde el reclutamiento del autofagosoma se produce por la ubiquitinación de proteínas mitocondriales y su interacción con proteínas adaptadoras (Onishi *et al.*, 2021). En mitocondrias funcionales, la quinasa putativa inducida por PTEN 1 (PINK1) se dirige continuamente a las mitocondrias a través de una secuencia de orientación mitocondrial, donde es escindido de forma constitutiva por peptidasas de procesamiento de matriz y romboideos asociados a presenilina, y degradado por el proteosoma (Pickles *et al.*, 2018). Al producirse una disminución del potencial de la membrana mitocondrial, debido a un daño, se reduce la degradación de PINK1 acumulándose en la membrana externa mitocondrial mediante translocasas de la membrana externa (TOM). PINK1 se activa mediante autofosforilación, recluta y fosforila a la E3-ubiquitina ligasa Parkin (Killackey *et al.*, 2020; Onishi *et al.*, 2021). Parkin activada poliubiquitina varias proteínas de superficie, por ejemplo, el canal de aniones dependiente de voltaje-1, mitofusina 1/2 y Miro 1 (Onishi *et al.*, 2021). Estos sustratos poliubiquitinados son reconocidos por proteínas adaptadoras, específicamente p62, OPTN, NDP52, TAX1BP1 y NBR1, que interaccionan con LC3, permitiendo reclutar a las mitocondrias marcadas hacia el autofagosoma (Killackey *et al.*, 2020; Onishi *et al.*, 2021; Pickles *et al.*, 2018).

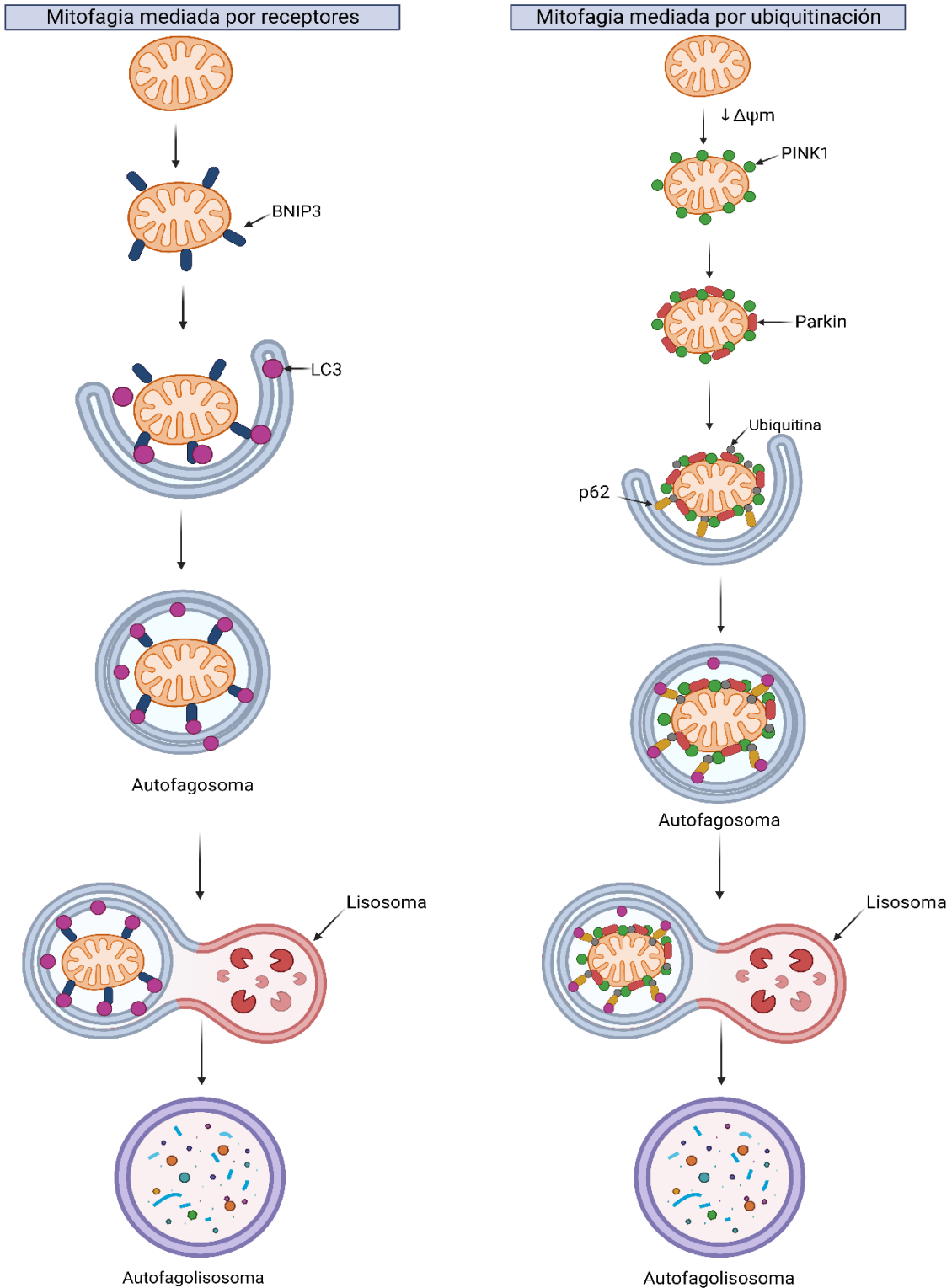


Figura 1. Esquema simplificado de las vías de mitofagia.

(A) Mitofagia mediada por receptores, específicamente BNIP3. **(B)** Mitofagia mediada por ubiquitinación, dependiente de PINK1 y Parkin. Adaptado de Parzych KR *et al* (Parzych & Klionsky, 2014).

1.10. Mitofagia y VSMC

La eliminación de mitocondrias dañadas es crucial para la homeostasis celular, por lo que la alteración de mitofagia está relacionada con varias patologías, incluidas las ECV (Morciano *et al.*, 2020). Las investigaciones sobre el rol de la mitofagia en las ECV se han centrado principalmente en los cardiomiocitos y sus efectos en la insuficiencia cardiaca, isquemia y reperfusión, entre otras, mientras que el papel de la degradación selectiva de mitocondrias en VSMC y en patologías vasculares no ha sido estudiado en profundidad. Se ha descrito que la mitofagia desempeñaría principalmente un rol protector al reducir las señales pro-apoptóticas, evitando con ello la activación de la muerte celular inducida por estrés oxidativo (Liu *et al.*, 2022; Swiader *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2023). Un estudio en VSMC humanas, ha demostrado que la mitofagia mediada por PINK1 y Parkin reduce la apoptosis inducida por LDL oxidadas, que se ha asociado con la adquisición de características de placa aterosclerótica vulnerables (Swiader *et al.*, 2016). De este modo, la mitofagia podría contribuir en la estabilidad de la placa aterosclerótica. En un estudio realizado con un modelo de ratón aterosclerótico, se ha propuesto que la mitofagia dentro de la lesión aterosclerótica podría mediar el efecto protector de la melatonina en la estabilización de la placa, al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación del inflammasoma NLRP3 (Ma *et al.*, 2018). Aunque se ha descrito que la mitofagia puede llegar a ser perjudicial, un estudio realizado en cultivos de HASMC y en lesiones ateroscleróticas de ratones ApoE^{-/-}, ha demostrado que la mitofagia dependiente de PINK1/Parkin promueve la proliferación de VSMC inducida por apelin-13, por lo que podría contribuir a la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas (He *et al.*, 2019).

Si bien la mitofagia se encuentra involucrada en condiciones patológicas donde las VSMC expresan un fenotipo sintético-proliferativo, y se ha demostrado que la mitofagia regula la proliferación y migración de ese tipo celular, no se ha logrado establecer una relación directa entre la mitofagia y la modulación del fenotipo. Hasta el momento, solo se ha descrito que la inhibición de la mitofagia BNI3P puede contribuir en la adquisición de fenotipo osteogénico de las VSMC durante la calcificación vascular (Liu *et al.*, 2022), pero el rol de la mitofagia en la inducción del fenotipo sintético-proliferativo no ha sido dilucidado.

2. HIPÓTESIS

En la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares de rata inducida por el factor crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) ocurre la activación de mitofagia.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia de mitofagia durante la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares inducida por PDGF-BB.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la inducción de desdiferenciación en A7r5
- Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la inducción de autofagia en A7r5
- Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la inducción de mitofagia en A7r5.

5. METODOLOGÍA

5.1. Reactivos y Anticuerpos

Se utilizó el PDGF-BB humano recombinante (rhPDGF-BB) PeproTech (cta 100-14B). Se utilizaron anticuerpos primarios dirigidos a PINK-1 (ab23707, 1:1000), Parkin (ZRB 1728, 1:1000), BNIP3 (ab109362, 1:1000), p62 (ab109012, 1:1000), mtHsp70 (proteína de shock térmico 70 mitocondrial, MA3-028, 1:2000) y β -tubulina (Sigma, 1:1000). Se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano anti-rabbit (1:5000) y anti-mouse (1:5000).

5.2. Cultivo de células.

Se utilizó la línea celular A7r5, correspondiente a VSMC provenientes de la aorta torácica de rata embrionaria. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 mg/mL). Las células se mantuvieron a una temperatura de 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5%.

5.3. Tratamientos.

Las células A7r5 se cultivaron en placas de 60 mm y 100 mm dependiendo del experimento y se utilizaron una vez que alcanzaron una confluencia de 80% aproximadamente. 18-24 horas antes del tratamiento, se reemplazó el medio de cultivo suplementado con 10% FBS por medio con un contenido de 2% FBS. Se trataron con PDGF-BB 20 ng/mL a distintos tiempos: 30 min, 1 hora, 3 horas y 6 horas en el caso de la evaluación de las proteínas de la mitofagia y proteínas mitocondriales, y 24 horas y 48 horas en el caso de la evaluación de proteínas contráctiles. Se mantuvo a un grupo sin tratar que corresponde al control negativo. Se utilizó como control positivo de mitofagia, el desacoplante mitocondrial carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP). Para ello un grupo se trató con 25 μ M de CCCP durante 3 horas.

5.4. Aislamiento de mitocondrias.

Dado que se requería de una gran cantidad de células para obtener un volumen de muestra considerable, las VSMC A7r5 se cultivaron en placas de 100 mm, y se utilizaron una vez que alcanzaron una alta confluencia. Se realizó el tratamiento con PDGF-BB como

se describió anteriormente, utilizando 2 placas para cada condición. Tras el tratamiento, las células se lavaron con PBS y se rasparon. Se centrifugaron a 600 x g a 4°C durante 10 minutos, el pellet se resuspendió en 2 mL de buffer frío (Tris-MOPS 0,1 M; EGTA/Tris 0,1 M; sacarosa 1 M; pH 7,4) y se homogeneizó utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem. El homogenizado se centrifugó a 600 x g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 7000 x g a 4°C durante 10 minutos. Se lavó el pellet con buffer frío, luego se resuspendió el sedimento en 200 µL de buffer frío y se centrifugó a 7000 x g a 4°C durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en el volumen de buffer que quedó tras eliminar el sobrenadante. Una vez obtenida la solución que contiene las mitocondrias, se prepararon las muestras para western blot como se especifica más adelante.

5.5. Preparación de muestras para Western blot.

Tras el tratamiento con PDGF-BB, se realizó la extracción de proteínas totales, para ello las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se les agregó 100 µL de amortiguador de lisis Ripa, y se guardaron las placas a -80°C. Posteriormente, se rasparon, se sonicaron 5 minutos y se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos, se rescató el sobrenadante y se eliminó el pellet. En el caso de los extractos mitocondriales, se les agregó 20 µL de amortiguador de lisis Ripa, se sonicaron 5 minutos y se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos, se rescató el sobrenadante y se eliminó el pellet. La cuantificación de la concentración de las proteínas en cada muestra se realizó mediante el ensayo de BCA, según lo indicado en el protocolo del fabricante (Thermo Scientific™, 23225). Se desnaturaron las proteínas, para ello se les agregó buffer de carga 4X, un volumen correspondiente a un tercio del volumen total de la muestra y se calentaron a 90°C por 5 minutos. Las muestras se guardaron a -20°C hasta utilizarse.

5.6. Western blot.

Los niveles de proteínas mitocondriales, de autofagia, de mitofagia y proteínas contráctiles tras el tratamiento con PDGF-BB se determinaron por Western blot. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. Para ello se cargaron entre 10 µg a 30 µg de proteínas de cada muestra en geles al 10-12% dependiendo del marcador a evaluar. Las proteínas se transfirieron a membranas polifluoruro de vinilideno, previamente activadas con metanol, usando para ello transferencia semiseca de acuerdo con el protocolo del fabricante (Bio-rad Laboratories, Inc. 1704150). Se comprobó la correcta transferencia de las proteínas a

la membrana utilizando rojo Ponceau. Se lavaron las membranas con amortiguador Tris salino 0,1% Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos. Se bloquearon las membranas incubando con solución de bloqueo (leche 5% en TBS-T) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron con TBS-T por 5 minutos. Se incubaron a 4°C durante toda la noche en una solución de BSA al 3% en TBS-T con anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas mitocondriales (Tom20 y mtHsp70), contra las proteínas que participan en la mitofagia (PINK, Parkin, y BNIP3) y contra proteínas contráctiles (α -SMA, SM22 α y calponina). Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 5 minutos. Se incubaron con anticuerpos secundarios (anti-mouse, anti-rabbit) conjugados con peroxidasa de rabanito durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos. Se revelaron las membranas usando el reactivo ECL (Thermo Scientific™, 32106) y el equipo de detección LICOR. Se utilizó β -tubulina como control de carga en muestras de proteínas totales y mtHsp70 como control de carga en muestras de extracto mitocondrial. La cuantificación de las bandas se realizó utilizando el programa UN-SCAN-IT (Silk Scientific Inc).

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de PDGF-BB sobre la desdiferenciación de las VSMC

Para confirmar la actividad biológica de PDGF-BB, se evaluó su capacidad de inducir la desdiferenciación en el modelo de estudio, A7r5. Para ello se determinaron mediante Western blot los niveles de las proteínas contráctiles específicas del músculo liso: calponina, SM22 α y α -SMA. Su disminución es una característica fundamental del fenotipo sintético-proliferativo de las VSMC (Rzucidlo *et al.*, 2007). Tras el tratamiento con PDGF-BB por 24 horas y 48 horas, se observó que los niveles de α -SMA y calponina en las células A7r5 presentaron una tendencia a la disminución con respecto al control, alcanzando un mínimo a las 24 horas (Figura 2A-C). Mientras que los niveles de SM22 α también presentaron una tendencia a disminución en VSMC estimuladas con PDGF-BB, pero en un menor grado (Figura 2A y D). Estos resultados sugieren que PDGF-BB induciría la desdiferenciación de las células A7r5.

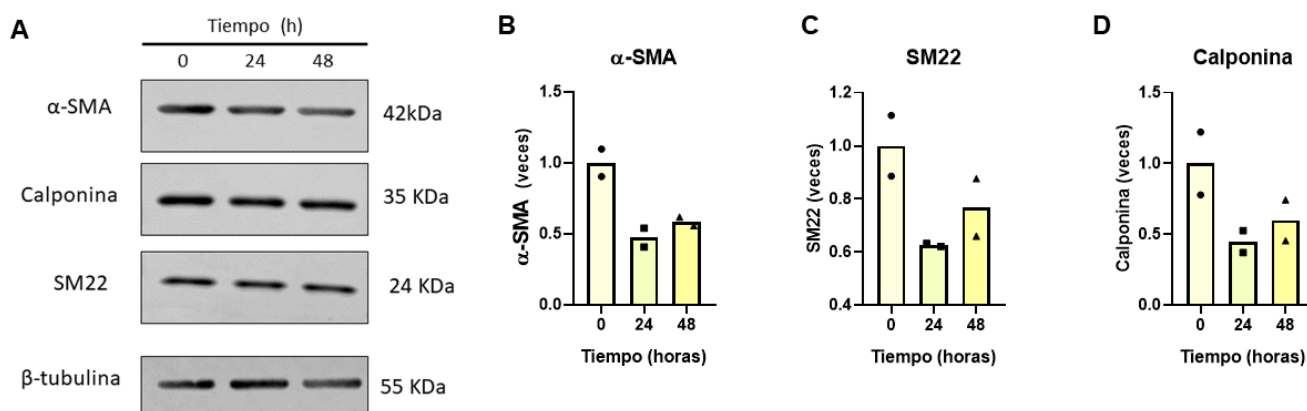


Figura 2. Efecto de PDGF-BB en los niveles de α -SMA, calponina y SM22 α en A7r5.

Las células A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB durante 24 y 48 horas. Se realizó Western blot usando las proteínas totales para detectar α -SMA, calponina y SM22 α . (A) Imagen representativa de las membranas obtenidas para α -SMA, calponina, SM22 α y β -tubulina. Cuantificación relativa respecto a β -tubulina de los niveles de (B) α -SMA, (C) calponina, y (D) SM22 α . La barra muestra el promedio de los datos (N=2). Cada dato se muestra como un punto.

6.2. Efecto de PDGF-BB sobre la autofagia en VSMC

Para evaluar si PDGF-BB induce la autofagia en las A7r5, se evaluaron mediante Western blot, los niveles de p62, proteína que media la interacción entre el autofagosoma y el componente citoplasmático a degradar. Los cambios en los niveles de p62 se pueden utilizar como un marcador de autofagia, el aumento en la cantidad de esta proteína indica un aumento moderado de la autofagia (Gatica *et al.*, 2022). Se observó que, en las células estimuladas con el factor de crecimiento, se detectó una tendencia moderada al aumento en los niveles de p62 (Figura 3), sugiriendo con ello que PDGF-BB induciría la autofagia en A7r5.

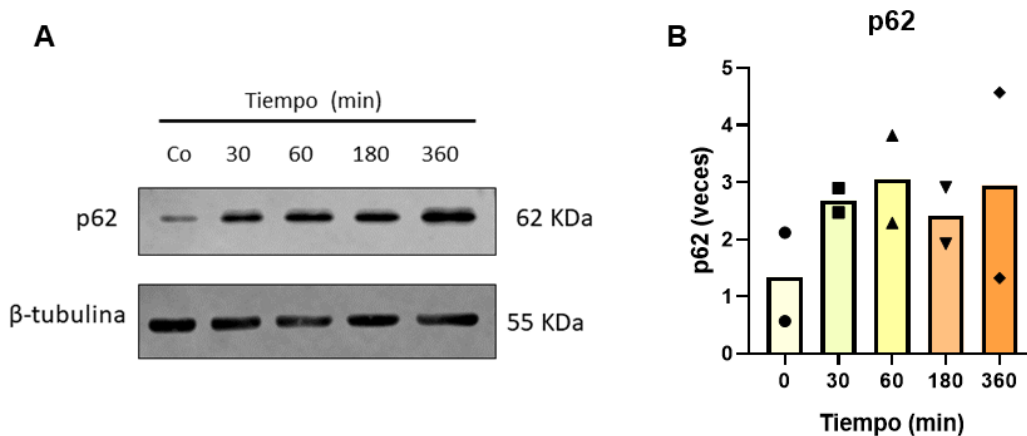


Figura 3. Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de p62 en A7r5.

Las células A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB durante 0, 30, 60, 180 y 360 minutos. Con las proteínas totales se realizó Western blot para detectar p62 y β -tubulina. (A) Imagen representativa de la membrana obtenida para p62, y β -tubulina. (B) Cuantificación relativa respecto a β -tubulina de los niveles de p62. La barra muestra el promedio de los datos (N=2). Cada dato se muestra como un punto.

6.3. Efecto de PDGF-BB sobre la mitofagia en VSMC

Con el objetivo de determinar el efecto de PDGF-BB sobre la activación de la mitofagia en el modelo de estudio A7r5, se evaluaron los niveles de las proteínas que participan en la vía canónica de la mitofagia PINK-1 y Parkin mediante Western blot (Li *et al.*, 2021). Se observó que tras el tratamiento con PDGF-BB, una tendencia al aumento de los niveles de PINK con respecto al grupo control. A los 60 minutos de tratamiento con el factor de crecimiento se alcanzó un máximo en los niveles que disminuyó a medida que

aumentó el tiempo de exposición al PDGF-BB (Figura 4). Los niveles de Parkin también presentaron una tendencia al aumento en las células tratadas con el factor de crecimiento con respecto al control (Figura 4). La tendencia al aumento en los niveles de ambas proteínas es sugerente de que PDGF-BB evita la degradación de PINK1 y con ello se activaría la mitofagia dependiente de PINK/Parkin.

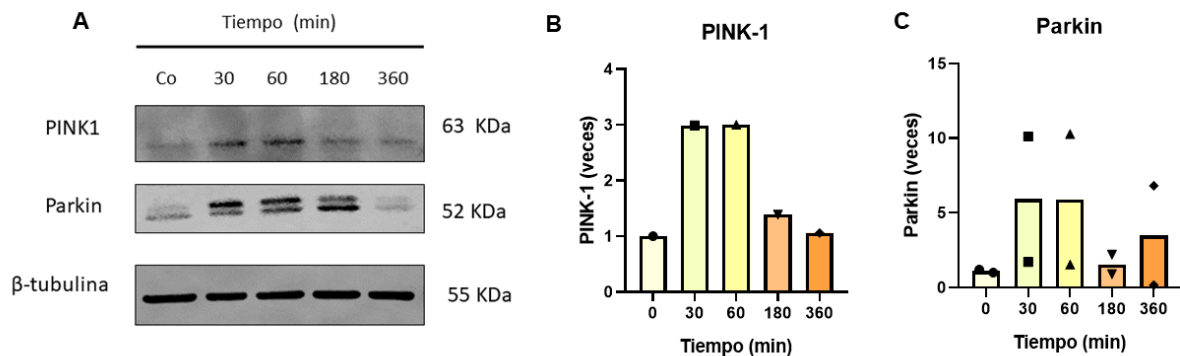


Figura 4. Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de PINK1 y Parkin en A7r5.

Las células A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB durante 0, 30, 60, 180 y 360 minutos. Con las proteínas totales se realizó Western blot para detectar PINK1, Parkin, y β -tubulina. **(A)** Imagen representativa de la membrana obtenida para PINK1, Parkin, y β -tubulina. **(B)** Cuantificación relativa respecto de β -tubulina de los niveles de PINK-1. **(C)** Cuantificación relativa respecto a β -tubulina de los niveles de Parkin. Los datos de PINK1 corresponde a N=1. La barra muestra el promedio de los datos (N=2). Cada dato se muestra como un punto.

Con el objetivo de mejorar el estudio de las proteínas que participan en la mitofagia, se aislaron las mitocondrias de las células tratadas con PDGF-BB y se evaluaron los niveles de PINK1 mitocondrial mediante Western blot. Se observó una tendencia al aumento en los niveles de PINK-1 con el tratamiento con PDGF-BB con respecto al grupo control. Los resultados sugieren que alcanzó un máximo a los 60 minutos de tratamiento y que posteriormente disminuyó hasta alcanzar los niveles del grupo control (Figura 5). Al igual que PDGF-BB, el tratamiento con CCCP durante 3 horas, utilizado como control positivo de mitofagia, aumentó los niveles de PINK-1 con respecto al grupo sin tratar (Figura 5). De modo que es posible sugerir que PDGF-BB induciría la acumulación de PINK-1 en la membrana de las mitocondrias. Estos resultados sugieren que PDGF-BB activa la mitofagia dependiente de PINK.

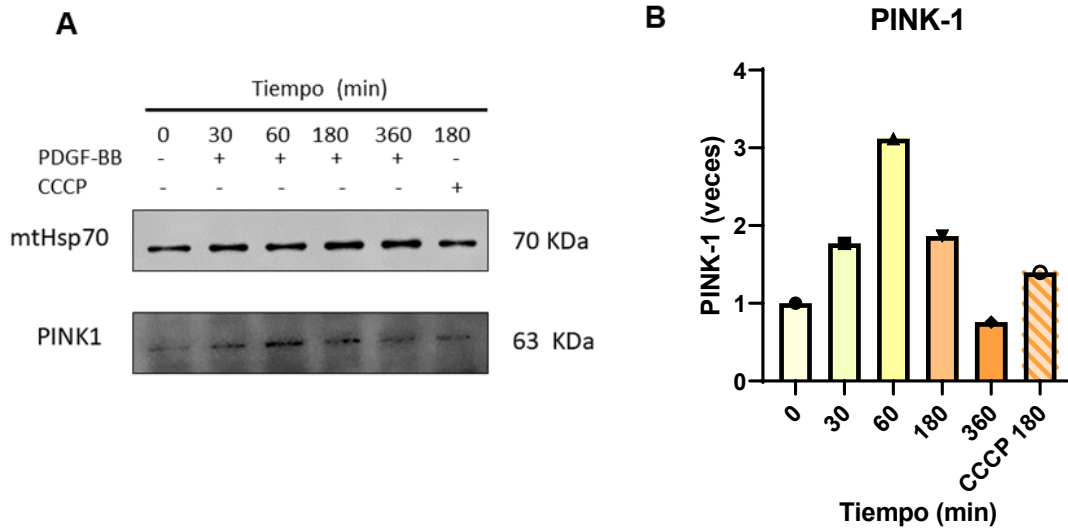


Figura 5. Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de PINK1 en extracto mitocondrial de A7r5. Las células A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB durante 0, 30, 60, 180 y 360 minutos. Se realizó el aislamiento de las mitocondrias por fraccionamiento subcelular y con ellas se realizó Western blot para detectar PINK1 y mtHSP70. **(A)** Imagen representativa de la membrana obtenida para mtHSP70 y PINK1. **(B)** Cuantificación relativa respecto de mtHSP70 de los niveles de PINK1. Los datos corresponden a N=1.

Adicionalmente se evaluaron los niveles BNIP3, un receptor de mitofagia, que se ha descrito anteriormente como un modulador de cambio de fenotipo de VSMC en la calcificación vascular (Liu *et al.*, 2022). Se observó una tendencia al aumento en los niveles de esta proteína en las células tratadas con PDGF-BB durante 60 minutos. Sin embargo, sus niveles disminuyeron por debajo de los niveles de control en las células tratadas con PDGF-BB durante 360 minutos (Figura 6). Una disminución similar se observó en las células tratadas con CCCP durante 180 minutos (Figura 6). Estos resultados sugieren que PDGF-BB promueve la translocación de BNIP3 desde el citoplasma a las mitocondrias, por lo que PDGF-BB podría inducir mitofagia dependiente de BNIP3.

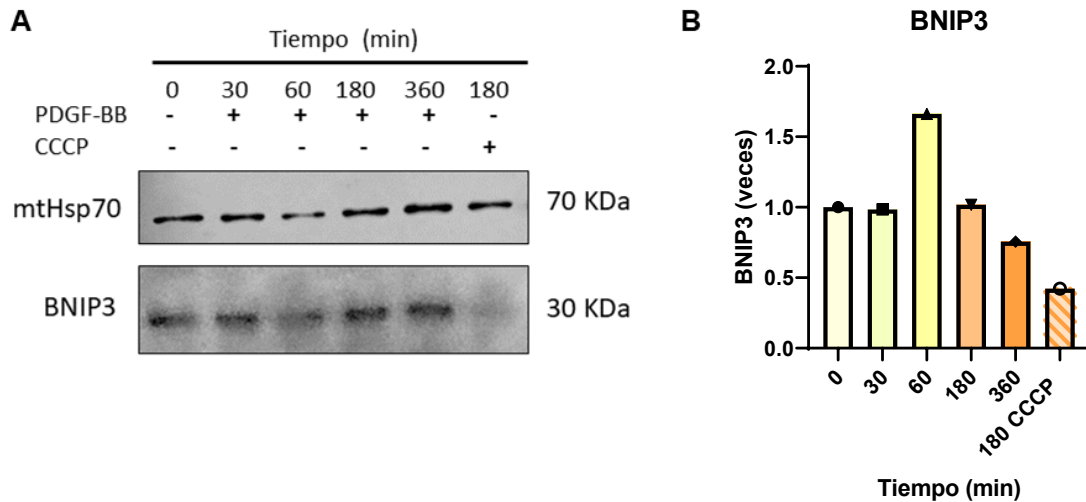


Figura 6. Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de BNIP3 en extracto mitocondrial de A7r5. Las células A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB durante 0, 30, 60, 180 y 360 minutos. Se realizó el aislamiento de las mitocondrias por fraccionamiento subcelular y con ellas se realizó Western blot para detectar mtHSP70 y BNIP3. **(A)** Imagen representativa de la membrana obtenida para mtHSP70 y BNIP3. **(B)** Cuantificación relativa respecto a mtHSP70 de los niveles de BNIP3. Los datos corresponden a N=1.

6.4. Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de proteína mitocondrial en VSMC

Para determinar cambios en la masa mitocondrial tras el tratamiento con PDGF-BB, se pueden evaluar los cambios en los niveles de las proteínas mitocondriales, es por ello se utilizó Western blot para estudiar los niveles de mtHsp70, chaperona mitocondrial que se expresa de forma constitutiva. Se observó que, tras el tratamiento con el factor de crecimiento, no existiría un cambio en los niveles de mtHsp70 con respecto al control (Figura 7), sugiriendo con ello que el tratamiento con PDGF-BB en los tiempos evaluados, no disminuiría la masa mitocondrial en las células A7r5.

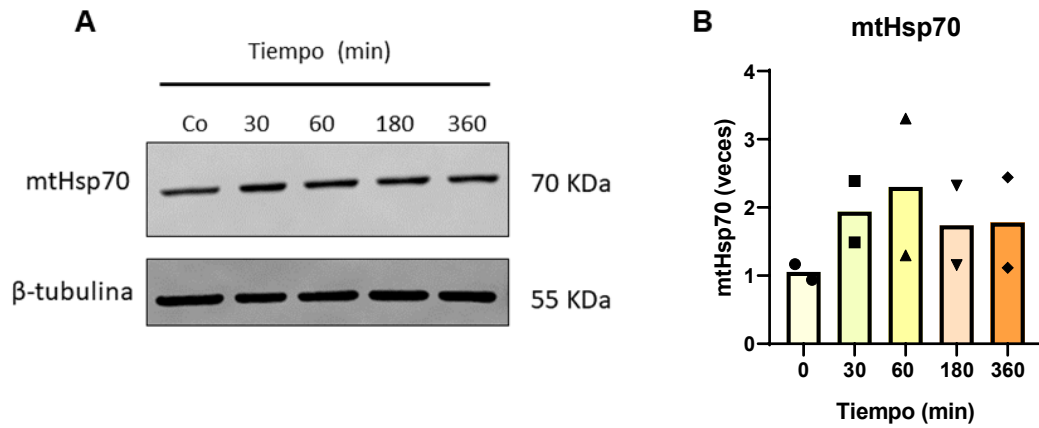


Figura 7. Efecto de PDGF-BB sobre los niveles de mtHsp70 en A7r5.

Las células A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB durante 0, 30, 60, 180 y 360 minutos. Con las proteínas totales se realizó Western blot para detectar mtHsp70. **(A)** Imagen representativa de la membrana obtenida para mtHsp70. **(B)** Cuantificación relativa de los niveles de mtHsp70. La barra muestra el promedio de los datos (N=2). Cada dato se muestra como un punto.

7. DISCUSIÓN

Una característica importante de las VSMC es que presentan una alta plasticidad. Estas células son capaces de modificar su fenotipo en respuesta a la integración de múltiples señales ambientales (Frismantiene *et al.*, 2018; Owens *et al.*, 2004; Rzucidlo *et al.*, 2007). La desdiferenciación de las VSMC a un fenotipo sintético-proliferativo se asocia a distintas patologías cardiovasculares (Chen *et al.*, 2020; Frismantiene *et al.*, 2018; Owens *et al.*, 2004; Rzucidlo *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2017). Sin embargo, los procesos que median la adquisición de este fenotipo todavía no se comprenden completamente.

Se ha demostrado que PDGF-BB, principal factor de desdiferenciación induce la autofagia y esta es requerida para el cambio de fenotipo en VSMC (Salabei *et al.*, 2013). Otro proceso que también participa en la modulación del fenotipo de las VSMC es la dinámica mitocondrial (Salabei & Hill, 2013). De hecho, se ha descrito que PDGF-BB es capaz de promover la fisión mitocondrial dependiente de Drp-1 y la inhibición de este proceso evita la desdiferenciación (Salabei & Hill, 2013). Pero aún no se conoce si la mitofagia, un tipo de autofagia selectiva de mitocondrias estaría relacionada con la modulación del fenotipo del VSMC. En este trabajo se estudió la mitofagia durante la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares A7r5 inducida por PDGF-BB.

Para validar el modelo de estudio utilizado, se comprobó que PDGF-BB es capaz de inducir la desdiferenciación en las células A7r5, para ello las células se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB durante 24 y 48 horas, y se evaluaron los marcadores de desdiferenciación. En los dos experimentos realizados, el tratamiento con PDGF-BB fue capaz de disminuir los niveles de las proteínas contráctiles calponina, SM22 y α -SMA en las VSMC, alcanzando un mínimo a las 24 horas (Figura 2). Lo anterior sugiere que PDGF-BB induce la desdiferenciación en las células A7r5. Sin embargo, se requiere de aumentar el número de experimentos para poder hacer el análisis estadístico y comprobar si esta reducción en los niveles de proteínas contráctiles es significativa. Esta tendencia concuerda con los resultados obtenidos por Norambuena-Soto *et al.* (2020) en que la estimulación con PDGF-BB por 24 horas redujo los niveles de proteínas contráctiles en A7r5. Es importante considerar que si bien, la disminución del contenido de proteínas contráctiles específicas del músculo liso es una característica de las VSMC desdiferenciadas, la evaluación de otras propiedades de este fenotipo permitiría confirmar que efectivamente el PDGF-BB, en la concentración y condiciones utilizadas en este

trabajo, induce la desdiferenciación en A7r5. En este sentido, el efecto de este factor de crecimiento sobre proliferación celular se podría evaluar a través de la determinación de los niveles de proteínas del ciclo celular como ciclinas y ensayo de MTT, mientras que efecto sobre la migración celular se podría evaluar mediante el ensayo de cierre de herida y de cámara Transwell tipo Boyden, tal como lo realizó Norambuena-Soto *et al.* (2020). Además, se podría evaluar el impacto de PDGF-BB en la actividad sintética de las células A7r5 mediante la cuantificación de las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno I y osteopontina (Torres *et al.*, 2016).

Si bien múltiples estudios han demostrado que PDGF-BB induce autofagia en VSMC, principalmente realizados en cultivos primarios aorta de rata (Salabei *et al.*, 2013), en este trabajo era importante comprobar que PDGF-BB era capaz de promover la autofagia en el modelo de estudio A7r5. Para ello, en este trabajo se evaluó los niveles de p62 tras la estimulación con el factor de crecimiento. p62 es un adaptador de autofagia selectiva, capaz de interactuar a través de su región LIR con LC3, proteína presente en la membrana del autofagosoma, y reconocer las cargas ubiquitinadas mediante su región UBA (Jeong *et al.*, 2019). En los dos experimentos realizado, se observó un aumento de p62 en las células tratadas con PDGF-BB (Figura 3). Esto sugiere un aumento moderado de la autofagia. Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos en una investigación anterior de nuestro laboratorio en que la estimulación con 10 nM de PDGF-BB de las células A7r5, aumentó los niveles de LC3-II (García-Miguel *et al.*, 2018). LC3-II es la forma activa de LC3, que se produce al conjugar LC3-I con fosfatidiletanolamina durante la maduración de los autofagosomas (Tanida *et al.*, 2008). Aunque las variaciones de los niveles tanto de p62 como de LC3-II pueden utilizarse como marcadores de autofagia, por sí solos no son suficiente para indicar la activación de la autofagia. Cuando se induce autofagia en respuesta a diferentes condiciones de estrés, en muchos casos también se incrementa la expresión de la maquinaria autofágica. Con ello los niveles proteicos de p62 y LC3-II aumentan. Pero sus niveles disminuyen a medida que ambas proteínas se degradan, junto al contenido del interior de los autofagolisosomas (Bjorkoy *et al.*, 2009). Es por ello que nuestros resultados se deben complementar con ensayos de flujo autofagico. En estos ensayos se inhibe la formación del autofagolisosoma, evitando la degradación del contenido las vesículas autofágicas. De esta manera, se podría determinar que el incremento de p62 tras el tratamiento se debe realmente a un aumento de la autofagia. Además, para confirmar que PDGF-BB induce efectivamente la autofagia en A7r5, se

podría estudiar la formación de los autofagosomas mediante inmunocitoquímica, al transfectar previamente las células con un adenovirus que expresa la proteína LC3 unida a la proteína fluorescente verde (GFP), marcando así a los autofagosomas, tal como lo realizó Mondaca-Ruff *et al.* (2018).

Para estudiar el efecto de PDGF-BB sobre la mitofagia en VSMC, se evaluaron mediante Western blot los cambios en los niveles de PINK1 y Parkin, proteínas que participan en la mitofagia mediada por ubiquitinación, que corresponde a la vía más estudiada. Al estimular las células A7r5 con PDGF-BB, en los experimentos realizados, se observó una tendencia al aumento en los niveles tanto de PINK como de Parkin en comparación con el grupo control (Figura 4). Este resultado es concordante con la idea de que PDGF-BB sería capaz de inducir la activación de esta vía de la mitofagia en VSMC. Esta tendencia concuerda con los resultados obtenidos por Sanhueza-Olivares (2017) en los que también se observó que los tratamientos de 60 y 90 minutos con PDGF-BB aumentaron de los niveles de PINK1 en A7r5. Aun así, es necesario repetir el experimento, para obtener resultados definitivos. También es importante destacar que al momento de revelar las membranas se obtuvieron múltiples bandas inespecíficas, que dificultaron la identificación de la banda correspondiente a PINK-1. Debido a las complicaciones que se presentaron al evaluar los niveles de proteínas de la mitofagia en los extractos de proteínas totales, se realizó el aislamiento de las mitocondrias. Para ello se utilizó un protocolo basado en la homogeneización con un homogeneizador Potter-Elvehjem y una serie de centrifugaciones a distintas velocidades. Se midieron los niveles de proteínas de la mitofagia en los extractos mitocondriales. Se observó una tendencia al aumento en los niveles de PINK-1 de las muestras de A7r5 estimuladas con PDGF-BB con respecto al control (Figura 5). Este aumento sería por la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial externa, lo que daría cuenta de una activación de la mitofagia. Sin embargo, queda pendiente la evaluación de los niveles de Parkin presentes en el extracto mitocondrial. Con un aumento del número de experimentos, se podría comprobar que la acumulación de PINK1 inducida por PDGF-BB sería capaz de promover la translocación de Parkin desde citoplasma a la membrana externa mitocondrial y por ende se confirmaría que efectivamente PDGF-BB puede inducir la mitofagia dependiente de PINK1 y Parkin en VSMC.

BNIP3 es un receptor de mitofagia que se ha comprobado que puede modular la adquisición del fenotipo osteogénico en VSMC durante la calcificación vascular (Liu *et al.*,

2022). Adicionalmente, se ha demostrado que un aumento de los niveles de HIF-1 α y BNIP3 desencadenaría la degradación mitocondrial en la aorta de un modelo murino de enfermedad de Kawasaki. Esta enfermedad es una afección asociada a lesiones vasculares asociada con la aparición de VSMC con fenotipo similar a macrófagos (An *et al.*, 2023). Estos antecedentes en conjunto con el hecho que PDGF-BB aumenta la expresión de HIF-1 α en células del músculo liso vascular de la arteria pulmonar (PASMC) (Xiao *et al.*, 2017), incrementan el interés por averiguar si BNIP3 participa en la regular de la desdiferenciación inducida por PDGF-BB en VSMC. En este sentido, se estudiaron cambios en los niveles BNIP3 en los extractos mitocondriales. En este trabajo, en el único experimento realizado, se observó un aumento en los niveles de esta proteína en las células tratadas con PDGF-BB durante 60 minutos, pero que disminuyeron al aumentar la duración del tratamiento con PDGF-BB (Figura 6). Este resultado sugiere que PDGF-BB induce la translocación de BNIP3 desde el citoplasma a la membrana externa de las mitocondrias, lo que sugeriría que podría activar la mitofagia dependiente de BNIP3. Si bien este resultado corresponde a un dato preliminar, respalda la idea de continuar estudiando el efecto PDGF-BB en la mitofagia mediada por el receptor BNIP3, sobre todo considerando que en un estudio realizado en cultivos primarios de VSMC de aorta de humanos, la estimulación con PDGF-BB no fue capaz de inducir un aumento de los niveles de PINK1 y Parkin (Sanhueza-Olivares, 2017).

Para evaluar el efecto de PDGF-BB en la masa mitocondrial, se midieron los niveles de proteína mitocondrial Hsp70. Al estimular a las células A7r5 con PDGF-BB, en dos experimentos realizados, no se observaron cambios en el contenido de esta proteína independiente del tiempo de tratamiento (Figura 7). Lo anterior puede deberse a que los intervalos de tiempo evaluados eran muy cortos para que fuera posible observar los efectos de la activación de la mitofagia sobre las mitocondrias. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en una investigación previa, en que la estimulación de las células A7r5 con PDGF-BB durante 60 y 90 minutos disminuyó significativamente los niveles de las proteínas mitocondriales SDH y MTCO1 (Sanhueza-Olivares, 2017). Es importante considerar que el proceso de mitofagia es precedido por la fisión mitocondrial, la cual permite segregar las zonas de la red mitocondrial disfuncionales, que presenta una disminución del potencial de membrana, para su degradación evitando que el resto de la red se vea comprometido, de modo que la fragmentación de este organelo es asimétrica, lo que podría explicar en parte la diferencia en la temporalidad de degradación de las

proteínas mitocondriales (Zorov *et al.*, 2019). Es por ello que se debe volver a realizar el experimento con tiempos de tratamiento mayores. También es recomendable medir los niveles de otras proteínas mitocondriales como SDH, MTCO1 y Tom20. Si bien los niveles de proteínas mitocondriales pueden ser un indicio de cambios en la masa mitocondrial, la disminución del contenido de estas proteínas no implica necesariamente cambios en la masa mitocondrial. De hecho, el contenido de proteínas mitocondrias en VSMC puede variar por distintos estímulos sin que se produzca la degradación de este organelo (Paredes *et al.*, 2020). En este sentido, para confirmar una reducción en la masa mitocondrial frente a PDGF-BB, la disminución de proteínas mitocondriales se debe considerar en conjunto con la disminución otros parámetros como la cantidad de ADN mitocondrial o complementado con otras técnicas como la citometría de flujo usando Mitotracker Green.

8. CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos hasta el momento, es posible concluir que:

- PDGF-BB induciría desdiferenciación de células A7r5, lo que se ve reflejado en la disminución del contenido de proteínas contráctiles calponina, α -SMA y SM22 en las células tratadas con 20 ng/mL de PDGF-BB.
- PDGF-BB induciría la autofagia de las células A7r5, dado que se observó un aumento moderado de los niveles de p62, marcador de autofagia, en las células tratadas con el factor de crecimiento.
- PDGF-BB induciría la mitofagia, dado que se observó una tendencia al aumento en los niveles de las proteínas PINK1 y Parkin en las células estimuladas con PDGF-BB. Estos resultados sugieren que este factor de crecimiento promovería la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial y con ello la activación de la degradación mitocondrial.
- PDGF-BB podría producir un aumento de los niveles de BNIP3 en las mitocondrias aisladas, lo que sugiere que el receptor BNIP3 podría también participar en la potencial mitofagia inducida por PDGF-BB durante la desdiferenciación de las A7r5.

Con los resultados obtenidos en este trabajo sería posible sugerir que durante el proceso de la desdiferenciación de la línea celular de las VSMC de aorta de rata A7r5 inducida por el factor derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), se produce la activación de la mitofagia mediada por PINK y Parkin, y probablemente también BNIP3. Sin embargo, se requiere continuar realizando experimentos relacionados principalmente a la evaluación de la masa mitocondrial tras el tratamiento con PDGF-BB.

9. REFERENCIAS

- An, X., Ma, X., Liu, H., Song, J., Wei, T., Zhang, R., Zhan, X., Li, H., & Zhou, J. (2023). Inhibition of PDGFRbeta alleviates endothelial cell apoptotic injury caused by DRP-1 overexpression and mitochondria fusion failure after mitophagy. *Cell Death Dis*, 14(11), 756. doi:10.1038/s41419-023-06272-3
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-197. doi:10.1016/S0076-6879(08)03612-4
- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 435(2), 297-312. doi:10.1042/BJ20110162
- Chen, P. Y., Qin, L., Li, G., Malagon-Lopez, J., Wang, Z., Bergaya, S., Gujja, S., Caulk, A. W., Murtada, S. I., et al. (2020). Smooth Muscle Cell Reprogramming in Aortic Aneurysms. *Cell Stem Cell*, 26(4), 542-557 e511. doi:10.1016/j.stem.2020.02.013
- Docherty, C. K., Carswell, A., Friel, E., & Mercer, J. R. (2018). Impaired mitochondrial respiration in human carotid plaque atherosclerosis: A potential role for Pink1 in vascular smooth muscle cell energetics. *Atherosclerosis*, 268, 1-11. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.009
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., & Resink, T. J. (2018). Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cell Signal*, 52, 48-64. doi:10.1016/j.cellsig.2018.08.019
- Garcia-Miguel, M., Riquelme, J. A., Norambuena-Soto, I., Morales, P. E., Sanhueza-Olivares, F., Nunez-Soto, C., Mondaca-Ruff, D., Cancino-Arenas, N., San Martin, A., et al. (2018). Autophagy mediates tumor necrosis factor-alpha-induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. *PLoS One*, 13(5), e0197210. doi:10.1371/journal.pone.0197210
- Gatica, D., Chiong, M., Lavandero, S., & Klionsky, D. J. (2015). Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circ Res*, 116(3), 456-467. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303788
- Gatica, D., Chiong, M., Lavandero, S., & Klionsky, D. J. (2022). The role of autophagy in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res*, 118(4), 934-950. doi:10.1093/cvr/cvab158
- Han, J. H., Park, H. S., Lee, D. H., Jo, J. H., Heo, K. S., & Myung, C. S. (2021). Regulation of autophagy by controlling Erk1/2 and mTOR for platelet-derived growth factor-BB-

- mediated vascular smooth muscle cell phenotype shift. *Life Sci*, 267, 118978. doi:10.1016/j.lfs.2020.118978
- Hayashi, K., Takahashi, M., Kimura, K., Nishida, W., Saga, H., & Sobue, K. (1999). Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 145(4), 727-740. doi:10.1083/jcb.145.4.727
- He, L., Zhou, Q., Huang, Z., Xu, J., Zhou, H., Lv, D., Lu, L., Huang, S., Tang, M., *et al.* (2019). PINK1/Parkin-mediated mitophagy promotes apelin-13-induced vascular smooth muscle cell proliferation by AMPK α and exacerbates atherosclerotic lesions. *J Cell Physiol*, 234(6), 8668-8682. doi:10.1002/jcp.27527
- Jeong, S. J., Zhang, X., Rodriguez-Velez, A., Evans, T. D., & Razani, B. (2019). p62/SQSTM1 and Selective Autophagy in Cardiometabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal*, 31(6), 458-471. doi:10.1089/ars.2018.7649
- Jia, Y., Wang, M., Mao, C., Yu, F., Wang, Y., Xiao, R., Jiang, C., Zheng, L., Xu, Q., *et al.* (2018). COMP-prohibitin 2 interaction maintains mitochondrial homeostasis and controls smooth muscle cell identity. *Cell Death Dis*, 9(6), 676. doi:10.1038/s41419-018-0703-x
- Killackey, S. A., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2020). Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol*, 219(11). doi:10.1083/jcb.202004029
- Li, J., Zhao, L., Yang, T., Zeng, Y. J., & Yang, K. (2014). c-Ski inhibits autophagy of vascular smooth muscle cells induced by oxLDL and PDGF. *PLoS One*, 9(6), e98902. doi:10.1371/journal.pone.0098902
- Li, W., He, P., Huang, Y., Li, Y. F., Lu, J., Li, M., Kurihara, H., Luo, Z., Meng, T., *et al.* (2021). Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics*, 11(1), 222-256. doi:10.7150/thno.49860
- Liu, H., Li, X., Yan, G., & Lun, R. (2019). Knockdown of USP14 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell dedifferentiation via inhibiting mTOR/P70S6K signaling pathway. *RSC Adv*, 9(63), 36649-36657. doi:10.1039/c9ra04726c
- Liu, R., Jin, Y., Tang, W. H., Qin, L., Zhang, X., Tellides, G., Hwa, J., Yu, J., & Martin, K. A. (2013). Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity. *Circulation*, 128(18), 2047-2057. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002887

- Liu, Y., Sinha, S., McDonald, O. G., Shang, Y., Hoofnagle, M. H., & Owens, G. K. (2005). Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J Biol Chem*, 280(10), 9719-9727. doi:10.1074/jbc.M412862200
- Liu, Y. Z., Li, Z. X., Zhang, L. L., Wang, D., & Liu, Y. P. (2022). Phenotypic plasticity of vascular smooth muscle cells in vascular calcification: Role of mitochondria. *Front Cardiovasc Med*, 9, 972836. doi:10.3389/fcvm.2022.972836
- Long, X., Bell, R. D., Gerthoffer, W. T., Zlokovic, B. V., & Miano, J. M. (2008). Myocardin is sufficient for a smooth muscle-like contractile phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(8), 1505-1510. doi:10.1161/ATVBAHA.108.166066
- Luan, Y., Ren, K. D., Luan, Y., Chen, X., & Yang, Y. (2021). Mitochondrial Dynamics: Pathogenesis and Therapeutic Targets of Vascular Diseases. *Front Cardiovasc Med*, 8, 770574. doi:10.3389/fcvm.2021.770574
- Ma, S., Chen, J., Feng, J., Zhang, R., Fan, M., Han, D., Li, X., Li, C., Ren, J., *et al.* (2018). Melatonin Ameliorates the Progression of Atherosclerosis via Mitophagy Activation and NLRP3 Inflammasome Inhibition. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 9286458. doi:10.1155/2018/9286458
- Mack, C. P. (2011). Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(7), 1495-1505. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221135
- Mendoza-Torres, E., R., B.-S., Villa, M., Flores, N., Olivares, M. J., Calle, X., Riquelme, J. A., Bambs, C., Castro, P., *et al.* (2019). Enfermedades cardiovasculares y cáncer: ¿dos entidades mutuamente relacionadas? *Rev Chil Cardiol*, 38(1), 54-63. doi:10.4067/S0718-85602019000100054
- Miano, J. M. (2015). Myocardin in biology and disease. *J Biomed Res*, 29(1), 3-19. doi:10.7555/JBR.29.20140151
- MINSAL. (2017). ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017 Primeros resultados. Retrieved from <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17-PRIMEROS-RESULTADOS.pdf>
- MINSAL. (2023). Tabla Resumen de Mortalidad por Capítulo CIE-10 Causa Básica de Defunción y Año. Retrieved from https://informesdeis.minsal.cl/SASVisualAnalytics/?reportUri=%2Freports%2F4013de47-a3c2-47b8-8547-075525e4f819§ionIndex=0&sso_quest=true&reportViewOnly=true&reportContextBar=false&sas-welcome=false

- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21(22), 2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075. doi:10.1038/nature06639
- Mondaca-Ruff, D., Riquelme, J. A., Quiroga, C., Norambuena-Soto, I., Sanhueza-Olivares, F., Villar-Fincheira, P., Hernandez-Diaz, T., Cancino-Arenas, N., San Martin, A., *et al.* (2018). Angiotensin II-Regulated Autophagy Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Front Pharmacol*, 9, 1553. doi:10.3389/fphar.2018.01553
- Morciano, G., Patergnani, S., Bonora, M., Pedriali, G., Tarocco, A., Bouhamida, E., Marchi, S., Ancora, G., Anania, G., *et al.* (2020). Mitophagy in Cardiovascular Diseases. *J Clin Med*, 9(3). doi:10.3390/jcm9030892
- Norambuena-Soto, I., Ocaranza, M. P., Cancino-Arenas, N., Sanhueza-Olivares, F., Villar-Fincheira, P., Leiva-Navarrete, S., Mancilla-Medina, C., Moya, J., Novoa, U., *et al.* (2020). Angiotensin-(1-9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol*, 180, 114190. doi:10.1016/j.bcp.2020.114190
- Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J*, 40(3), e104705. doi:10.15252/embj.2020104705
- Owens, G. K., Kumar, M. S., & Wamhoff, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 84(3), 767-801. doi:10.1152/physrev.00041.2003
- Pardali, E., Goumans, M. J., & ten Dijke, P. (2010). Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*, 20(9), 556-567. doi:10.1016/j.tcb.2010.06.006
- Paredes, F., Williams, H. C., Quintana, R. A., & San Martin, A. (2020). Mitochondrial Protein Poldip2 (Polymerase Delta Interacting Protein 2) Controls Vascular Smooth Muscle Differentiated Phenotype by O-Linked GlcNAc (N-Acetylglucosamine) Transferase-Dependent Inhibition of a Ubiquitin Proteasome System. *Circ Res*, 126(1), 41-56. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315932
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20(3), 460-473. doi:10.1089/ars.2013.5371

- Pickles, S., Vigie, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol*, 28(4), R170-R185. doi:10.1016/j.cub.2018.01.004
- Rzucidlo, E. M., Martin, K. A., & Powell, R. J. (2007). Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*, 45 Suppl A, A25-32. doi:10.1016/j.jvs.2007.03.001
- Salabei, J. K., Cummins, T. D., Singh, M., Jones, S. P., Bhatnagar, A., & Hill, B. G. (2013). PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochem J*, 451(3), 375-388. doi:10.1042/BJ20121344
- Salabei, J. K., & Hill, B. G. (2013). Mitochondrial fission induced by platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle cell bioenergetics and cell proliferation. *Redox Biol*, 1(1), 542-551. doi:10.1016/j.redox.2013.10.011
- Salmon, M., Gomez, D., Greene, E., Shankman, L., & Owens, G. K. (2012). Cooperative binding of KLF4, pELK-1, and HDAC2 to a G/C repressor element in the SM22alpha promoter mediates transcriptional silencing during SMC phenotypic switching in vivo. *Circ Res*, 111(6), 685-696. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.269811
- Sanhueza-Olivares, F. (2017). *Papel de la mitofagia en el cambio fenotípico patológico de las células de la musculatura vascular (VSMC) inducido por PDGF-BB*. (Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica), Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica. Universidad de Chile.
- Shi, J., Yang, Y., Cheng, A., Xu, G., & He, F. (2020). Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 319(3), H613-H631. doi:10.1152/ajpheart.00220.2020
- Sun, H. J., Ren, X. S., Xiong, X. Q., Chen, Y. Z., Zhao, M. X., Wang, J. J., Zhou, Y. B., Han, Y., Chen, Q., *et al.* (2017). NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension. *Cell Death Dis*, 8(10), e3074. doi:10.1038/cddis.2017.470
- Swiader, A., Nahapetyan, H., Faccini, J., D'Angelo, R., Mucher, E., Elbaz, M., Boya, P., & Vindis, C. (2016). Mitophagy acts as a safeguard mechanism against human vascular smooth muscle cell apoptosis induced by atherogenic lipids. *Oncotarget*, 7(20), 28821-28835. doi:10.18632/oncotarget.8936
- Tan, J. Y., Jia, L. Q., Shi, W. H., He, Q., Zhu, L., & Yu, B. (2016). Rab5a-mediated autophagy regulates the phenotype and behavior of vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep*, 14(5), 4445-4453. doi:10.3892/mmr.2016.5774

- Tang, Y., Urs, S., Boucher, J., Bernaiche, T., Venkatesh, D., Spicer, D. B., Vary, C. P., & Liaw, L. (2010). Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, 285(23), 17556-17563. doi:10.1074/jbc.M109.076414
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88. doi:10.1007/978-1-59745-157-4_4
- Torres, G., Morales, P. E., Garcia-Miguel, M., Norambuena-Soto, I., Cartes-Saavedra, B., Vidal-Pena, G., Moncada-Ruff, D., Sanhueza-Olivares, F., San Martin, A., *et al.* (2016). Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through mitochondrial dynamics regulation. *Biochem Pharmacol*, 104, 52-61. doi:10.1016/j.bcp.2016.01.013
- Vasquez-Trincado, C., Garcia-Carvajal, I., Pennanen, C., Parra, V., Hill, J. A., Rothermel, B. A., & Lavandro, S. (2016). Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J Physiol*, 594(3), 509-525. doi:10.1113/JP271301
- Wang, L., Yu, T., Lee, H., O'Brien, D. K., Sesaki, H., & Yoon, Y. (2015). Decreasing mitochondrial fission diminishes vascular smooth muscle cell migration and ameliorates intimal hyperplasia. *Cardiovasc Res*, 106(2), 272-283. doi:10.1093/cvr/cvv005
- WHO. (2019). Enfermedades cardiovasculares. Retrieved from https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
- Xia, Y., Zhang, X., An, P., Luo, J., & Luo, Y. (2023). Mitochondrial Homeostasis in VSMCs as a Central Hub in Vascular Remodeling. *Int J Mol Sci*, 24(4). doi:10.3390/ijms24043483
- Xiao, Y., Peng, H., Hong, C., Chen, Z., Deng, X., Wang, A., Yang, F., Yang, L., Chen, C., *et al.* (2017). PDGF Promotes the Warburg Effect in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1alpha Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 42(4), 1603-1613. doi:10.1159/000479401
- Yang, L., Gao, L., Nickel, T., Yang, J., Zhou, J., Gilbertsen, A., Geng, Z., Johnson, C., Young, B., *et al.* (2017). Lactate Promotes Synthetic Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res*, 121(11), 1251-1262. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311819
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 124-131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014

- Yap, C., Mieremet, A., de Vries, C. J. M., Micha, D., & de Waard, V. (2021). Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Kruppel-Like Factor 4). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 41(11), 2693-2707. doi:10.1161/ATVBAHA.121.316600
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2(Suppl 2), 1542-1552. doi:10.1038/sj.cdd.4401765
- Zorov, D. B., Vorobjev, I. A., Popkov, V. A., Babenko, V. A., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Zorov, S. D., Andrianova, N. V., *et al.* (2019). Lessons from the Discovery of Mitochondrial Fragmentation (Fission): A Review and Update. *Cells*, 8(2). doi:10.3390/cells8020175