

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**



**Estradiol en la patogénesis de la hipertensión pulmonar  
arterial (HPA): Rol de la actividad estrogénica y del  
metabolismo hormonal sobre células de la musculatura  
arterial lisa**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar por el grado  
académico de Doctor por:**

***Emanuel Adrián Guajardo Correa***

**DIRECTORES DE TESIS: Dra. Valentina Parra – Dr. Mario Chiong**

**Santiago-Chile**

**Marzo 2023**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

Se informa a la Comisión de Grados Académico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado en Farmacología presentada por el candidato

**Emanuel Adrián Guajardo Correa**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día 26 de enero del año 2023.

Directores de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

---

Dra. Valentina María Parra Ortiz

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

---

**Dra. Soledad Bollo**

---

**Dra. Margarita Vega**

---

**Dr. Rodrigo Iturriaga**

---

**Dr. Emilio Herrera**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio Diferenciación Celular y Metabolismo (DyM), dirigido por la Dra. Valentina Parra y el Dr. Mario Chiong, pertenecientes al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Cardiología, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca ANID para estudios de Doctorado en Chile, 2019-2022 21191519
- Proyecto FONDAP 15130011 (SL, VP, MC)
- Proyecto FONDECYT 1190743 (VP)
- Proyecto FONDECYT 1181097 (PC)
- ANILLO ACT210004 (VP)
- U-Redes G\_2018-35 (VP)
- CRP-ICGEB CHL18-04 (VP)

Derivado de los resultados obtenidos en esta tesis, así como las metodologías desarrolladas, se han desarrollado los siguientes trabajos presentados en congresos o informados en artículos científicos de especialidad, los cuales se citan a continuación:

Publicaciones:

- **Guajardo-Correa E**, Silva-Agüero JF, Calle X, Chiong M, Henriquez M, García-Rivas G, Latorre M, Parra V. (2022). Estrogen Signaling as a bridge between the nucleus and mitochondria in cardiovascular diseases, **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. doi: 10.3389/fcell.2022.968373.
- **Guajardo-Correa E.**, Silva-Agüero J. F., López E., Chiong M., García-Rivas G., Latorre M., & Parra V. (2023). Estrogenic activity in pulmonary artery smooth muscle induces mitochondrial dysfunction and a hyperproliferative phenotype. **American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology**. En preparación

#### PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **Guajardo-Correa E**, Castro P, Chiong M, Parra V. (2019). Estradiol induce proliferación de células musculares lisas de arteria pulmonar humana (hPASMC) dependiente de su conversión a metoxiestrógenos. **XXXIV Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SChCF)**, Chile, Santa Cruz. Autor principal.
- **Guajardo-Correa E**, García-Rivas G, Chiong M, Castro P, Parra A. (2021). Estrogens and 4-methoxyestradiol effects on human pulmonary artery smooth muscle cells proliferation and mitochondrial activity. **XLIV Annual Meeting Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology**. Online. Autor principal.
- **Guajardo-Correa E** y Sánchez-Guerrero G. (2021). Citometría de flujo: la gran aliada en la investigación biomédica actual. **XXXVII Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica y Carreras Afines**. Taller virtual, online.
- **Guajardo-Correa E**, García-Rivas G, Chiong M, Castro P, Parra A. (2021). Estrogen and its metabolite 4-methoxyestradiol (4-ME) induce a cancer-like phenotype on human pulmonary artery smooth muscle cells. **XXXVI Annual Meeting Chilean Society for Physiological Sciences**. Online. Autor principal.

- **Guajardo-Correa E**, Silva-Agüero JF, García-Rivas G, Chiong M, Latorre Mora M, Parra V. (2022). In silico and in vitro determination of the estrogenic metabolic pathways that controls the hPASMC pulmonary hypertensive pathologic phenotype. **XLV Annual Meeting Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology**. Cuncumén, Valparaíso, Chile. Autor principal.
- Nieblas B, Quanto A, Silva-Platas C, Méndez-Fernández A, Álves H, Fragoso J, **Guajardo-Correa E**, García Rivas G, García N. (2022). Skeletal muscle mitochondrial alterations in the development of heart failure with preserved ejection fraction. **XXXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica**. Mérida, Yucatán, México. Co-autor.

*“La vida no siempre se presenta como queremos. Son los seres amados quienes nos hacen  
querer la vida que nos tocó”*

*EAGC*

Dedicado a mi madre, Rosa María Correa Álvarez

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no sería posible sin la participación de personas destacables desde el ámbito profesional como del ámbito personal que se hicieron presente durante mi trayectoria en la obtención de este grado:

Agradecer inicialmente a mis directores de tesis la Dra. Valentina Parra y el Dr. Mario Chiong por guiarme e iluminarme en mis bloqueos intelectuales y creativos, por su apoyo incondicional y por respaldarme en un período tan complejo como lo fueron dos años de tesis experimental truncadas por la pandemia COVID-19.

De lo anterior agradecer profundamente al Dr. Mauricio Latorre, sin lugar a duda su colaboración y trabajo en conjunto con las ideas aportadas por la Dra. Parra y mi persona permitieron enriquecer de manera destacable el trabajo que se presenta en este manuscrito.

Adicionalmente, agradecer al Dr. Gerardo García-Rivas del Tecnológico de Monterrey, México. Excelente profesional, guía y gran amigo. El logro de este grado te pertenece en parte. Gracias por recibirme en tu laboratorio, grupo de trabajo y círculo cercano.

Agradecer al Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas, representado por su director, Premio Nacional de Ciencias Naturales 2022, Dr. Sergio Lavandero. El trabajo colaborativo entre grupos del centro ha podido enriquecer el presente trabajo y mi interacción humana diaria.

Del grupo de laboratorio quiero agradecer a todos quienes hicieron agradable el tiempo de trabajo, pero me permito destacar al Maestro Sebastián Leiva, Maestro Juan Francisco Silva-Agüero, Maestro Erik López, Maestra Leslye Venegas y Dra. Fernanda Sanhueza. Infinitas gracias por la amistad, apoyo y sobre todo las risas.

Al Dr. Pedro Orihuela, académico USACH y director del Laboratorio de Inmunología de la Reproducción. Gracias por siempre creer en mis capacidades y talentos.

Rosa María Correa Álvarez, madre amada, este trabajo es fruto de las décadas de trabajo, apoyo y amor infinito. Gracias por nunca dejarme, por enseñarme lo que es el amor incondicional y luchar a diario por permitirles a tus hijos el lograr sus sueños. Mis logros fueron, son y serán tuyos.

Agradecer a mi futura esposa, Bianca Daniela Nieblas León. Eres un apoyo fundamental en la finalización de este trabajo y mi realización personal. Me das felicidad y alegría de vivir. Gracias por tu amor incondicional y por darnos una familia propia. Siempre.

A los integrantes de mi familia, Jesús Correa, Nelson Guajardo, Isidora Guajardo y Rodrigo Guajardo. Así también a Joe, Daddy y Bela, mis perritos. Gracias por el apoyo y el amor.

Finalmente, agradecer a mi núcleo de amistad incondicional, Dr. Carlos Mateluna Flores, Dra. (c) Giselle Sánchez Guerrero, Gabriela Quinteros, Maestro Tomás Ortega, BQa. Aline Alfaro. Dr. (c) Yvo Flores, Dr. (c) Pedro Novoa y Dra. (c) Amarillis Pérez. Gracias por el cariño, atención y por la inmensa honestidad.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS ANEXAS .....	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	18
SUMMARY .....	21

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>24</b>
1.1 Hipertensión pulmonar arterial idiopática.....	28
1.2 Metabolismo de la musculatura arterial lisa arterial .....	29
1.3 “La paradoja del estrógeno” .....	32
1.4 Estrógenos, metabolismo energético y mitocondria .....	36
1.5 Respuestas transcripcionales en HPA .....	39
1.6 Resumen de las principales evidencias .....	41
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>42</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>42</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>42</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
5.1 Cultivo de hPASMCs.....	42
5.2 Tratamientos .....	43
5.3 Ensayo MTS .....	44

5.4 Proliferación y viabilidad por exclusión de azul tripán .....	45
5.5 Ciclo celular por ioduro de propidio .....	45
5.6 Viabilidad celular por IP y anexina V.....	46
5.7 Especies reactivas de oxígeno mitocondriales.....	47
5.8 Potencial mitocondrial determinada por safranina .....	47
5.9 Respirometría de alta resolución.....	47
5.10 Construcción de una red de regulación transcripcional en pacientes HPAi .....	48
5.11 Análisis Estadísticos.....	51
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
6.1 Evaluar el efecto del estrógeno y su metabolito 4-ME en la proliferación de hPASMCs.....	52
6.2 Determinar el efecto del estrógeno y su metabolito 4-metoxiestradiol en la función mitocondrial.....	58
6.3 Evaluar la participación de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$ y GPER en los efectos sobre hPASMC inducido por estrógenos. ....	64
6.4 Analizar redes de regulación transcripcional asociadas al metabolismo energético y hormonal que se encuentren controladas por nodos estrogénicos en bases de datos transcripcionales de tejido pulmonar provenientes de pacientes HPAi .....	67
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
7.1 Los estrógenos E2 y 4-ME en la inducción de un fenotipo proliferativo en hPASMC	71
7.2 E2 y 4-ME inducen disfunción mitocondrial con resultados divergentes sobre la tasa de consumo de oxígeno celular. ....	73
7.3 E2 y 4-ME inducen un fenotipo “canceroso” mediante vías estrogénicas distintas. ..	79
7.4 RRT y metabólicas reguladas en la fisiopatología de la HPAi.....	80
7.5 Efectos de E2 y 4ME sobre hPASMCs en el contexto de la “paradoja del estrógeno”	89

7.6 Perspectivas farmacológicas en HPai/HPAe.....	91
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>9. LIMITACIONES Y PROYECCIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>10. FIGURAS ANEXAS.....</b>	<b>95</b>
<b>11. DISCUSIÓN ANEXA.....</b>	<b>104</b>
11.1 RRT y metabólicas reguladas en hombres importantes para la fisiopatología de la HPai	104
11.2 RRT y metabólicas reguladas en mujeres importantes para la fisiopatología de la hpai	108
<b>12. REFERENCIAS .....</b>	<b>111</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cambios en el sistema cardiopulmonar inducido por la hipertensión pulmonar arterial. ....	24
<b>Figura 2.</b> Estrategias farmacológicas actuales para el tratamiento de la HPA. ....	28
<b>Figura 3.</b> Señalización estrogénica genómica y no genómica. ....	33
<b>Figura 4.</b> Síntesis y metabolismo de estrógenos en contexto de HPA. ....	35
<b>Figura 5.</b> Efectos reportados de metabolitos del E2 sobre PSMCs. ....	36
<b>Figura 6.</b> Efectos estrogénicos sobre la función mitocondrial. ....	38
<b>Figura 7.</b> Esquema experimental utilizado en hPSMCs. ....	44
<b>Figura 8.</b> Estradiol induce proliferación en hPSMC. ....	53
<b>Figura 9.</b> Estradiol desplaza la población celular de hPSMC desde la fase S a G2/M. ....	54
<b>Figura 10.</b> 4-Metoxiestradiol induce proliferación en hPSMC. ....	55
<b>Figura 11.</b> 4-Metoxiestradiol desplaza la población celular de hPSMC desde la fase S a G2/M. ....	56
<b>Figura 12.</b> Estradiol no induce muerte celular en hPSMCs. ....	57
<b>Figura 13.</b> 4-Metoxiestradiol no induce muerte celular en hPSMCs. ....	58
<b>Figura 14.</b> Estradiol aumenta mtROS en hPSMC. ....	59
<b>Figura 15.</b> 4-Metoxiestradiol aumenta mtROS en hPSMC. ....	59
<b>Figura 16.</b> Estradiol depolariza la mitocondria en hPSMC. ....	60
<b>Figura 17.</b> 4-Metoxiestradiol depolariza la mitocondria en hPSMC. ....	60
<b>Figura 18.</b> Estradiol aumenta el consumo de oxígeno basal, en estado 3 y desacoplada en hPSMC. ....	62
<b>Figura 19.</b> 4-Metoxiestradiol aumenta la TCO independiente de CV y extramitocondrial en hPSMC. ....	63
<b>Figura 20.</b> La proliferación inducida por E2 en hPSMC es dependiente de la vía genómica o clásica (Receptores de estrógeno alfa y beta). ....	65
<b>Figura 21.</b> La proliferación inducida por 4-ME en hPSMC es dependiente de la vía no genómica o no clásica (Receptores de estrógeno acoplado a proteína G). ....	66
<b>Figura 22.</b> Red regulación transcripcional metabólica común en pacientes HPAi. ....	69
<b>Figura 23.</b> Producción de mtROS asociado al complejo respiratorio I (CI). ....	74
<b>Figura 24.</b> Modulación farmacológica de la CTE y OXPHOS. ....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación para variantes de hipertensión pulmonar según su etiología (editado de Simonneau <i>et al.</i> , 2019). .....	25
<b>Tabla 2.</b> Lista de individuos filtrados y seleccionados para la consecución del análisis de red transcriptómica en HPAi (filtrado de Stearman <i>et al.</i> , 2019).....	50
<b>Tabla 3.</b> Tejido pulmonar proveniente de pacientes HPAi presentan nodos, reacciones metabólicas y compartimentalización distintas entre ellos, destacando la excepción del control transcripcional de ESR1 y metabolismo hormonal para ambos sexos biológicos. ....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS ANEXAS

<b>Figura anexa 1.</b> Red regulación transcripcional común en pacientes HPAi.....	95
<b>Figura anexa 2.</b> Red regulación transcripcional exclusiva para hombres pacientes HPAi. ...	96
<b>Figura anexa 3.</b> Red regulación transcripcional exclusiva para mujeres pacientes HPAi. ....	97
<b>Figura anexa 4.</b> Análisis mediante <i>Enrichr</i> de redes regulatorias transcripcionales común al alza (A) y a la baja (B). .....	98
<b>Figura anexa 5.</b> Análisis mediante <i>Enrichr</i> de redes regulatorias transcripcionales exclusivas para hombres al alza (A) y a la baja (B).....	99
<b>Figura anexa 6.</b> Análisis mediante <i>Enrichr</i> de redes regulatorias transcripcionales exclusivas para mujeres al alza (A) y a la baja (B).....	100
<b>Figura anexa 7.</b> Red regulación transcripcional metabólica en pacientes hombres HPAi. ..	101
<b>Figura anexa 8.</b> Red regulación transcripcional metabólica en pacientes mujeres HPAi. ...	102
<b>Figura anexa 9.</b> E2 induce aumento en el inmunomarcaje de Ki67, indicativo de proliferación en hPASM. ....	103

## ABREVIATURAS

2-ME	: 2-Metoxiestradiol
4-ME	: 4-Metoxiestradiol
ABCG2	: Casete de unión ATP, subfamilia G miembro 2; casete de la subfamilia G de unión a ATP para transporte de salida relacionada en la resistencia a múltiples fármacos
ACADL	: Acil-CoA dehidrogenasa de cadena larga
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ALPL	: Fosfatasa alcalina asociada a procesos de biomineralización; fosfocreatina fosfatasa
ANOVA	: Análisis de varianza
ANPEP	: Alanil aminopeptidasa de membrana
AP1	: Proteína activadora 1
ARN	: Ácido ribonucleico
ATP	: Adenosín trifosfato
BMP	: Proteína morfogenética ósea
BMPR2	: Receptor de la proteína morfogenética del hueso 2
CA2	: Anhidrasa carbónica 2
CAT	: ciclo de los ácidos tricarbónicos
CFTR	: Regulador de conductancia de transmembrana asociado a fibrosis quística
CGT	: Galactosil ceramida transferasa

CI : Complejo respiratorio I

CII : Complejo respiratorio II

COLCA2 : Proteína asociada a cáncer colorectal

CoQ : Coenzima Q 10

CREBBP : Proteína de unión a la proteína de unión a elementos de respuesta de adenosín monofosfato cíclico

CTE : Cadena transportadora de electrones

CV : Complejo V/ATPasa

CYP1B1 : Citocromo P450 de la familia 1, subfamilia B, miembro 1

DRP1 : Proteína GTPasa 1 relacionada a la dinamina

E1 : Estrona

E2 : 17  $\beta$ -estradiol

E3 : Estriol

EDN1 : Endotelina 1

ENPP2 : Enzima pirofosfatasa/fosfodiesterasa de ectonucleótidos 2

EP300 : Acetiltransferasa de histonas p300

EPR : Enfermedad pulmonar restrictiva

EPOC : Enfermedad obstructiva del pulmón

ERs : Receptores de estrógenos

ER $\alpha$  : Receptor de estrógenos  $\alpha$

ER $\beta$  : Receptor de estrógenos  $\beta$

FABP6 : Proteína ligadora de ácidos grasos 6; gastrotropina

FBS : Suero fetal bovino

FCCP : Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

FDR : Tasa de falso descubrimiento

Fis1 : Fisina 1

FTs : Factores de transcripción

GMPc : Guanosín monofosfato cíclico

GPER : Receptor acoplado a proteína G para estrógenos

H2B : Histona 2 B

HDC : Descarboxilasa de histidina

HFpEF : Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada

HFrEF : Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida

HIF 1- $\alpha$  : Factor 1- $\alpha$  inducible por hipoxia

HIF : Factor inducible por hipoxia

HK2 : Hexoquinasa 2

HK3 : Hexoquinasa 3

HMOX1 : Hemo oxigenasa 1

HOXA10 : Proteína con actividad de factor transcripcional homeobox 10A

HP : Hipertensión pulmonar

HPA : Hipertensión pulmonar arterial

HPAe : Hipertensión pulmonar arterial mediada por estrógenos

HPAi : Hipertensión pulmonar idiopática

hPASMCs : Células musculares lisas de arteria pulmonar humana

HPGDS : Sintasa hematopoiética de prostaglandina D

IL-6 : Interlequina 6

IP : Ioduro de propidio

LPA : Ácido lisofosfatídico

ME1 : Enzima málica 1

MFN1 : Mitofusina 1

MFN2 : Mitofusina 2

miARN : Micro ácido ribonucleico

mTERF : Factor de terminación de la transcripción mitocondrial

MTG : MitoTracker Green

mTORC2 : Complejo 2 de mTOR

mtROS : Especies reactivas de oxígeno mitocondriales

MTS : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

NADH : Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADPH : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCOA1 : Coactivador de receptor nuclear A 1

NCOA2 : Coactivador de receptor nuclear A 2

NCOA3 : Coactivador de receptor nuclear A 3

NCOR1 : Correpresor del receptor nuclear 1

NCOR2 : Correpresor del receptor nuclear 2

NFAT : Factor nuclear de células T activadas

NFATC2 : Factor nuclear de células T activadas 2

NFE2L2 : Gen que codifica para NRF2

NOX : NADPH oxidasas

NOX4 : NADPH oxidasa 4

NQO1 : NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1

NRF1 : Factor respiratorio nuclear 1

NRF2 $\alpha$  : Factor respiratorio nuclear 2  $\alpha$

NRIP1 : Proteína de interacción con receptores nucleares 1

NT5E : Ecto 5' nucleotidasa

ONS : Sintasa de nucleótidos de ornitina

OPA1 : Proteína de atrofia óptica tipo 1

OXPHOS : Sistema de fosforilación oxidativa

p53 : Proteína supresora de tumores 53

PAPm : Presión arterial pulmonar media

PASMCs : Células musculares lisas de arteria pulmonar

PBS : Amortiguador fosfato salino

PGC1 : Coactivador del receptor gamma 1

PGD2 : Prostaglandina D2

PGH2 : Prostaglandina H2

PHGDH : Fosfoglicerato deshidrogenasa

POU2F1 : El factor de transcripción 1 clase 2 con dominio POU

PPARBP : Proteína de unión al receptor proliferador activado de peroxisoma

RECON 3D: Reconstrucción metabólica del humano en tres dimensiones

ROS : Especies reactivas de oxígeno

RPM : Revoluciones por minuto

RRT : Red regulatoria transcripcional

RRTM : Red regulatoria transcripcional metabólica

SEM : Error estándar de la media

SERM : Modulador específico de los receptores de estrógenos

SIRT1 : Sirtuina 1

SLC1A3 : Transportador de solutos perteneciente a la familia 1, miembro 3; transportador de glutamato/aspartato

SLC1A5 : Transportador de aminoácidos neutros B

SLC25A2F : Transportador de ornitina mitocondrial

SLC7A5 : Miembro 5 de la familia 7 de transportadores de soluto

SMGS : Suplemento de crecimiento para musculatura lisa

SP1 : Proteína de especificidad 1

SRC-1 : Coactivador de receptores esteroidales

SuHx : SU5416 combinado con hipoxia

TBX4 : Factor de transcripción caja T 4

TCO : Tasa de consumo de oxígeno

TFAM : Factor de transcripción mitocondrial A

TFB1M : Factor de transcripción mitocondrial B 1

TFB2M : Factor de transcripción mitocondrial B 2

TGF $\beta$ 1 : Factor de crecimiento transformante 1 $\beta$

THBS1 : Trombospondina 1

TMRM : Tetrametilrodamina

TRRUST : Relaciones reguladoras transcripcionales reveladas por la minería de textos basado en oraciones

TXNRD1 : Tioredoxina reductasa 1

UCP3 : Proteína desacoplante 3

USF1 : Factor de transcripción río arriba 1

VIH : Virus de la inmunodeficiencia humana

VSMC : Células de musculatura lisa vascular

$\Delta\psi$  m : Potencial de membrana mitocondrial

## RESUMEN DEL PROYECTO

**Antecedentes:** La hipertensión pulmonar (HP) es una enfermedad crónica, progresiva y actualmente incurable. Esta puede ser clasificada según su etiología y área pulmonar afectada. Para nuestro interés consideramos la HP arterial idiopática (HPAi), pues es una enfermedad que actualmente solo posee tratamientos paliativos y se desconoce su origen. La HPAi se caracteriza por un aumento de la presión sanguínea de la arteria pulmonar. Dicha presión está regulada principalmente por las células de la capa muscular lisa (PASMCs). Al presentarse la patología, se describe que las PASMCs sufren un cambio fenotípico “tipo canceroso” que conlleva a una proliferación sostenida que causa disminución del lumen de la arteria, aumentando la presión. Cuando este proceso es sostenido en el tiempo, se produce insuficiencia ventricular derecha, la cual puede ser mortal. Adicionalmente, estas células presentan disfunción mitocondrial. Esta disfunción se manifiesta por un cambio metabólico desde la obtención de energía por fosforilación oxidativa hacia un metabolismo preferentemente glicolítico, asociado a un aumento de la fisión mitocondrial mediada por la proteína de fisión mitocondrial DRP1. Este fenotipo se correlaciona con menor consumo de oxígeno y menor potencial mitocondrial.

Entre los mayores factores de riesgo para sufrir HPAi encontramos niveles aumentados de estradiol (E2) plasmático y presentar sexo femenino. Cuando se comparan hombres y mujeres, las últimas poseen mayor tiempo de supervivencia gracias al factor protector cardiovascular del estrógeno. Este fenómeno es denominado “la paradoja del estrógeno”. Existe evidencia de acción mitogénica de E2 en PASMCs. Así también, en los últimos años se ha descrito que el E2 puede ser metabolizado y sus metabolitos también ejercen respuestas biológicas. De nuestra atención son los metoxiestrógenos, considerados dentro de los principales metabolitos del E2. En esta clasificación destacamos al 2-metoxiestradiol (2-ME) y al 4-metoxiestradiol (4-ME). El 2-ME ha mostrado reducir la HP en modelos *in vivo*. Sin embargo, se desconoce el efecto sobre las PASMCs del 4-ME. Adicionalmente, los efectos de los estrógenos son ejercidos mediante los llamados receptores de estrógeno (ER $\alpha$  y ER $\beta$  y GPER), indicándonos que el probable fenotipo “canceroso” o “hipertenso” que se desencadena en las PASMCs, el cual es inducido por los estrógenos, puede estar asociado a procesos de señalización celular y a la transcripción génica gatillada por la activación de estos receptores.

**Hipótesis de trabajo:** 17  $\beta$ -estradiol y su metabolito 4-metoxiestradiol, inducen proliferación de las hPASMCs a través de un mecanismo dependiente de la inhibición de la función mitocondrial y de las vías de receptores de estrógenos clásicas y no clásicas, reflejando el fenotipo patológico encontrado en pacientes hipertensos pulmonares arteriales idiopáticos.

**Objetivos específicos:** 1) Evaluar el efecto del 17  $\beta$ -estradiol y su metabolito 4-metoxiestradiol en la proliferación de hPASMCs. 2) Determinar el efecto del 17  $\beta$ -estradiol y su metabolito 4-metoxiestradiol en la función mitocondrial. 3) Evaluar la participación de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER en los efectos sobre hPASMC inducido por 17  $\beta$ -estradiol y 4-Metoxiestradiol. 4) Analizar redes de regulación transcripcional asociadas al metabolismo energético y hormonal que se encuentren controladas por nodos estrogénicos en bases de datos transcripcionales de tejido pulmonar provenientes de pacientes HPAi.

**Diseño experimental:** Modelo *in vitro*: Se utilizaron hPASMCs tratadas con E2 (0-100 nM) por 24 y 48 horas. Se evaluó proliferación celular mediante ensayo MTS, análisis de ciclo celular por ioduro de propidio (IP), proliferación y viabilidad mediante exclusión por azul tripán, viabilidad celular utilizando IP y anexina V y proliferación celular mediante inmunodetección de Ki67. Así también, se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mtROS) utilizando MitoSOX, potencial mitocondrial mediante safranina y consumo de oxígeno mediante respirometría de alta resolución. Análisis de los receptores de estrógenos: hPASMCs se pretrataron con los inhibidores Fulvestrant o G36 durante 3 horas para luego estimular con E2 100 nM o 4-ME 10 nM por 48 horas. Se evaluó proliferación celular relativa mediante MTS y conteo celular por exclusión de azul tripán. Modelo *in silico*: Bases de datos de expresión génica provenientes de publicaciones indexadas reportando pacientes de HPAi se filtraron por sexo y edad, se emparejaron y analizaron utilizando el programa Cytoscape.

**Resultados:** I) E2 (10 nM y 100 nM) y 4-ME (5 nM y 10 nM) aumentan significativamente la proliferación celular de hPASMCs. II) E2 (10 nM) y 4-ME (5 y 10 nM) aumentó significativamente mtROS en hPASMCs. III) El tratamiento con E2 (10 nM y 100 nM) y 4-ME (5 nM y 10 nM) disminuyó el potencial mitocondrial en hPASMCs. IV) Los tratamientos con estrógenos alteraron la respiración mitocondrial de manera significativa en hPASMCs. V) La proliferación de hPASMCs inducida por E2 100 nM es mediada por ER $\alpha$  y/o ER $\beta$  (vía clásica). VI) La proliferación de hPASMCs inducida por 4-ME 10 nM es mediada por GPER (vía no

clásica). VII) En HPAi, las redes transcripcionales están gobernadas principalmente por vías asociadas a receptores de estrógenos y su metabolismo, generando una disrupción en el equilibrio metabólico.

**Conclusiones:** Las vías estrogénicas son reguladores maestros en la reprogramación transcripcional de la HPAi. E2 y 4-ME inducen la proliferación de hPASCs, aumentando la producción de mtROS y disminuyendo el potencial mitocondrial. Los estrógenos afectan significativamente la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. La proliferación inducida por estrógenos difiere en los receptores utilizados, siendo el efecto de E2 mediado por la vía clásica y el 4-ME por la vía no clásica.

## SUMMARY

### **Estradiol in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH): Role of estrogen activity and hormonal metabolism on arterial smooth muscle cells.**

**Background:** Pulmonary hypertension (PH) is a chronic, progressive, and currently incurable disease. It can be classified according to its etiology and affected lung area. Idiopathic arterial PH (iPAH) is our interest, since it is a disease that currently only has palliative treatments, and an unknown origin. HPAi is characterized by an increase in pulmonary artery blood pressure. Said pressure is regulated mainly by the pulmonary artery smooth muscle layer cells (PASMCs). When the pathology occurs, the PASMCs undergo a "cancerous type" phenotypic change that leads to a sustained proliferation that causes a decrease in the lumen of the artery, increasing the pressure. When this process is sustained over time, right ventricular failure occurs, which can be fatal. Additionally, these cells present mitochondrial dysfunction. This dysfunction is manifested by a metabolic change from obtaining energy by oxidative phosphorylation towards a preferentially glycolytic metabolism, associated with an increase in DRP1-mediated mitochondrial fission. This phenotype is correlated with lower oxygen consumption and lower mitochondrial potential.

Among the major risk factors for HPAi are increased levels of plasma estradiol (E2) and being female. When men and women are compared, the latter have a longer survival time thanks to the cardiovascular protective factor of estrogen. This phenomenon is called "the estrogen paradox". There is evidence of mitogenic action of E2 in PASMCs. Likewise, in recent years it has been described that E2 can be metabolized, and its metabolites also exert biological responses. Of our attention are methoxyestrogens, considered among the main metabolites of E2. In this classification we highlight 2-methoxyestradiol (2-ME) and 4-methoxyestradiol (4-ME). 2-ME has been shown to reduce HP in *in vivo* models. However, the effect on PASMCs of 4-ME is unknown. Additionally, the effects of estrogens are exerted through the so-called estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$  and GPER), indicating that the probable "cancer" or "hypertensive" phenotype that is triggered in PASMCs, which is induced by estrogens, it may be associated with cell signaling processes and gene transcription triggered by the activation of these receptors.

**Hypothesis:** *17 $\beta$ -estradiol and its metabolite 4-methoxyestradiol induce proliferation of hPASMCs through a mechanism dependent on the inhibition of mitochondrial function and the classical and non-classical estrogen receptor pathways, reflecting the pathological phenotype found in Idiopathic pulmonary arterial hypertensives patients.*

**Specific objectives:** 1) To evaluate the effect of 17 $\beta$ -estradiol and its metabolite 4-methoxyestradiol on the generation of hPASMCs. 2) Determine the effect of 17 $\beta$ -estradiol and its metabolite 4-methoxyestradiol on mitochondrial function. 3) To evaluate the participation of the ER $\alpha$ , ER $\beta$  and GPER receptors in the effects on hPASMC induced by 17 $\beta$ -estradiol and 4-methoxyestradiol. 4) Analyze transcriptional regulation networks associated with energy and hormonal metabolism that are controlled by estrogen nodes in transcriptional databases of lung tissue from HPAi patients.

**Experimental Design:** *In vitro model:* hPASMCs treated with E2 (0-100 nM) for 24 and 48 hours were used. Cell proliferation was evaluated by MTS assay, cell cycle analysis by propidium iodide (IP), proliferation and viability by trypan blue exclusion, cell viability using IP and annexin V, and cell proliferation by Ki67 immunodetection. Likewise, the production of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) was analyzed using MitoSOX, mitochondrial potential using safranin and oxygen consumption using high-resolution respirometry. Estrogen receptor analysis: hPASMCs were pretreated with the inhibitors Fulvestrant or G36 for 3 hours and then stimulated with 100 nM E2 or 10 nM 4-ME for 48 hours. Relative cell proliferation was assessed by MTS and cell count by trypan blue exclusion. *In silico model:* Gene expression databases from indexed publications reporting HPAi patients were filtered by sex and age, matched, and analyzed using the Cytoscape program.

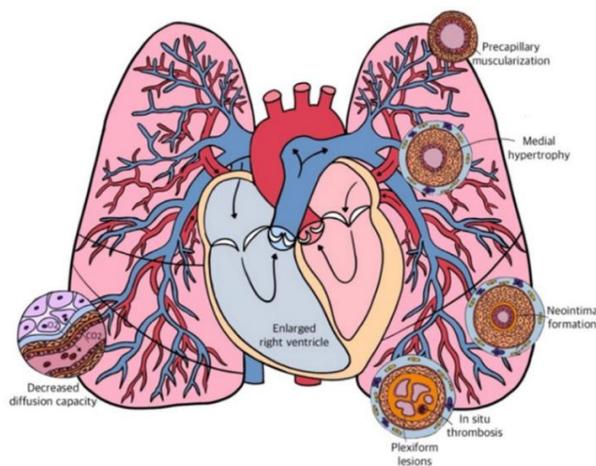
**Results:** I) E2 (10 nM and 100 nM) and 4-ME (5 nM and 10 nM) significantly increased cell proliferation of hPASMCs. II) E2 (10 nM) and 4-ME (5 and 10 nM) significantly increased mtROS in hPASMCs. III) Treatment with E2 (10 nM and 100 nM) and 4-ME (5 nM and 10 nM) decreased mitochondrial potential in hPASMCs. IV) Estrogen treatments altered mitochondrial respiration significantly in hPASMCs. V) hPASMCs proliferation induced by 100 nM E2 is mediated by ER $\alpha$  and/or ER $\beta$  (classical pathway). VI) hPASMCs proliferation induced by 4-ME 10 nM is mediated by GPER (non-classical pathway). VII) In HPAi, the

transcriptional networks are mainly governed by pathways associated with estrogen receptors and their metabolism, generating a disruption in the metabolic balance.

**Conclusions:** Estrogenic pathways are master regulators in HPAi transcriptional reprogramming. E2 and 4-ME induce the proliferation of hPASMCs, increasing the production of mtROS and decreasing the mitochondrial potential. Estrogens significantly affect the rate of mitochondrial oxygen consumption. Estrogen-induced proliferation differs in the receptors used, being the effect of E2 mediated through the classical pathway and 4-ME through the non-classical pathway.

## 1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión pulmonar (HP) es una patología progresiva e incurable que afecta a la circulación pulmonar y posee una incidencia estimada de 1,3-13,7 casos por millón y una prevalencia de 15-25 casos por millón de personas (Cullivan et al., 2022; Dubroff et al., 2020). Clínicamente, la HP se define como una presión de la arteria pulmonar en reposo (PAP)  $\geq 25$  mmHg. Esta patología conlleva a una remodelación cardiopulmonar en donde se manifiestan lesiones plexiformes vasculares pulmonares, muscularización precapilar, hipertrofia de la capa muscular vascular, trombosis *in situ* y disminución en la difusión de gases a nivel alveolar. El resultado fisiológico de esto es un aumento de la resistencia vascular pulmonar, aumentando la presión arterial pulmonar causando insuficiencia del ventrículo derecho, que puede provocar la muerte (Tobal *et al.*, 2021) (**Figura 1**). Actualmente, la HP se clasifica en 5 grupos dependiendo de su etiología (**Tabla 1**) (Simonneau *et al.*, 2019). Grupo 1: hipertensión arterial pulmonar (HPA), en donde destaca su variante idiopática; grupo 2: hipertensión pulmonar secundaria a patología de corazón izquierdo; grupo 3: hipertensión pulmonar secundaria a patología respiratoria; grupo 4: hipertensión pulmonar por obstrucciones de la arteria pulmonar; y grupo 5: hipertensión pulmonar con mecanismos no esclarecidos o multifactoriales (Lan *et al.*, 2018; Simonneau *et al.*, 2019).



**Figura 1. Cambios en el sistema cardiopulmonar inducido por la hipertensión pulmonar arterial.** En HPA, la vasculatura sufre cambios entre los que se encuentra la formación de la neointima, lesiones plexiformes, trombosis *in situ*, muscularización precapilar y disminución en la difusión gaseosa alveolar. Estos cambios conllevan a una sobrecarga de presión sobre el ventrículo derecho del corazón, que al evolucionar conlleva a una insuficiencia cardíaca derecha. Modificado de Tobal *et al.* (2021).

**Tabla 1. Clasificación para variantes de hipertensión pulmonar según su etiología (editado de Simonneau *et al.*, 2019).**

Grupo clasificación HP	Variantes
<b>Grupo 1: Hipertensión pulmonar arterial</b>	<u>Idiopática</u> ; Heredable; inducida por drogas o toxinas; asociada a enfermedad de tejido conectivo, a infección por VIH, a hipertensión portal, a enfermedad cardíaca congénita, a infección por esquistosomiasis; causada por uso crónico de bloqueadores de calcio; venosa o capilar; hipertensión pulmonar persistente del recién nacido.
<b>Grupo 2: Hipertensión pulmonar secundaria a patología de corazón izquierdo</b>	Derivada de insuficiencia cardíaca con fracción de eyección ventricular izquierda preservada; derivada de insuficiencia cardíaca con fracción de eyección ventricular izquierda reducida; asociada a enfermedad de las válvulas cardíacas; asociada a condiciones cardiovasculares congénitas o adquiridas que conducen a hipertensión pulmonar postcapilar.
<b>Grupo 3: Hipertensión pulmonar secundaria a patología respiratoria</b>	Causada por EPOC; causada por EPR; asociada a patologías obstructivo/restrictivo; inducido por hipoxia; asociada a trastornos pulmonares del desarrollo.
<b>Grupo 4: Hipertensión pulmonar por obstrucciones de la arteria pulmonar</b>	Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica; asociada a otras obstrucciones de la arteria pulmonar.

<b>Grupo 5: Hipertensión pulmonar con mecanismos no esclarecidos o multifactoriales</b>	Asociada a desórdenes hematológicos, sistémicos y metabólicos; enfermedad cardíaca congénita compleja; otras causas.
---	--

Actualmente, los tratamientos utilizados para la HP, incluyendo HPAi, se enfocan en tres estrategias principales (**Figura 2**):

- Vía del óxido nítrico – GMPc

La intervención farmacológica de esta vía tiene como fin último aumentar la disponibilidad de GMPc para conllevar a la relajación de la musculatura lisa vascular pulmonar. Con este fin se utilizan inhibidores de la fosfodiesterasa 5, enzima que degrada GMPc (Lan *et al.*, 2018). Entre los medicamentos disponibles se destaca el uso de sildenafil y taladafil, mostrando mejorías en la prueba de la caminata de 6 minutos y disminución de la PAP media. Otra vía para aumentar los niveles de GMP es la de estimular la guanilato ciclasa soluble, entre el que destacamos el medicamento riociguat. Este medicamento mejoró la función cardiopulmonar, la prueba de caminata de 6 minutos y disminuyó la resistencia vascular pulmonar (Lan *et al.*, 2018; Ruopp & Cockrill, 2022).

- Vía de la endotelina

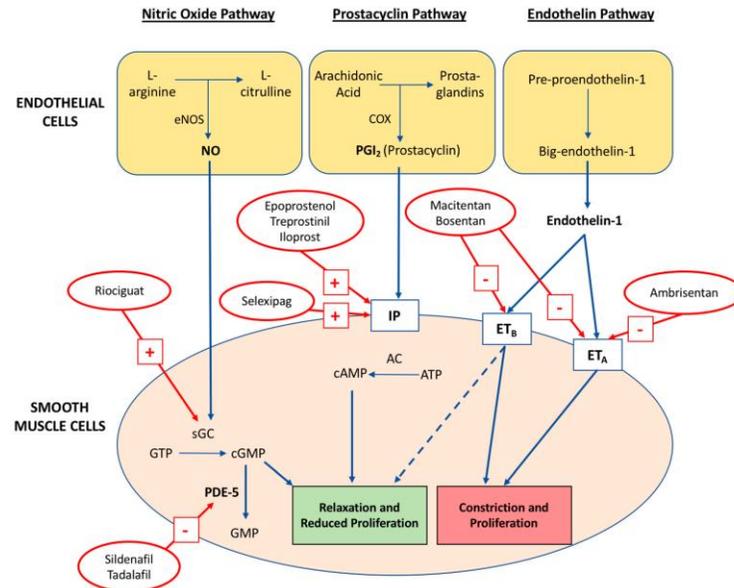
Esta estrategia surgió gracias al hallazgo de que la endotelina-1, un potente vasoconstrictor, está aumentada en la vasculatura pulmonar de pacientes HPA. Por esto, el uso de antagonistas del receptor de endotelina-1, tales como bosentan y ambrisentan conllevan a la vasodilatación de la musculatura lisa de la vasculatura pulmonar. Estos medicamentos aumentan la distancia en la caminata de 6 minutos comparado al placebo. Así también, otro fármaco de esta familia, el macitentan, retardó el tiempo de empeoramiento clínico de los pacientes (Lan *et al.*, 2018; Ruopp & Cockrill, 2022).

- Vía de las prostaciclinas

Las prostaciclinas son vasodilatadores pulmonares potentes y son producidos localmente por las células endoteliales. Medicamentos como el eprostenol, treprostinil e iloprost son las prostaciclinas sintéticas principalmente utilizadas, aunque el eprostenol es el que ha demostrado retrasar la mortalidad en pacientes. El treprostinil retarda el empeoramiento clínico y mejora el desempeño en la prueba de la caminata de 6 minutos. Adicionalmente, el agonista del receptor de prostaciclinas, selexipag, ha mostrado retardar el empeoramiento clínico de pacientes HPA (Lan *et al.*, 2018; Ruopp & Cockrill, 2022).

Si bien, estas estrategias han logrado aumentar la esperanza de vida desde 2 hasta 7 años, también debemos considerar el aumento de técnicas diagnósticas que ayudan a una detección temprana de la patología. A pesar de esto, la calidad de vida de los pacientes ha mostrado avances poco prometedores, por lo que considerando lo anterior, la HPA sigue siendo una afección incurable y progresiva a pesar de utilizar la mejor terapia disponible (Lan *et al.*, 2018; Ruopp & Cockrill, 2022). Por lo tanto, se deben seguir estudiando estrategias alternativas de tratamiento dirigidas a nuevas vías y blancos farmacológicos para mejorar los resultados en pacientes con esta enfermedad devastadora.

Para nuestro interés, destaca en el grupo 1 de HPA (Dodson *et al.*, 2018; Lan *et al.*, 2018; Thenappan, 2018) la hipertensión pulmonar arterial idiopática (HPAi). Esta presenta como principales características el no poseer una causa clara y concentrar la mayoría de los casos reportados (Lan *et al.*, 2018).



**Figura 2. Estrategias farmacológicas actuales para el tratamiento de la HPA.** Las estrategias farmacológicas desarrolladas para HPA se enfocan en estimular la relajación y reducir la proliferación de células PASMOC como también en inhibir la actividad vasoconstrictora y proliferadora de PASMOC (Lan *et al.*, 2018).

### 1.1 Hipertensión pulmonar arterial idiopática

La HPAi es un desorden crónico, progresivo e incapacitante y que actualmente no posee una cura farmacológica. Conlleva a una disminución en la calidad de vida del paciente, relacionado a problemas de salud mental, capacidad de ejercicio disminuida, aumento de síntomas crónicos y los efectos secundarios de las terapias médicas actuales (principalmente episodios de hipotensión) (Lan *et al.*, 2018; Thenappan *et al.*, 2018). La HPAi se acompaña de una vasculopatía de las arteriolas pulmonares, induciéndose disfunción y proliferación tanto de células endoteliales como musculares lisas, lo que conlleva a inflamación y trombosis aumentando la PAP en reposo (Lan *et al.*, 2018; Simonneau *et al.*, 2019; Thenappan *et al.*, 2018).

A pesar de ser una enfermedad rara (15 a 50 casos/millón), afecta mayormente a mujeres jóvenes y de mediana edad. Sin embargo, gracias a los avances en biomedicina se ha mostrado un aumento en la población de sobre 65 años que presenta la enfermedad (64% de los individuos diagnosticados), conllevando a una mayor carga de comorbilidades en comparación a la población histórica diagnosticada (35 años) (Maron & Galiè, 2016). El estudio de la HPA, tanto

en su patogénesis como en la generación de nuevos tratamientos es importante pues afecta a una población específica que tiene otras comorbilidades, magnificando el deterioro de salud de los afectados.

Relacionado a esto, se estima que aproximadamente el 75% de los pacientes afectados con HPA sufren de al menos una comorbilidad (Lang & Palazzini, 2019). Entre estas comorbilidades encontramos frecuentemente la hipertensión sistémica, eventos cardiovasculares isquémicos, obesidad, apnea del sueño, enfermedad obstructiva de las vías aéreas, depresión clínica y diabetes. Comorbilidades que al ser tratadas apropiadamente permiten mejorar la respuesta a la estrategia farmacológica estándar para HPA (Lang & Palazzini, 2019). Adicionalmente, debemos considerar la interacción farmacológica entre las diferentes formulaciones utilizadas para tratar la HPA y las comorbilidades descritas.

Como se mencionó anteriormente, las estrategias farmacológicas actuales utilizan como tejido efector la musculatura lisa de vasos pulmonares, entre los que destaca la musculatura lisa de la arteria pulmonar humana. Esto se condice con el hecho de que una de las características más importantes de la HPA es el engrosamiento de la arteria pulmonar debido a la proliferación de las células de la musculatura lisa arterial (PASMCs) (Touyz *et al.*, 2018). Dicha proliferación reduce el lumen del vaso, incrementando la presión en la arteria pulmonar (Dodson *et al.*, 2018; Thenappan, 2018). Las PASMCs adquieren un fenotipo “tipo canceroso” en HPAi, donde la hiperproliferación celular disminuye el diámetro vascular, aumentando la vasoconstricción y el remodelado del tejido arterial (Thenappan *et al.*, 2018; Touyz *et al.*, 2018).

## **1.2 Metabolismo de la musculatura arterial lisa arterial**

El anteriormente mencionado fenotipo “tipo canceroso” se caracteriza por ser altamente proliferativo, resistente a la apoptosis, ocurrir junto a la estabilización de factores transcripcionales hipóxicos, inducir un estado proinflamatorio y adquirir un fenotipo energético principalmente glicolítico (Culley & Chan, 2018; D’Alessandro *et al.*, 2018; Guignabert *et al.*, 2013; Thenappan *et al.*, 2018). Metabólicamente, las PASMCs pasan de obtener energía mayoritariamente desde procesos oxidativos dependientes de la mitocondria hacia una dependencia mayoritariamente glicolítica, lo que en células cancerosas se conoce como “Efecto

Warburg” (Culley & Chan, 2018). Este efecto se caracteriza por que el piruvato generado en la glicólisis no entra a la mitocondria para continuar con su metabolización por el ciclo del ácido cítrico y posterior fosforilación oxidativa, sino que es metabolizado a lactato. Adicionalmente, algunos estudios han mostrado que al revertir este efecto en HP se atenúa el remodelado vascular (Chen *et al.*, 2017). Adicionalmente, algunos estudios han mostrado que al prevenir la reprogramación glicolítica en HP, también se atenúa el remodelado vascular (Chen *et al.*, 2017). Por estos dos motivos es que, además, es posible utilizar la acumulación de lactato, como un indicador de este cambio metabólico que se observa en HP (Parra *et al.*, 2017).

Por otra parte, el metabolismo celular también depende del equilibrio estructural dinámico de la mitocondria, el cual se denomina dinámica mitocondrial. En modelos de hipertensión pulmonar se ha descrito que aumenta el fraccionamiento de la mitocondria (fisión) mediado principalmente por la proteína inductora de fisión mitocondrial DRP1 y disminución del mediador de fusión mitocondrial Mitofusina (Culley & Chan, 2018; Thenappan *et al.*, 2018). Es tal la relevancia de estos mediadores en la aparición de un fenotipo hipertenso que basta la inhibición de DRP1 para evitar la aparición de un fenotipo hipertenso inducido por hipoxia en PSMCs (Parra *et al.*, 2017).

Este cambio energético mitocondrial se manifiesta paralelamente con un aumento en la proliferación celular. hPSMCs de pacientes HPAi poseen un fenotipo hiperproliferativo, sensible a la inhibición por contacto resistente a la apoptosis y que se acompaña con una mayor estabilidad de los telómeros, en comparación al control y sin presencia de aberraciones cromosómicas (Perros *et al.*, 2019). Este fenotipo se acompaña con una función mitocondrial reducida y una menor expresión de los complejos I, II, III, IV y V de la cadena transportadora de electrones. La obtención basal de ATP no se reduce en comparación al control, pero las células provenientes de pacientes HPAi son más tolerantes al estrés energético inducido por hipoxia, ya que pueden generar 30% más de ATP y los niveles de ATP en hipoxia no presentan diferencias con los niveles de PSMCs HPAi en normoxia (Perros *et al.*, 2019). Este hallazgo muestra además que PSMCs-HPAi tienen una menor dependencia energética a la respiración celular gracias a la reprogramación glicolítica. Esta reprogramación celular de PSMCs-HPAi sería atribuible a la pérdida de expresión del factor transcripcional hipóxico HIF 1- $\alpha$ , conllevando al aumento del microARN (miARN)-543 y de endotelina 1 (Wang *et al.*, 2018).

Es interesante que este hallazgo se contradice con lo antes descrito para PASMCs que indica que en HPA los factores HIF se estabilizan y aumentan sus niveles (Bonnet *et al.*, 2006; Pullamseti *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2018). Esta diferencia podría ser atribuible al fenotipo hipertenso de los pacientes HPAi, siendo aquellos cuya musculatura lisa de la arteria pulmonar presenta mayor contractibilidad asociada a fosforilación de la cadena liviana de la miosina quienes presentan menores niveles de HIF 1- $\alpha$  (Barnes *et al.*, 2017). Adicionalmente, PASMCs-HPA presentan un fenotipo con estrés oxidativo elevado e inflamación (Eddahibi *et al.*, 2006; Hassoun *et al.*, 2009).

Un fenómeno relevante en el cambio fenotípico de PASMCs en HPA son los mecanismos de señalización mecánica. Las proteínas contráctiles de este tipo celular al encontrarse desreguladas producen vasoconstricción persistente acompañado de hiperplasia de la neoíntima, hipertrofia y aumento de la motilidad celular. La respuesta de PASMCs frente a la vasoconstricción se ejecuta principalmente por la vía de señalización NFAT, aumentando la rigidez de la arteria pulmonar mediante la proliferación mediada por miARNs y una señalización alterada de BMP y TGF $\beta$ 1, combinado con un aumento de las proteínas de matriz extracelular conllevando a la remodelación última de la vasculatura (Wang & Valdez-Jasso., 2021).

Para complementar lo indicado con anterioridad, es también importante el indicar que en la musculatura lisa de la arteria pulmonar existen diferentes subpoblaciones, dentro de las que encontramos PASMCs senescentes. En un modelo hipóxico, estas células senescentes inducen proliferación de PASMCs mediante la acción paracrina de IL-6, sugiriendo que la inhibición de este programa celular permitiría contribuir a disminuir la proliferación muscular lisa y atenuar el remodelado vascular (Wang *et al.*, 2021).

Ya explicitado el cambio fenotípico de PASMC en HPAi es necesario enfocarnos en los factores de riesgo. Las mujeres padecen con mayor frecuencia HPAi, y así también el tener niveles elevados de estrógenos en plasma aumenta el riesgo (Tofovic & Jackson., 2020; Umar *et al.*, 2012), incluso los hombres que poseen una mayor razón 17 $\beta$ -estradiol (E2)/testosterona o E2/progesterona tienen mayor incidencia de HPAi (Wu *et al.*, 2018). A pesar de esto, son las mujeres quienes tienen mayor esperanza de vida debido al factor protector cardiovascular del estradiol, configurando la “paradoja del estrógeno” (Tofovic, 2011). La paradoja del estrógeno

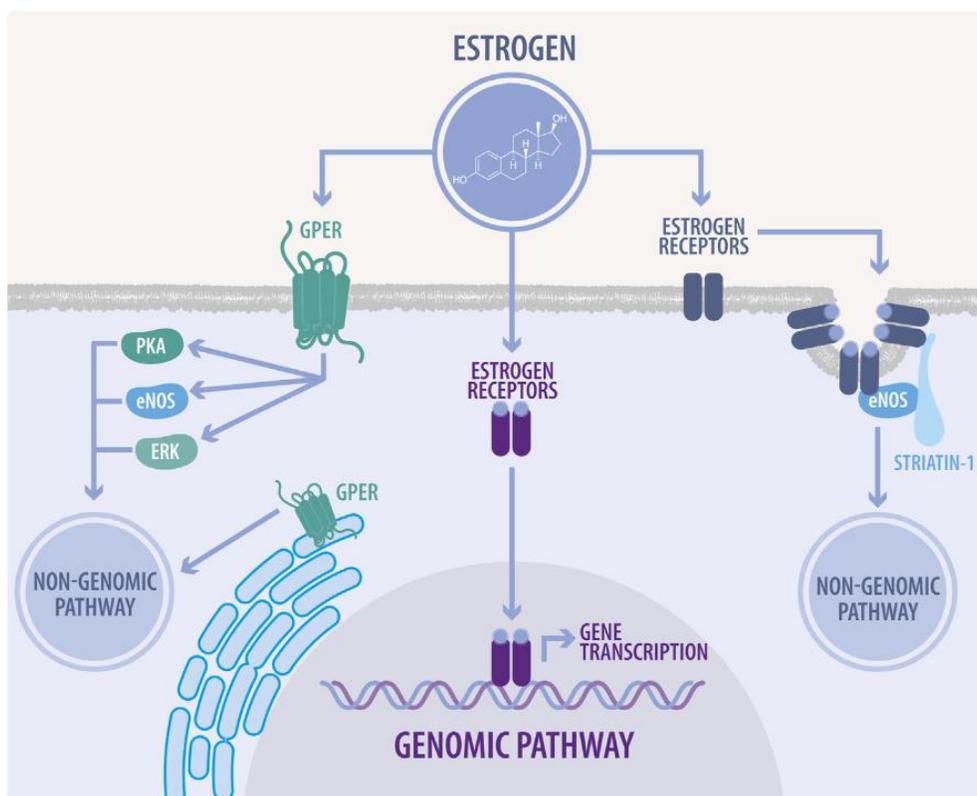
está presente incluso en modelos experimentales de laboratorio, mostrando E2, tanto efectos nocivos como beneficiosos en diferentes modelos de hipertensión pulmonar, indicando que aún queda campo de estudio para dilucidar el cómo los estrógenos predisponen a HPAi (Hemnes & Humbert, 2017; de Jesús-Pérez, 2011).

### 1.3 “La paradoja del estrógeno”

Como se mencionó anteriormente, las mujeres padecen HPAi con mayor frecuencia. Además, poseen un riesgo 50 veces mayor de sufrir la patología si sus niveles de Estradiol (E2) están aumentados. Adicionalmente, hombres que presentan HPAi poseen frecuentemente una razón E2/testosterona o E2/progesterona aumentada en comparación a individuos sanos (Wu *et al.*, 2018). En cuanto a esperanza de vida, las mujeres tienen una mayor esperanza y calidad de vida, la que en parte se atribuye al efecto cardioprotector que muestran los estrógenos, configurando la denominada “paradoja del estrógeno” (Tofovic, 2011). Esta paradoja se presenta en modelos experimentales de laboratorio, pues tenemos antecedentes del uso protector de E2 en el desarrollo de HPA, como también de su efecto perjudicial (Hemnes & Humbert, 2017). Es importante destacar que algunos estudios han vinculado el uso de la pastilla contraceptiva y la terapia de reemplazo hormonal con un mayor riesgo de sufrir la patología, pero dicho vínculo aún no es claro (Mair *et al.*, 2014).

Los estrógenos son hormonas esteroidales, principalmente E2, estrona (E2) y estriol (E3). La mayor fuente de estrógenos en las mujeres son los ovarios, aunque se ha demostrado producción de estos esteroides en tejidos extraováricos (Simpson *et al.*, 2005). Biológicamente, es el E2 quién posee la mayor actividad, estando mediada dicha actividad por vías genómicas/clásicas gracias a los receptores de estrógeno (ER)  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos receptores dimerizan, exponiendo sitios de reconocimiento de ADN e interactuando con ellos, promoviendo la transcripción. En la vía no clásica, los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y el receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER), pueden activar vías de señalización celular al interactuar con su ligando, sin necesidad de mediar transcripción para obtener el efecto biológico estudiado (**Figura 3**) (Guajardo-Correa *et al.*, 2022; McDevitt *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2010; Maggiolini & Picard, 2010). Adicionalmente, se suele reducir la acción de algunos compuestos a la categoría de “compuesto estrogénico” o “con actividad estrogénica”, lo que hace referencia a la capacidad de activar

directamente los receptores de estrógenos clásicos conllevando a características proliferativas y de transcripción de genes asociados a elementos de respuesta a estrógenos presentes en el ADN (Klinge, 2017; Liao *et al.*, 2015).



**Figura 3. Señalización estrogénica genómica y no genómica.** Para ejercer su actividad biológica, los estrógenos pueden actuar tanto por una vía genómica como por una vía no genómica. En la vía genómica, los estrógenos difunden la membrana plasmática y activan ERs citoplasmáticos y/o nucleares, estimulando la transcripción de genes. En la vía no genómica, los estrógenos modifican la actividad enzimática celular mediante modificaciones proteicas postraduccionales regulando la actividad de vías de señalización. Esto puede ser mediante activación de GPER o de isoformas de los ERs anclados a membrana plasmática (Gujardo-Correa *et al.*, 2022).

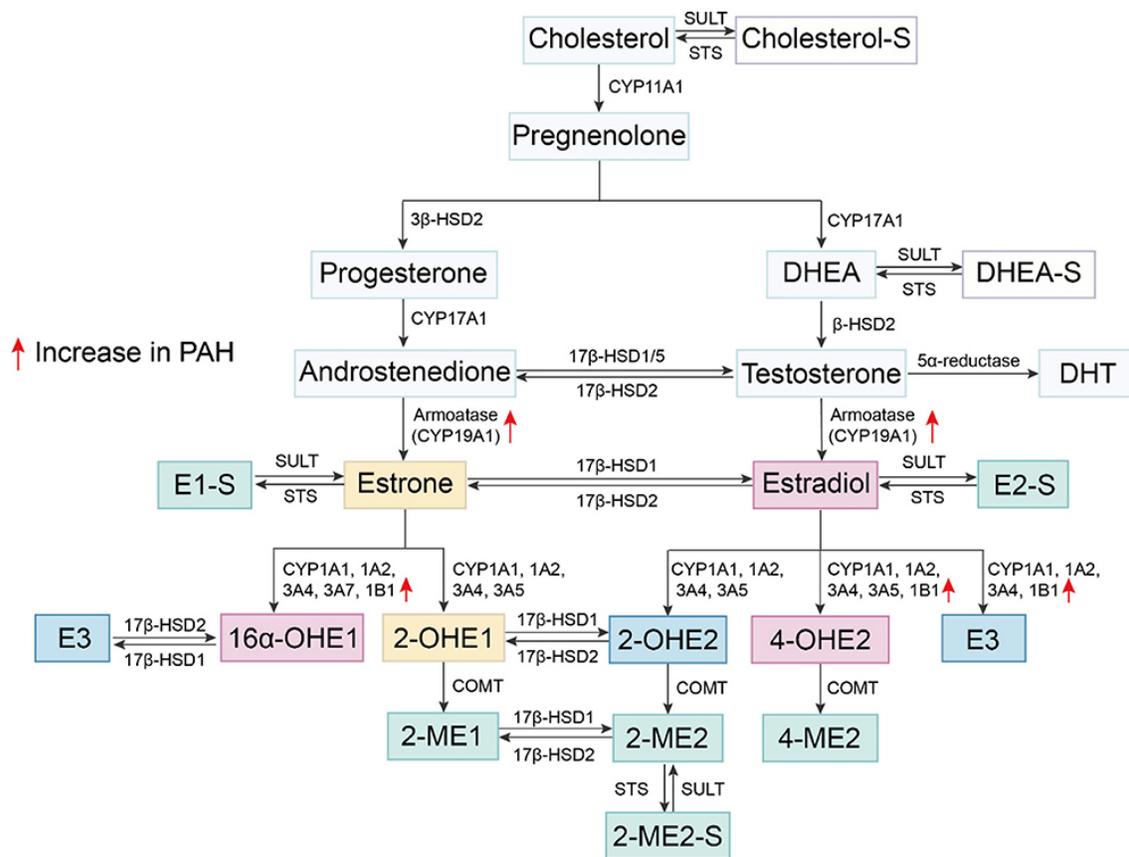
Luego de ejercer su acción celular el E2 es inactivado y removido mediante una serie de reacciones metabólicas. Estas ocurren principalmente en el tejido hepático, aunque se ha reportado que tejidos extra-hepáticos expresan las enzimas requeridas para la metabolización del E2, sugiriendo que estos tejidos producen metabolitos asociados a la inactivación del E2 (Parada-Bustamante *et al.*, 2013). Este metabolismo comienza con la conversión de 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\beta$ -estrona, catalizado por la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

(Figura 4). Posteriormente, la inactivación continúa mediante 2 vías, una hidroxilación en el anillo A que conlleva a la formación de 2-hidroxiestróna y 4-hidroxiestróna, y por otra parte la oxidación del anillo D formándose así 16- $\alpha$  hidroxiestróna (Parada-Bustamante *et al.*, 2013). Los metoxiestrógenos formados son 4-metoxiestradiol (4-ME) a partir de 4-hidroxiestróna y 2-metoxiestradiol (2-ME) a partir de 2-hidroxiestróna (Parada-Bustamante *et al.*, 2013; Eliassen *et al.*, 2012) (Figura 4).

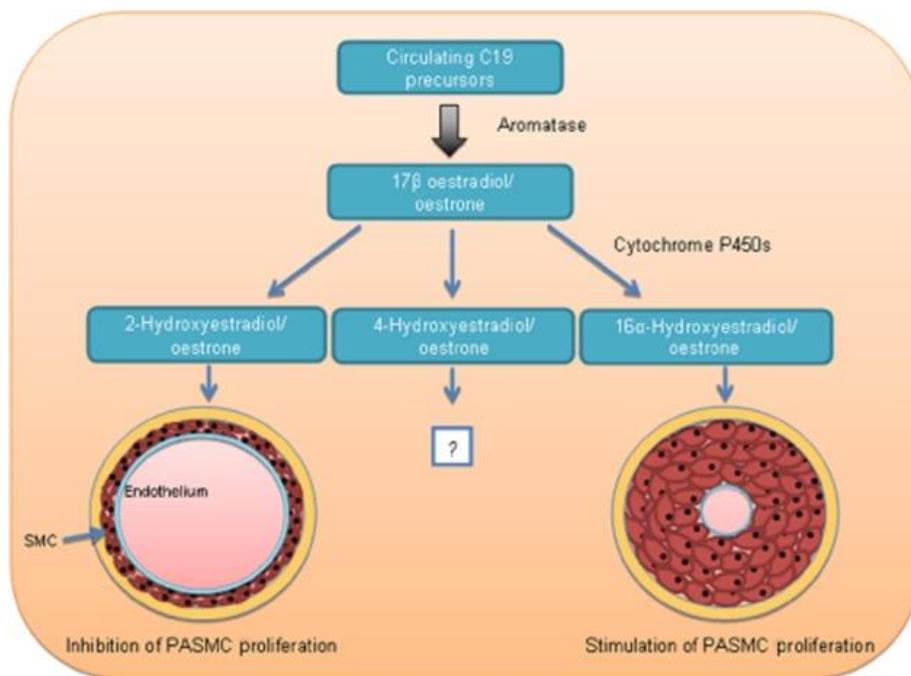
En relación con HPA, se ha mostrado que E2 induce proliferación de PSMCs en concentraciones suprafisiológicas (100 nM) (Mair *et al.*, 2015). Además, 2-ME tiene un rol protector debido a la inhibición de la proliferación de células musculares lisas, lo que está en directa relación con su actividad proapoptótica y antiproliferativa (Mair *et al.*, 2014). Por otra parte, la 16- $\alpha$  hidroxiestróna ha mostrado inducir proliferación de las PSMC e inducir HP en modelos *in vivo* (Mair *et al.*, 2014). Este antecedente indicaría que 16- $\alpha$  hidroxiestróna es el metabolito involucrado en la patogénesis asociada a estrógenos. Adicionalmente, se ha mostrado que la enzima CYP1B1, que metaboliza el E2 hacia hidroxiestógenos y 16- $\alpha$  hidroxiestróna si tiene un rol en la patogénesis, correlacionado con niveles elevados de este último metabolito en la orina de ratones hipertensos pulmonares (Li *et al.*, 2017; White *et al.*, 2012). Algo similar se analizó en pacientes con HP vinculada a mutaciones hereditarias en BMPR2, midiendo en mujeres razón urinaria de 2-hidroxiestradiol/16- $\alpha$  hidroxiestróna. Estos resultados mostraron que solo las pacientes que conllevan la mutación poseen disminuido este parámetro debido al aumento de 16- $\alpha$  hidroxiestróna y que estaría involucrado a mutaciones en CYP1B1 relacionando todo esto a HPA hereditaria, más no a HP*Ai* (Austin *et al.*, 2009). Esto muestra la acción diferencial de los metabolitos del E2 en un mismo modelo experimental (Figura 5). Esto nos permite sugerir que para evaluar la aparición de posibles patologías o efectos tejido específico de estrógenos y sus metabolitos biológicamente activos, no basta solo con medir sus niveles plasmáticos. Si adicionalmente consideramos que hasta la fecha aún no existen reportes del metabolito 4-ME en la patología, esto reafirma la necesidad de dilucidar el metabolito directamente relacionado en la proliferación de las PSMCs.

Dentro de los pocos estudios con 4-ME y pulmón está el trabajo de Cheng *et al.* (2007) en donde muestran que 4-ME aumenta el estado oxidativo e induce daño en ADN de células epiteliales de pulmón. En dicho estudio se mostró que este metabolito también podía inducir

arresto mitótico de células cancerígenas, haciendo hincapié en la necesidad de explorar su genotoxicidad y probable potencial carcinogénico (Cheng *et al.*, 2007).



**Figura 4. Síntesis y metabolismo de estrógenos en contexto de HPA.** Los estrógenos son sintetizados a partir de la conversión de colesterol a pregnenolona por parte de la enzima CYP11A1 y reacciones sucesivas que conllevan a la formación de E1 y E2. Existe un equilibrio de interconversión entre E1 y E2 gracias a la enzima 17β-HSD. Posteriormente, los estrógenos pueden ser metabolizados hacia los hidroxiestrógenos: 16α-hidroxiestrone, 2-hidroxiestrone, 2-hidroxiestradiol, 4-hidroxiestradiol o E3. Luego, estos hidroxiestrógenos pueden ser metabolizados por la enzima catecol-O-metiltransferasa para generar los metoxiestrógenos: 2-metoxiestrone, 2-ME o 4-ME. Se presenta en flechas rojas el compendio de hallazgos sobre la actividad y expresión de las enzimas pertenecientes al CYP450 de las cuales se tienen antecedentes que incrementan en HPA (editado de Sun *et al.*, 2021).



**Figura 5. Efectos reportados de metabolitos del E2 sobre PSMCs.** El E2 al ser metabolizado puede generar diversos metabolitos, entre los destacados se muestra que los metabolitos modificados en el carbono 2 inhiben la proliferación de PSMCs; los metabolitos modificados en el carbono 16 poseen actividad proliferativa sobre PSMCs; y que los metabolitos modificados en el carbono 4 no se tienen reportes claros sobre su efecto en PSMC (Mair *et al.*, 2014).

#### 1.4 Estrógenos, metabolismo energético y mitocondria

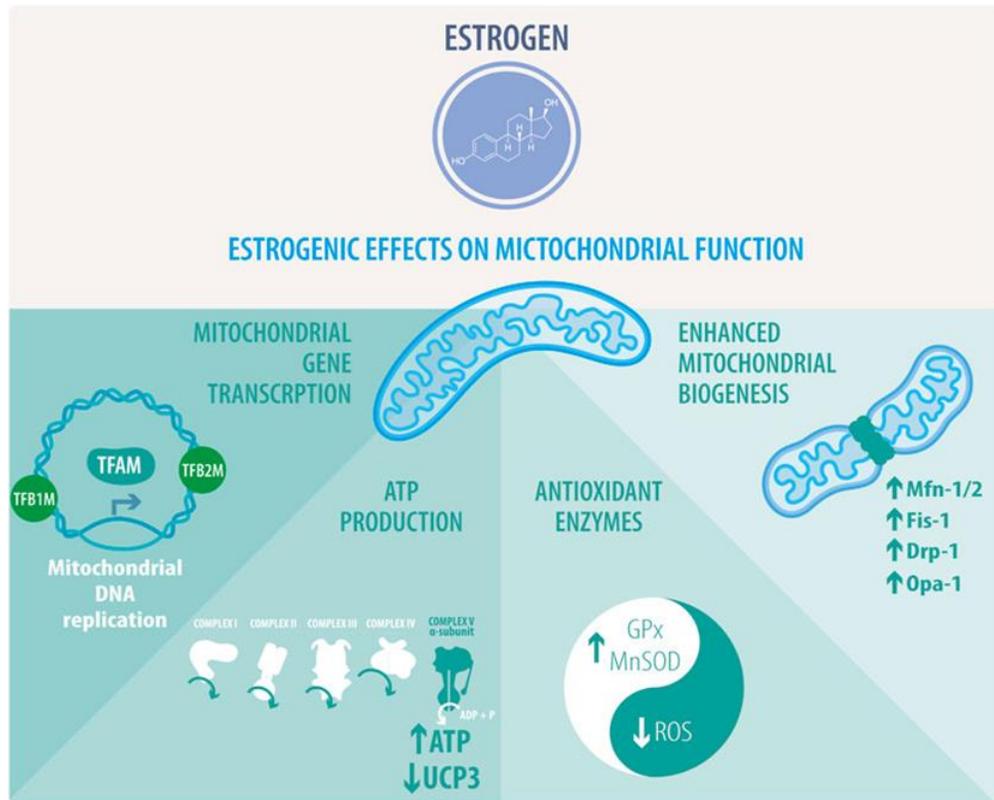
Hasta la fecha, no existe información publicada que relacione estrógenos y mitocondria en HPAi. Las principales evidencias las encontramos gracias a los hallazgos en cáncer, lo que considerando el fenotipo canceroso descrito en HPA, puede ser de gran ayuda para aproximarnos a los eventos que estarían ocurriendo en las PSMCs. Adicionalmente, es de destacar que la mitocondria posee receptores de estrógenos, y que su ADN posee secuencias consideradas como “Elementos de respuesta a estrógenos” predichas (Liao *et al.*, 2015). Además, la activación y expresión diferencial de los receptores clásicos de estrógenos están involucrados directamente a los cambios metabólicos mitocondriales descritos anteriormente (Liao *et al.*, 2015).

Una de las maneras de regular la función mitocondrial es a nivel transcripcional, específicamente a nivel del ADNmt, el que se encuentra limitado a la expresión de las 13

subunidades respiratorias. Si bien esta expresión está ejecutándose a nivel mitocondrial, está gobernada por factores transcripcionales (FT) mitocondriales como el factor transcripcional mitocondrial A (TFAM), factor transcripcional mitocondrial B1 (TFB1M), B2 (TFB2M) y el factor mitocondrial de terminación de la transcripción (mTERF). Así también, la mitogénesis y expresión de genes respiratorios mitocondriales está regulada por la familia de coactivadores PGC1 que interactúan con el factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) y  $2\alpha$  (NRF2 $\alpha$ ) y el receptor relacionado a estrógenos  $\alpha$  (Guajardo-Correa *et al.*, 2022; Scarpulla, 2006; Svaguša *et al.*, 2020; Del Campo *et al.*, 2021).

Es importante destacar que los estrógenos, al modificar la expresión del ADNmt, están regulando directamente la actividad de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Guajardo-Correa *et al.*, 2022). Específicamente, mediante la regulación en la expresión de NRF1 se puede inducir la expresión de la subunidad 1 del citocromo c y la subunidad 1 NADH deshidrogenasa (Mattingly *et al.*, 2008; Azuma and Inoue, 2012), además de disminuir la expresión de la proteína desacoplante 3 (UCP3). Estos cambios preservan la diferencia de gradiente mitocondrial y la obtención de ATP. Estos hallazgos se correlacionan a la activación de ER $\alpha$  que suprime la fuga de protones y la disipación de energía (Nagai *et al.*, 2016). En líneas celulares de cáncer se ha descrito que E2 aumenta el consumo de oxígeno lo que sugiere el favorecimiento de un fenotipo oxidativo, pero siendo estos resultados dependientes de la línea celular (Klinge, 2008, 2017; Liao *et al.*, 2015).

Adicionalmente, E2 aumenta la expresión de MFN1, MFN2, OPA1 y DRP1, estimulando la fusión mitocondrial y el alza en los niveles de ATP. También disminuye la expresión de Fis1 vía ERs (Sastre-Serra *et al.*, 2012). Dicotómicamente, E2 en células MCF-7 activa ER $\alpha$ , siendo este evento requerido para la fosforilación en la serina 616 de DRP1, aumentando la fisión (fragmentación) mitocondrial (Oo *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha reportado que E2 aumenta la proteína DRP1 en células de cáncer mamario MDA-MB-231, pero no así en MCF-7, lo que nos muestra que podría estar favoreciendo la fusión o fisión dependiendo del modelo (Klinge, 2017).



**Figura 6. Efectos estrogénicos sobre la función mitocondrial.** En el sistema cardiovascular se han descrito extensamente los efectos protectores del E2. Esta propiedad se fundamenta en parte por los efectos que posee sobre la función mitocondrial. Entre estas funciones se encuentra estimular la replicación del ADN mitocondrial mediante inducción de TFAM; estimular la producción de ATP mediante el aumento de expresión de la CTE y OXPHOS como la preservación de la gradiente electroquímica mediante disminución de la UCP3; aumento de la biogénesis mitocondrial; y aumento de la capacidad antioxidante celular (Guajardo-Correa *et al.*, 2016).

Estos antecedentes contradictorios pero interesantes respaldan la necesidad de esclarecer que ocurre tanto con el metabolismo energético, como con la dinámica mitocondrial en PSMCs fenotípicamente hipertensas por exposición a estrógenos.

Hasta la fecha, no existen mecanismos descritos asociados a la aparición de HPAi exclusivamente por estrógenos en modelos *in vivo* o *in vitro*, por lo que es necesario realizar enfoques novedosos ligados a la firma de expresión genética y metabólica en la patología, para así acercarnos a los puntos de control maestros.

## 1.5 Respuestas transcripcionales en HPA

Las células eucariotas responden frente a los estímulos internos y externos activando o reprimiendo cascadas de señalización que modulan la expresión de genes nucleares y/o mitocondriales mediante elementos regulatorios como factores de transcripción, co-reguladores y ARNs no codificantes, alterando la expresión génica (Roux & Topisirovic., 2018; Burenina, Oretskaya & Kubareva., 2017; Haberle & Stark., 2018; Venters & Pugh., 2009). Para poder estudiar estos cambios es necesario recurrir a una aproximación de biología de sistemas. Esta se define como el estudio a gran escala o escala global de procesos biológicos mediante la construcción de modelos. En nuestro contexto, estos modelos se construyen en base a la interpretación de datos “ómicos”, entre las que encontramos las micromatrices de ADN y secuenciación de ácidos nucleicos en alta resolución, permitiendo integrar e interpretar los datos utilizados con las bases de datos disponibles según el interés del estudio. Esto último nos permite superar la visión reduccionista en la que nos encasilla el únicamente describir cambios en la expresión de mensajeros puntuales (Karahalil., 2016).

Las redes de regulación transcripcional (RRT) basadas en análisis de biología de sistemas consisten en modelos en los cuales los factores de transcripción (FTs) y sus genes blancos integran un circuito de interacciones complejas. Esta interacción depende principalmente de la capacidad de un FT de identificar un determinado sitio de unión dentro de la región regulatoria de sus blancos (Babu *et al.*, 2004). En organismos eucariontes, para lograr construir estas RRTs, se debe contrastar los datos experimentales obtenidos con bases de datos ya curadas y validadas. TRRUST corresponde al conjunto de siglas en inglés para *Transcriptional Regulatory Relationships Unraveled by Sentence-based Text mining* y nos entrega una base de datos de referencia de las interacciones transcripcionales regulatorias tanto en humanos como en ratones y es construida en base a las interacciones ya descritas en literatura (Han *et al.*, 2018).

Las reconstrucciones de redes a escala genómica han permitido develar las bases moleculares del metabolismo. Al comprender a la HPAi como una patología íntimamente metabólica, es que utilizando base de datos de regulación génica sobre componentes del metabolismo celular es que podemos realizar un acercamiento a las modificaciones catabólicas y anabólicas que se pueden estar generando en el tejido pulmonar de los pacientes. Para esto, tenemos disponible la base de datos humana de metabolismo sistémico RECON 3D. Dicha base de datos permite

un análisis integrado de firmas de respuesta metabólicas humanas frente a la exposición a diferentes condiciones. A la fecha, RECON3D representa el modelo integrado génico-metabólico más completo a la fecha (Brunk *et al.*, 2018). Esta base de datos está compuesta por 3288 marcos de lectura abierto (representando el 17% de genes humanos funcionales descritos), 13543 reacciones metabólicas que involucran 4141 metabolitos individuales y su interacción con 12890 estructuras proteicas. Todo esto nos entrega una herramienta de investigación excepcional para evaluar mecanismos metabólicos humanos (Brunk *et al.*, 2018).

Al ser activados, los factores de transcripción reconocen elementos de respuesta particulares en los promotores de sus genes blanco, induciendo un cambio en el programa de expresión génica. Esta reprogramación conlleva también la regulación específica entre grupos de factores transcripcionales, entre las que, considerando el contexto de la presente tesis, podemos destacar el programa transcripcional asociado ER  $\alpha$  y/o  $\beta$  (Guajardo-Correa *et al.*, 2022).

Este programa transcripcional es tejido específico y depende íntimamente en los cofactores reclutados por el ligando que interactúa con el ER. Entre los principales coactivadores descritos para ER encontramos *NCOA1*, *NCOA2*, *NCOA3*, *PPARBP*, *CREBBP* y *EP300*. Entre los principales corepresores para ER se ha descrito a *NCOR1*, *NCOR2* y *NRIP1*. A esta complejidad de regulación en la actividad transcripcional de los ERs podemos agregar una capa extra por causa de los miARN que regulan la actividad de los coactivadores y corepresores (McCafferty *et al.*, 2009; Sun and Xu, 2020). Indicando que, si bien los datos entregados por las RRTs son útiles, aún no nos entregan claridad completa de los procesos moleculares reguladores en la expresión génica que conllevarán a la modulación metabólica tejido específico.

Uno de los estudios pioneros en el contexto de HPA fue el realizado por Bull *et al.* (2004), permitiendo identificar un grupo de 106 genes expresados diferencialmente comparado con el grupo control. Este grupo de genes diferencialmente expresados considera tanto los expresados al alza como a la baja. Es de destacar que el uso de micromatrices mostró que existen grupos de genes expresados a la baja en HPA que permite predecir y distinguir entre las diferentes clasificaciones de la patología (Cui *et al.*, 2019).

Posteriormente, otro de los hallazgos a destacar en HPA es el de Luo *et al.* (2020), quienes demostraron que en hPASCs existe una reprogramación transcripcional que conlleva a un

aumento de genes vinculados a la proliferación celular y estimulación de la mitosis. Así también, Stearman *et al.* (2019) realizaron un análisis por micromatrices de tejido pulmonar total, encontrando nodos regulatorios que demuestran la activación de un programa proliferativo y del rol relevante que tendría el receptor de estrógenos alfa en la aparición de HPAi. Este último hallazgo fue desestimado por los autores por causa de sobre representación de pacientes femeninas en su estudio, atribuyéndolo como un sesgo del mismo (Stearman *et al.*, 2019).

Los análisis transcriptómicos actuales tienden a centrarse en las variantes de HP no individualizadas, por causa de la baja disponibilidad de pacientes para realizar los estudios. Esto además de sugerirnos individualizar los grupos patológicos al momento de realizar los análisis de expresión diferencial y construcción de la red regulatoria, también debería permitirnos el encontrar una huella diferenciadora entre formas de HP. Especialmente, en el caso de HPAi, actualmente tenemos la posibilidad de discernir las diferencias transcripcionales entre hombres y mujeres, como también encontrar el programa transcripcional patológico común.

### **1.6 Resumen de las principales evidencias**

La necesidad de encontrar mecanismos asociados a la aparición de HPAi relacionados principalmente a la paradoja del estrógeno, en conjunto con el fenotipo canceroso ligado a la hiperproliferación celular, dinámica y energética mitocondrial descrito para las PASMCM complementado con el rol no esclarecido del E2 y el 4-ME en dicha patología, nos sugieren plantear las siguientes preguntas:

- ¿E2 y 4-ME aumentan la proliferación celular de hPASMCMs?
- ¿E2 y 4ME afectan la energética mitocondrial?
- ¿Este efecto depende de los receptores de estrógenos?
- ¿La relevancia del E2 y su metabolismo en la reprogramación disfuncional de hPAMSCs se correlaciona con la reprogramación transcripcional metabólica que ocurre en tejido pulmonar de pacientes HPAi?

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

*17  $\beta$ -estradiol y su metabolito 4-metoxiestradiol, inducen proliferación de las hPASMCs a través de un mecanismo dependiente de la inhibición de la función mitocondrial y las vías de receptores de estrógenos clásicas y no clásicas, reflejando el fenotipo patológico encontrado en pacientes hipertensos pulmonares arteriales idiopáticos.*

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del 17  $\beta$ -estradiol, su metabolito 4-metoxiestradiol, así como el/los receptor/es de estrógenos por el cual se induce un fenotipo proliferativo acompañado de disfunción mitocondrial en células musculares lisas de arteria pulmonar humana (hPASMCs), correlacionándolo con hallazgos en redes transcripcionales metabólicas de pacientes HPAi.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.1 Evaluar el efecto del 17  $\beta$ -estradiol y su metabolito 4-metoxiestradiol en la proliferación de hPASMCs.
- 4.2 Determinar el efecto del 17  $\beta$ -estradiol y su metabolito 4-metoxiestradiol en la función mitocondrial.
- 4.3 Evaluar la participación de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER en los efectos sobre hPASMC inducido por 17  $\beta$ -estradiol y 4-Metoxiestradiol.
- 4.4 Analizar redes de regulación transcripcional asociadas al metabolismo energético y hormonal que se encuentren controladas por nodos estrogénicos en bases de datos transcripcionales de tejido pulmonar provenientes de pacientes HPAi.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

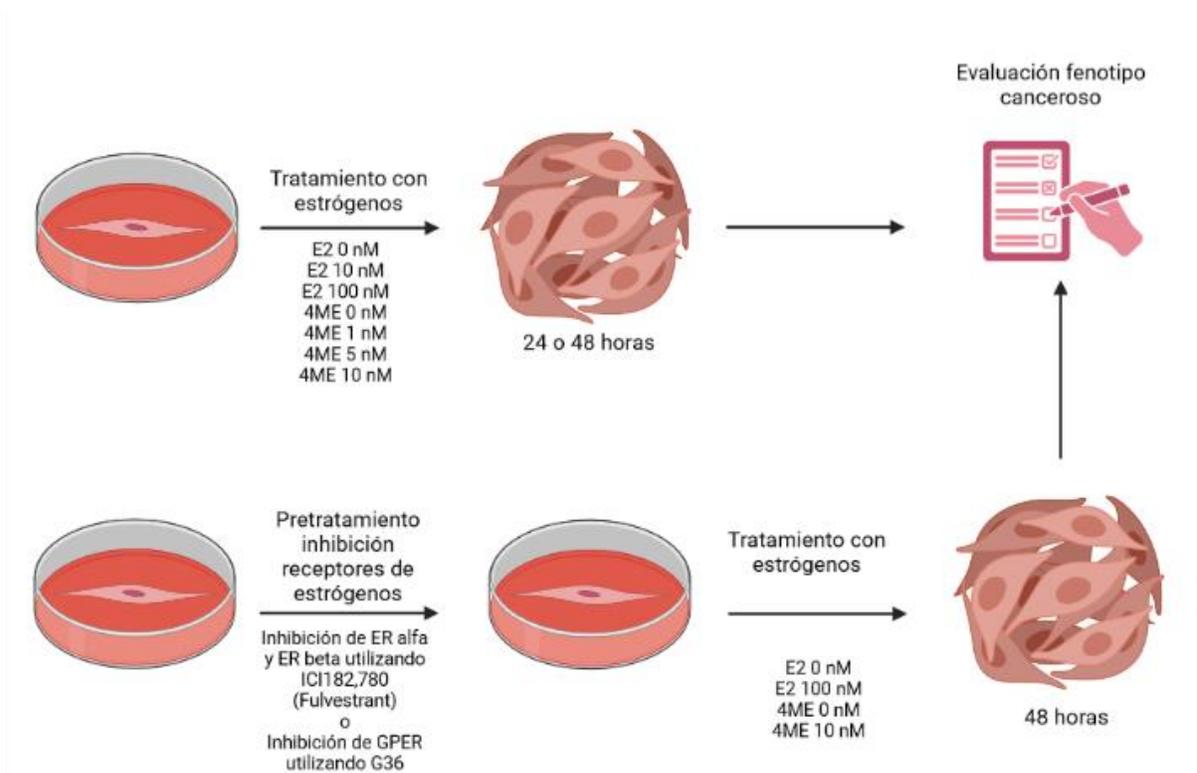
### **5.1 Cultivo de hPASMCs**

Para la ejecución de esta tesis, se utilizó como modelo experimental cultivos células de músculo liso de arteria pulmonar humana (hPASMC) obtenidas desde la compañía THERMO Life

Technologies (C0095C), considerando de no sobrepasar el pasaje 10 para la ejecución de los análisis experimentales. Dicho cultivo fue mantenido en medio 231 (Life Technologies, M-231-500) enriquecido con un 5% del suplemento para crecimiento de músculo liso/SMGS (Thermo Life Technologies; S-007-25) y gentamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Winkler, Lampa, CL). Las hPASCs se mantuvieron en una incubadora a 37°C y atmósfera húmeda con 5%  $\text{CO}_2$  y 95% aire. El cultivo se realizó bajo condiciones de esterilidad, manipulando las células en una campana de flujo laminar. Las células se sembraron en placas de 100 mm a baja confluencia para permitir su proliferación (Bravo-Sagua *et al.*, 2016).

## 5.2 Tratamientos

Las hPASCs se trataron con 17 beta-estradiol (Abcam; ab120657) a concentraciones E2 0 nM (considerado como control experimental; etanol al 0,01%), E2 10 nM y E2 100 nM o 4-metoxiestradiol (Steraloids; E2510-000) a concentraciones 0 (considerado como control experimental; etanol al 0,01%), 1, 5, y 10 nM para evaluar la aparición de un fenotipo “canceroso” durante 24 y 48 horas (**Figura 7A**). Para evaluar el rol de los receptores de estrógenos previo al tratamiento descrito, hPASCs se incubaron previamente durante 3 horas con ICI 182,780 (Tocris; 1047) para inhibir  $\text{ER}\alpha$  y  $\text{ER}\beta$  o con G36 (Tocris; 4759) para inhibir GPER, manteniéndose los tratamientos posteriores con estrógenos durante 48 horas (**Figura 7B**).



**Figura 7. Esquema experimental utilizado en hPASCs.** (A) hPASCs se trataron con estrógenos o sus respectivos controles durante 24 o 48 horas para posteriormente evaluar características de un fenotipo “canceroso”. (B) Para evaluar el mecanismo de acción por el cual los estrógenos ejercen su efecto en hPASCs, estas se pretrataron durante 3 horas con ICI182,780 o G36, y posteriormente se trataron con E2 100 nM o 4-ME 10 nM. Creado con BioRender.com.

### 5.3 Ensayo MTS

La proliferación celular relativa se determinó usando el reactivo MTS (CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay, Promega). Las hPASCs se sembraron en placas de 96 pocillos hasta alcanzar 60% de confluencia. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cada pocillo, adicionando 200  $\mu$ L de medio 231 sin suplementar y 20  $\mu$ L de MTS. La reacción de reducción de MTS a formazán fue medida utilizando un lector ELISA Infinite 150 (Tecan, Suiza) a una absorbancia de 492 nm.

#### **5.4 Proliferación y viabilidad por exclusión de azul tripán**

Este colorante derivado de la toluidina es capaz de ingresar a las células muertas pues las membranas se vuelven permeables, con lo que se puede realizar una razón de células vivas/células totales al microscopio de luz y obtener una estimación de la viabilidad (Strober., 2015). Una vez finalizado el esquema temporal del tratamiento utilizado en las hPASCs, las células se lavaron con solución de PBS y se agregó 1 mL de solución de tripsina 1X durante 5 minutos a 37 °C con el fin de soltar las células, deteniendo la reacción con 2 mL de PBS 10% suero fetal bovino (FBS). De esta suspensión de células se tomaron 20 µL en un tubo Eppendorf y se agregaron 20 µL de azul de tripán al 0,4% en PBS. Este conteo se realizó mediante cuantificación automatizada utilizando el equipo TC20 automated cell counter (Bio-Rad).

#### **5.5 Ciclo celular por ioduro de propidio**

El ioduro de propidio (IP) puede ingresar a las células que se encuentran permeabilizadas e interactuar directamente con el ADN en el núcleo. Esta interacción permite ser detectada utilizando canales de detección para color rojo en el citómetro de flujo. El resultado obtenido permite relacionar una mayor intensidad de la señal con la cantidad de ADN en la célula. Está ampliamente descrito que la cantidad de ADN varía a lo largo de las etapas del ciclo celular, llegando a un máximo cuando las células están en fase G2/M, previa a la división celular (Matthews HK *et al.*, 2022).

Para esta determinación se sembraron hPASCs en placas de 12 pocillos hasta alcanzar un 60% de confluencia. Una vez finalizado los estímulos, se colectó el medio de cultivo (1 mL) y las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría y se agregaron 300 µL de solución de tripsina 1X durante 5 minutos a 37°C para levantar las células. Esta reacción se detuvo con 30 µL de FBS). Las células en suspensión se traspasaron a tubos de citómetro correspondientes junto con el medio de cultivo colectado y se centrifugaron durante 5 minutos a 370 g. Se descartó el sobrenadante, las células se fijaron con metanol frío y se almacenaron durante 12 horas a -20°C. Posterior a esto, las células se centrifugaron nuevamente a 370 g durante 5 minutos, se resuspendieron en 500 µL de PBS y se incubaron durante 1 hora con ARNasa a temperatura ambiente. Luego de este período de tiempo, las células son nuevamente

centrifugadas y resuspendidas en 500  $\mu\text{L}$  de PBS con yoduro de propidio (PI) a una concentración de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El IP tiene una longitud de onda de excitación 493 nm y emisión 630 nm lo que permite ser leído en el canal rojo mediante citometría de flujo en el equipo BD Accuri C6, considerando como umbral de fluorescencia aquella emitida por una muestra sin IP.

### **5.6 Viabilidad celular por IP y anexina V**

La apoptosis celular puede ser dividida en temprana y tardía. El primer evento en la membrana plasmática al iniciarse la apoptosis es el cambio de posición del fosfolípido fosfatidilserina desde la cara intracelular hacia la extracelular. Este paso puede ser rastreado mediante el uso de anexina V en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , que interactúa específicamente con dicho fosfolípido. Luego, en la apoptosis tardía o avanzada la membrana plasmática pierde su integridad mediante la acción de caspasas efectoras, las cuales generan poros en la célula y permiten el ingreso de moléculas externas que anteriormente no eran permeables. Gracias a esto podemos utilizar al IP como indicador positivo de la aparición de poros en la membrana (Lakshmanan & Batra., 2013). El uso combinado de anexina V y IP nos permite la construcción de un gráfico de señales mixtas (canal verde vs canal rojo) siendo las células completamente viables doble negativos para la señal y las que están en apoptosis tardía serán doble positivas (Lakshmanan & Batra., 2013).

Para realizar este protocolo se utilizó el kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences; 556547). Las hPASCs se sembraron en placas de pocillos hasta alcanzar confluencia de 60%, luego se realizaron los tratamientos de interés y se procedió a recuperar el sobrenadante y recuperar las células tripsinizando durante 5 minutos a 37 °C. Las células se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de Tyrode (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 mM;  $\text{NaHCO}_3$  12 mM) y se les añadió anexina V y IP según lo indicado por el fabricante. Se realizaron controles para la detección por citometría teniendo hPASCs sin sonda, sólo con IP y sólo con anexina V. Adicionalmente se realizó el control positivo de muerte celular incubando hPASCs a 60°C durante 10 minutos.

## 5.7 Especies reactivas de oxígeno mitocondriales

Para determinar la acumulación de ROS específica mitocondrial se empleó el reactivo MitoSOX (Thermo Life Sciences; M36008), que posee una ABS/EMI 510/580 nm. Esta molécula permite evaluar mtROS en células vivas mediante citometría de flujo, siendo su intensidad de fluorescencia directamente proporcional a la presencia de mtROS (Kauffman *et al.*, 2016).

Las hPASCs se sembraron en placas de pocillos hasta alcanzar una confluencia de 60%, luego se realizaron los tratamientos de interés y se procedió a recuperar el sobrenadante y recuperar las células tripsinizando durante 5 minutos a 37°C. Las células se resuspendieron en 250 µL de Tyrode 1 g/L glucosa (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 12 mM; d-glucosa 5,5 mM) y se les añadió MitoSOX red a una concentración final de 500 nM. Finalmente, las células incluidas con la sonda se analizaron por citometría de flujo.

## 5.8 Potencial mitocondrial determinada por safranina

El potencial eléctrico de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) es el principal componente de la fuerza protón motriz ( $\Delta p$ ) generada a través de la membrana mitocondrial interna durante el flujo de electrones a lo largo de la cadena respiratoria (Figueira *et al.*, 2012). La safranina es un colorante catiónico lipofílico que sufre cambios en la absorbancia dependiendo de su distribución entre la membrana mitocondrial interna y externa, focalizándose en los sitios de interacción aniónicos de la membrana mitocondrial interna (Figueira *et al.*, 2012). Esta interacción nos permite estimar el potencial mitocondrial. Las células hPASCs incubadas con safranina 2,2 µM se analizaron en el equipo OROBOROS INSTRUMENTS OXYGRAPH-2K serial G-0248.

## 5.9 Respirometría de alta resolución

El consumo de oxígeno y el potencial mitocondrial se determinaron utilizando el equipo OROBOROS INSTRUMENTS OXYGRAPH-2K serial G-0248 con un intervalo de adquisición de datos de 2 segundos, agitación constante a 150 g y 37°C. Las células tratadas

con el estrógeno o su metabolito 4-ME se cosecharon, lavaron en amortiguador Tyrode glucosa 1 g/L EGTA 0,5 mM 2 veces y resuspendieron en medio de respiración 5 (EGTA 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM; gluconato 60 mM; taurina 20 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; HEPES 20 mM; sacarosa 110 mM; BSA libre de ácidos grasos 1 g/L; pH 7,35). Antes de iniciar con la medición, a las células resuspendidas en amortiguador MiR05 (EGTA 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM; ácido lactobiónico 60 mM; taurina 20 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; HEPES 20 mM; D-sucrosa 110 mM) se les añadió succinato 10 mM y ADP 12,5 mM (estado 3 de respiración mitocondrial). Esta suspensión se inyectó en la cámara de respiración, se estabilizó la lectura luego de 15 minutos y se comenzó con el siguiente patrón: máxima actividad de OXPHOS: se añadió digitonina a una concentración final de 20 µM para permeabilizar las células; respiración independiente de OXPHOS: se añadió oligomicina A 40 µM; máxima actividad respiratoria: las mitocondrias se desacoplaron utilizando FCCP 150 µM; respiración extra mitocondrial: se utilizó antimicina 40 µM. Cada intervención fue medida durante 4 minutos.

### **5.10 Construcción de una red de regulación transcripcional en pacientes HPAi**

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de probables artículos de interés utilizando las siguientes palabras claves “idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension” “Transcriptomic” “Metabolomic” “Smooth muscle cells” “iPAH”, obteniéndose 34 trabajos ligados al tema. De estos trabajos destacaron tres artículos enfocados en el estudio del transcriptoma de la HPAi (Gorr *et al.*, 2020; Saygin *et al.*, 2020; Stearman *et al.*, 2019). Las bases de datos puestas a disposición por estos tres artículos fueron analizadas y filtradas críticamente según sexo y edad para poder generar una red consistente. Finalmente, ante la inconsistencia de los datos otorgados en dos de los trabajos (Gorr *et al.*, 2020; Saygin *et al.*, 2020) debido a que ambos sexos y las edades de los pacientes no están bien representados, lo que impide hacer una comparación objetiva, es que el trabajo elegido fue el de Stearman *et al.* (2019). Este set de datos está construido a partir de un microarray disponible online en la base de datos GEO GSE117261 (Stearman *et al.*, 2019). Esta publicación utiliza muestras obtenidas desde tejido pulmonar mixto y analiza la expresión utilizando la técnica de microarray. Luego, y con el propósito de eliminar sesgos en el estudio por sobre representación de mujeres y por dispersión de edad, esta base de datos fue filtrada emparejando los individuos control con HPAi en el estudio según sexo y edad (**Tabla 2**). Esta base de datos filtrada se analizó determinando el

Log2FC (Log 2 de las veces de cambio) combinado con un análisis modificado ANOVA de tasa de falso descubrimiento (FDR). Se consideraron valores  $p \leq 0,01$  como estadísticamente significativos para la construcción de la base de datos (HPAi vs control). Estos datos se integraron en la base de datos TRRUST v2 (Han *et al.*, 2018) con el fin de identificar interacciones de los genes diferencialmente expresados con su factor de transcripción asociado ya descrito, e indicando si posee actividad represora o estimuladora. La RRT fue curada manualmente para eliminar redundancias en la información y se visualizó en el software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). Considerando la complejidad de la red inicial obtenida y entendiendo la HPAi como una patología que afecta mayoritariamente a mujeres es que se dividió en interacciones comunes, exclusivas para mujeres y exclusivas para hombres.

Posteriormente, las RRT se fusionaron con la base de datos metabólica Recon3D (Brunk *et al.*, 2018). Esto nos permitió visualizar cómo esta RRT regula el metabolismo humano en el contexto de la HPAi, indicando grupos de reacciones metabólicas afectadas, sus sustratos y productos, así como también su compartimentalización celular.

Finalmente, las redes transcripcionales metabólicas fueron visualizadas en el software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) e ingresadas en la base de datos Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) para evaluar el fenotipo funcional de la red utilizando la base de datos KYOTO *encyclopedia of genes and genomes* (<https://www.genome.jp/kegg/>) y de asociaciones de enfermedad-gen extraídas desde literatura JENSENLAB (<https://diseases.jensenlab.org/>).

**Tabla 2. Lista de individuos filtrados y seleccionados para la consecución del análisis de red transcriptómica en HPAi (filtrado de Stearman *et al.*, 2019).**

Identificador	Condición	Sexo	Raza	Etnia	Edad (años)	Promedio edad
PHBI_001	IPAH	Mujeres	Blanca	No hispana	62	43,6 años
PHBI_029	IPAH	Mujeres	Blanca	No hispana	16	
PHBI_042	IPAH	Mujeres	Blanca	No hispana	44	
PHBI_044	IPAH	Mujeres	Blanca	No hispana	40	
PHBI_084	IPAH	Mujeres	Blanca	No hispana	56	
PHBI_026	Control	Mujeres	Blanca	No hispana	41	42,2 años
PHBI_028	Control	Mujeres	Blanca	No hispana	57	
PHBI_035	Control	Mujeres	Blanca	No hispana	64	
PHBI_068	Control	Mujeres	Blanca	No hispana	21	
PHBI_069	Control	Mujeres	Blanca	No hispana	28	
PHBI_003	IPAH	Hombres	Blanca	No hispana	64	41,2 años
PHBI_062	IPAH	Hombres	Blanca	No hispana	45	
PHBI_063	IPAH	Hombres	Blanca	No hispana	27	
PHBI_072	IPAH	Hombres	Blanca	No hispana	14	
PHBI_075	IPAH	Hombres	Blanca	No hispana	56	
PHBI_022	Control	Hombres	Blanca	No hispana	18	41 años
PHBI_031	Control	Hombres	Blanca	No hispana	45	
PHBI_053	Control	Hombres	Blanca	No hispana	25	
PHBI_059	Control	Hombres	Blanca	No hispana	55	
PHBI_083	Control	Hombres	Blanca	No hispana	62	

### **5.11 Análisis Estadísticos**

Previamente a la construcción y ejecución de los experimentos descritos con anterioridad se procedió a realizar el cálculo del tamaño muestral. Para este fin se consideró realizar la prueba de comparación estadística de promedios entre grupos independientes de una cola y de dos colas por separado. Para ambos parámetros se consideró un parámetro de tamaño de efecto 1,8 y un error probabilístico alfa de 0,05, un poder de 0,8 (1 - error probabilístico beta). Ambos análisis fueron ejecutados en el software G\*Power 3.1.9.7 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). El resultado reportado por el software indicó un tamaño muestral de 5 N por grupo experimental, siendo N el número de ensayos a realizar.

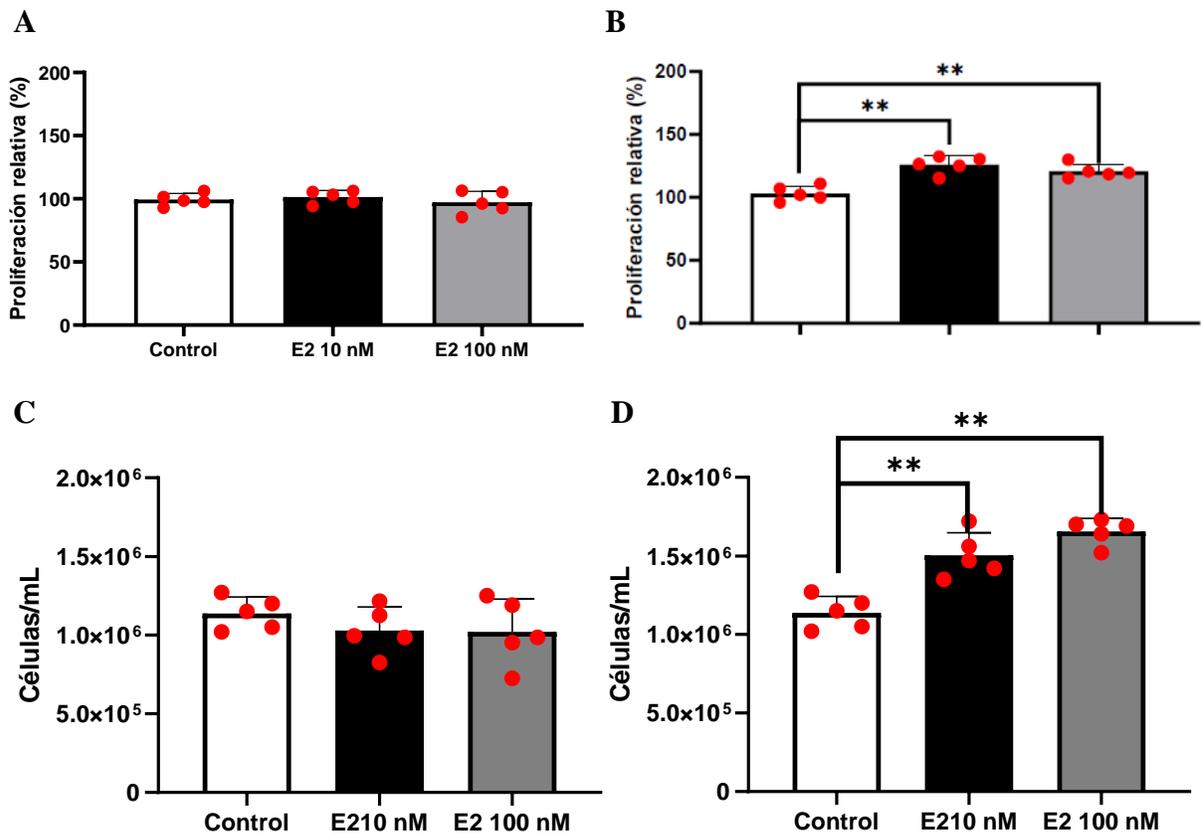
Se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 8.0.2. Los datos se expresaron como promedio  $\pm$  SEM. La prueba estadística empleada fue análisis de varianza no paramétrica con prueba Kruskal-Wallis de múltiples comparaciones. Los valores  $p < 0,05$  se consideraron como diferencias significativas. Los datos sobre los cuales no se realizó esta prueba se encuentran individualizados y explicados en su propia metodología.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluar el efecto del estrógeno y su metabolito 4-ME en la proliferación de hPASMCs.

De manera similar a lo reportado por Mair y colaboradores (Mair et al., 2015), E2 aumentó la proliferación de hPASMCs a 48 horas a concentraciones 10 y 100 nM determinado por MTS (**Figura 8B**), conteo celular por exclusión de azul tripán (**Figura 8D**) y análisis de ciclo celular (**Figura 9B**) por desplazamiento desde la fase S a fase G2/M, sin observar dicho efecto mediante ninguna de las técnicas empleadas a las 24 horas de tratamiento (**Figuras 8A, 8C y 8A**). Por otra parte, 4-ME aumentó la proliferación de hPASMCs a 48 horas a concentraciones 5 y 10 nM, determinado por MTS (**Figura 10B**), conteo celular por exclusión de azul tripán (**Figuras 10D**) y análisis de ciclo celular (**Figura 10B**) por desplazamiento desde la fase S a fase G2/M, sin observar dicho efecto mediante ninguna de las mediciones realizadas a las 24 horas (**Figuras 10A, 11C y 11A**).

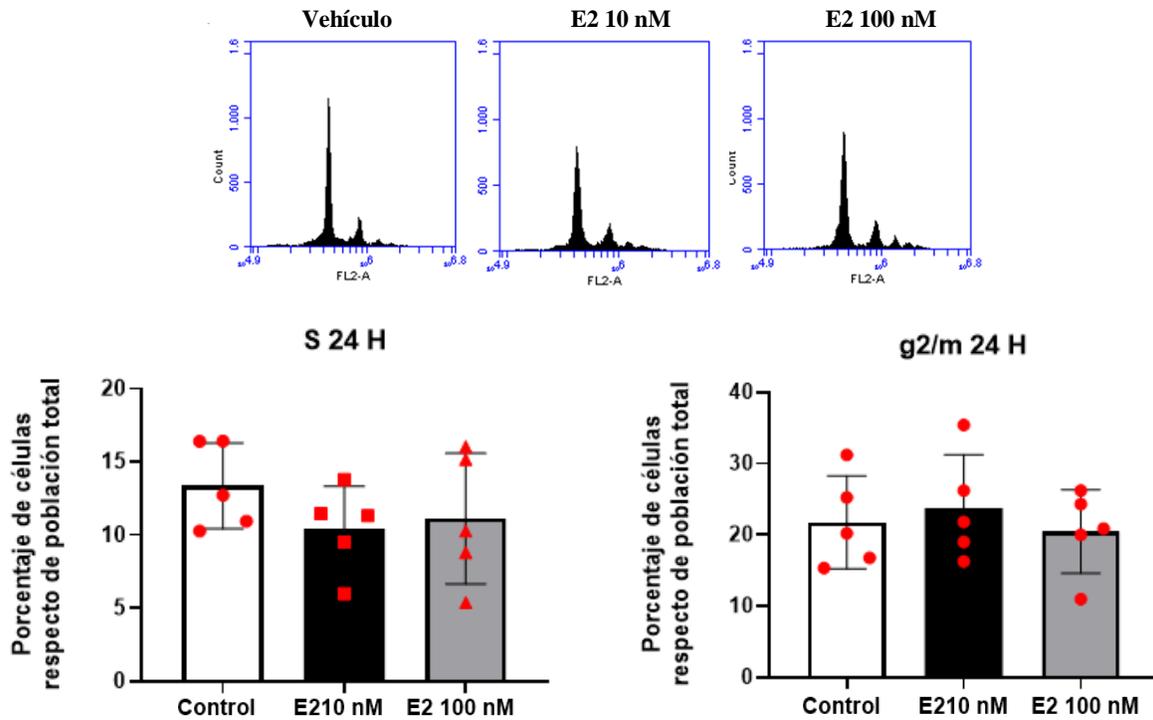
Posteriormente, y ante el hallazgo que frente a otros tratamientos que intentan simular un fenotipo patológico en hPASMCs inducen apoptosis en poblaciones celulares de musculatura lisa (Parra *et al.*, 2017), es que se procedió al análisis de muerte celular por citometría de flujo utilizando anexina V/IP. Tanto E2 (**Figura 12**) como 4-ME (**Figura 13**), no indujeron apoptosis temprana, tardía ni necrosis celular posterior al tratamiento durante 48 horas.



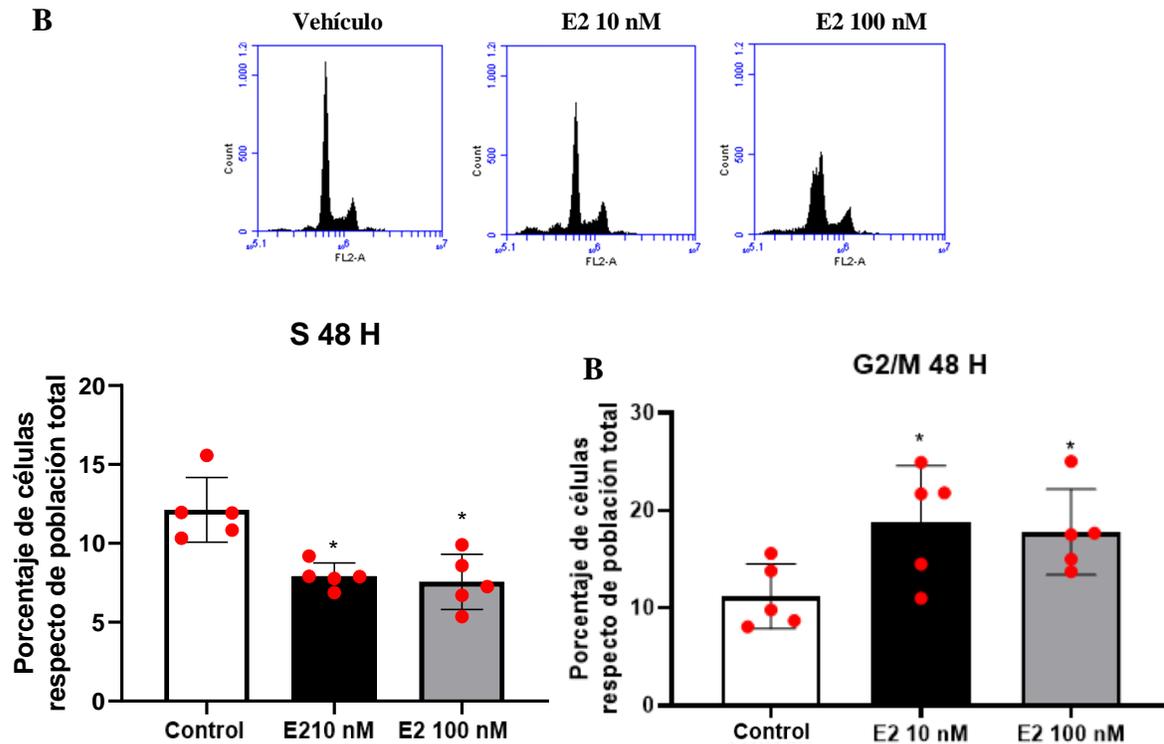
**Figura 8. Estradiol induce proliferaci3n en hPASMC.** Las hPASMC se trataron con E2 10 y 100 nM por 24 (A) y 48 (B) horas, y la proliferaci3n relativa se determin3 por MTS. El n3mero de c3lulas se determin3 usando conteo celular por exclusi3n de azul trip3n en hPASMC tratadas con E2 a 24 (C) y 48 (D) horas. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 5) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \*\*p  $\leq$  0,01.

Al determinar que efectivamente ambos estr3genos, E2 y 4-ME, aumentaron la proliferaci3n de hPASMCs, lo cual se relaciona con el fenotipo observado en la arteria pulmonar de pacientes HPAi, es que se procedi3 a analizar tambi3n el efecto de estas mol3culas sobre diferentes par3metros mitocondriales.

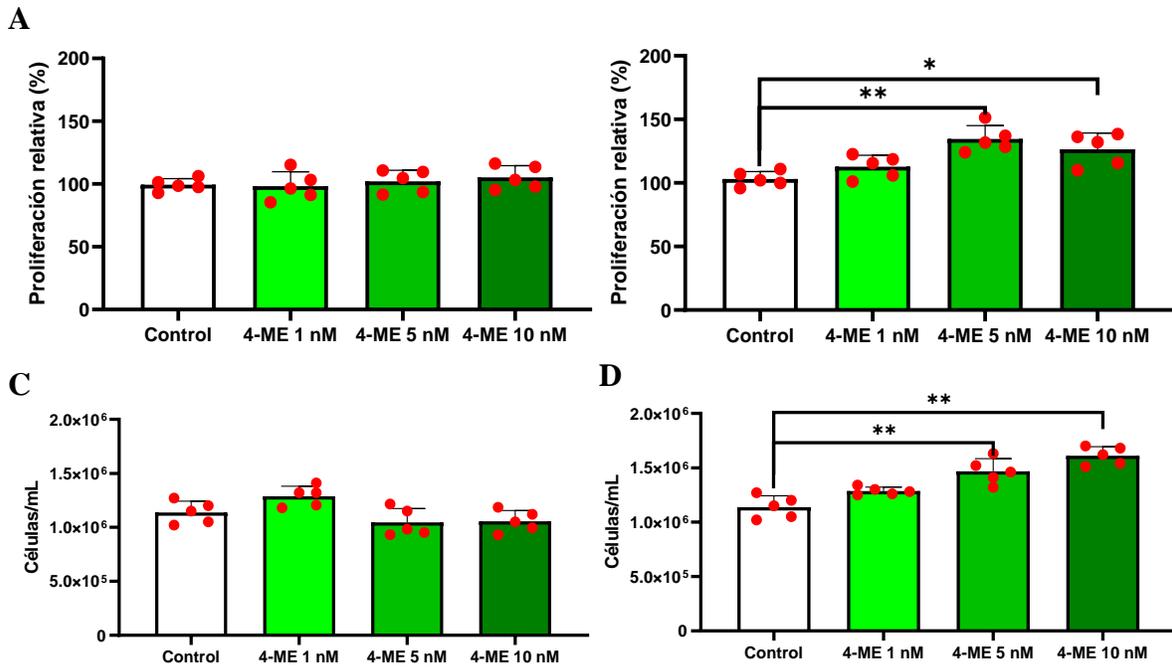
A



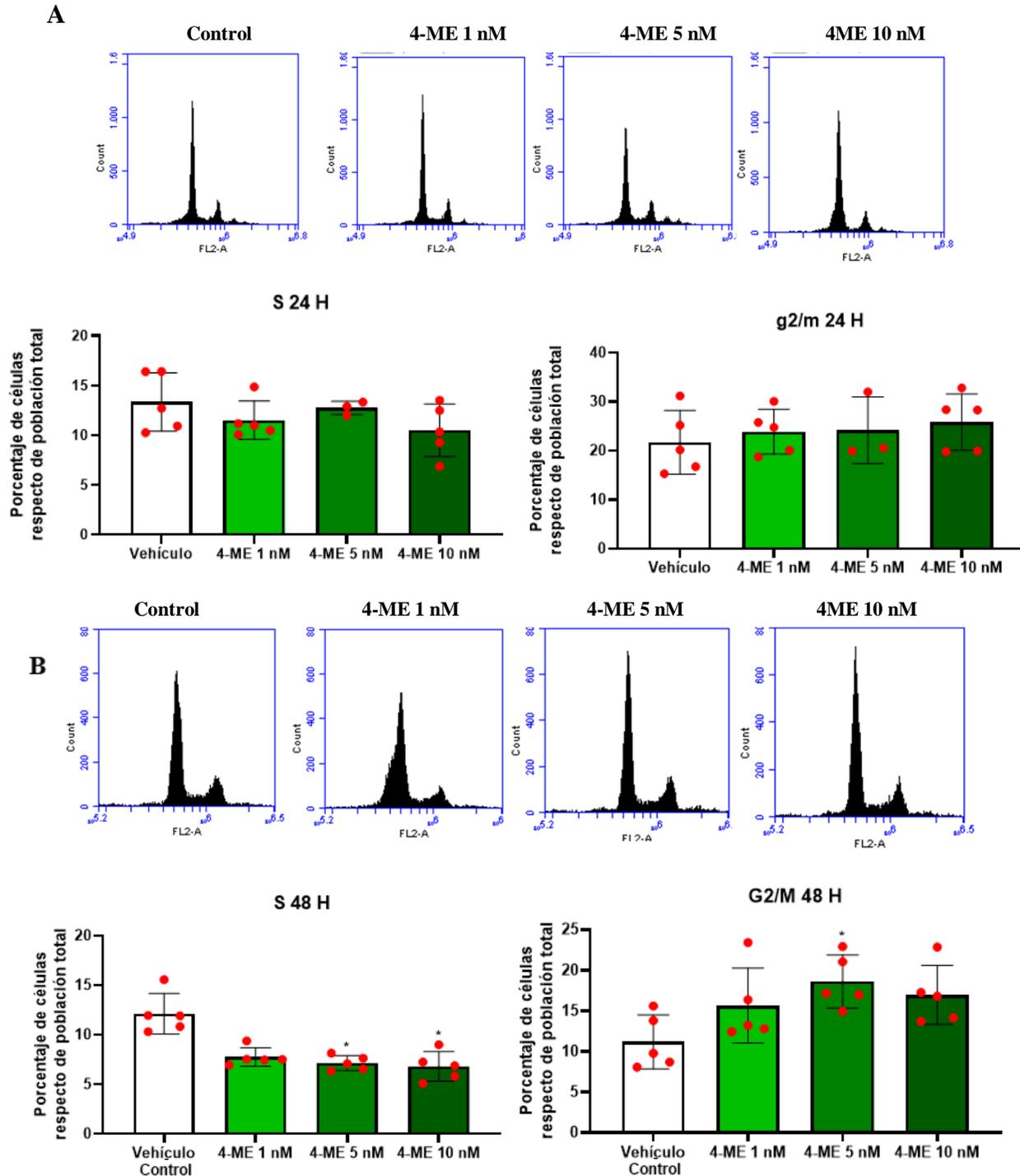
B



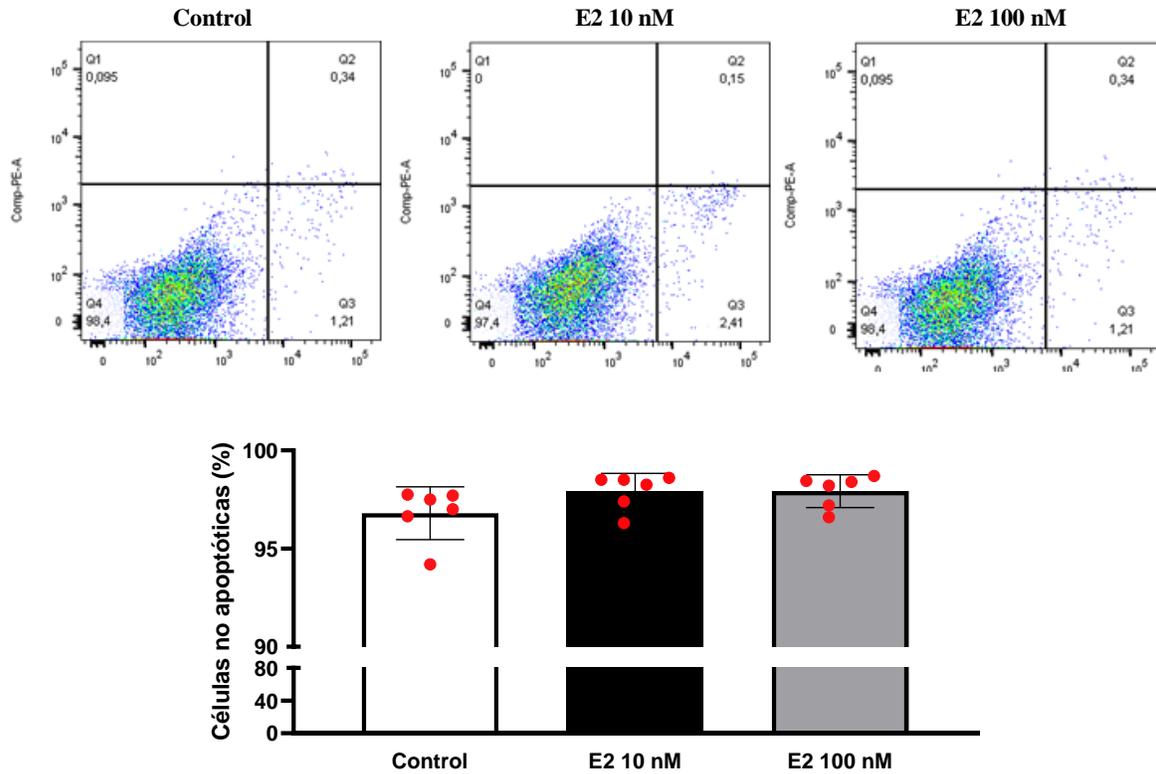
**Figura 9. Estradiol desplaza la población celular de hPASC desde la fase S a G2/M.** Las hPASC se trataron con control, E2 10 y 100 nM por 24 (A) y 48 (B) horas. Las fases del ciclo celular se determinaron utilizando yoduro de propidio seguido por citometría de flujo. Los paneles superiores son histogramas representativos. Los paneles inferiores corresponden a las cuantificaciones. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \* $p \leq 0,05$ .



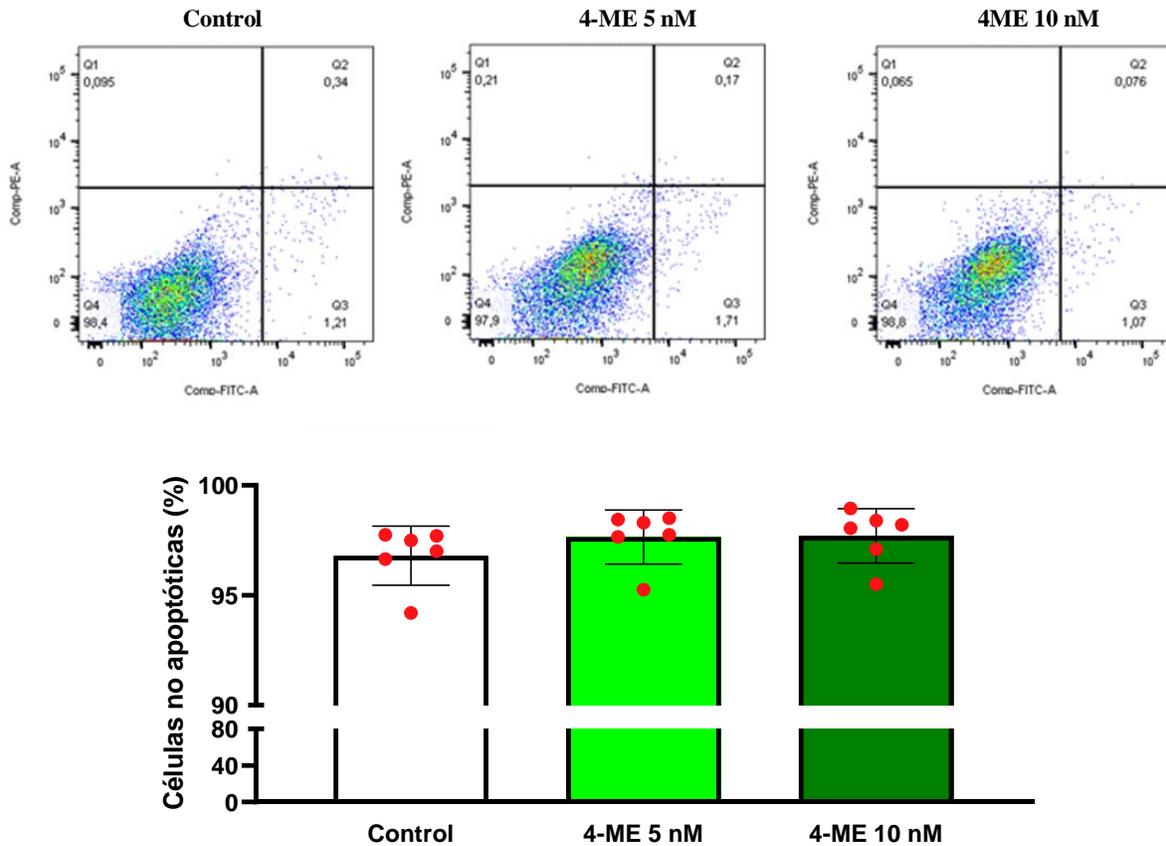
**Figura 10. 4-Metoxiestradiol induce proliferaci3n en hPASMC.** Las hPASMC se trataron con control, 4-ME 1, 5 y 10 nM por 24 (A y C) y 48 (B y D) horas. (A y B) La proliferaci3n relativa se determin3n usando MTS. (C y D) El n3mero de c3lulas se cuantific3n usando conteo celular por exclusi3n de azul trip3n. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 5) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01.



**Figura 11. 4-Metoxiestradiol desplaza la población celular de hPASC de la fase S a G2/M.** Las hPASC se trataron con control, 4-ME 1, 5 y 10 nM por 24 (A) y 48 (B) horas. Las fases del ciclo celular se determinaron utilizando yoduro de propidio seguido por citometría de flujo. Los paneles superiores son histogramas representativos. Los paneles inferiores corresponden a las cuantificaciones. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=5, excepto n=3 para 4-ME 5 nM) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \*p  $\leq$  0,05.



**Figura 12. Estradiol no induce muerte celular en hPASCs.** Las hPASC se trataron con control, E2 10 y 100 nM por 48 horas. La muerte celular por apoptosis se determinó usando anexinaV/ioduro de propidio seguido por citometría de flujo. Los paneles superiores son histogramas representativos. Los paneles inferiores corresponden a las cuantificaciones. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n=6$ ) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis.

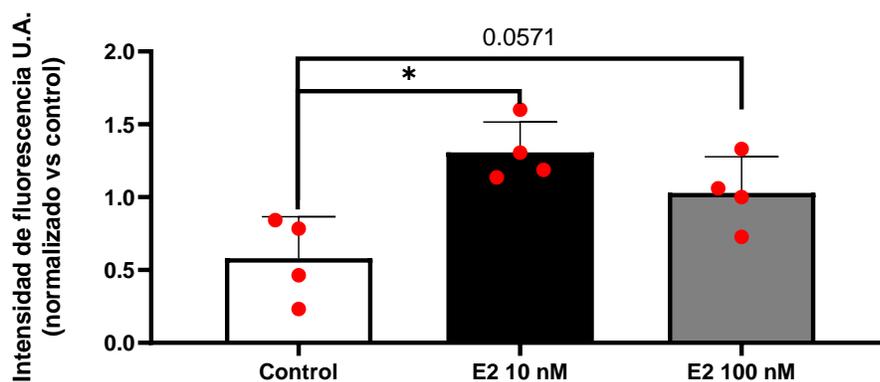


**Figura 13. 4-Metoxiestradiol no induce muerte celular en hPASCs.** Las hPASCs se trataron con control, 4-ME 5 y 10 nM por 48 horas. La muerte celular por apoptosis se determinó usando anexinaV/ioduro de propidio seguido por citometría de flujo. Los paneles superiores son histogramas representativos. Los paneles inferiores corresponden a las cuantificaciones. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 6) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis.

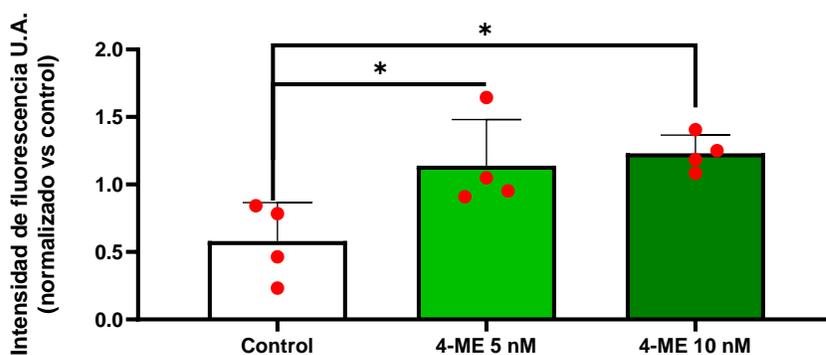
## 6.2 Determinar el efecto del estrógeno y su metabolito 4-metoxiestradiol en la función mitocondrial.

En la disfunción mitocondrial, entre los marcadores de daño podemos encontrar la acumulación de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS), depolarización o pérdida del potencial mitocondrial y cambios en la tasa de consumo de oxígeno celular (Diaz-Vegas *et al.*, 2020). Es en este sentido que nuestras próximas aproximaciones evaluaron estos parámetros en las hPASCs tratadas con E2 y 4-ME, esto con la finalidad de emular y evaluar el cambio metabólico observado en estas células durante la HPAi.

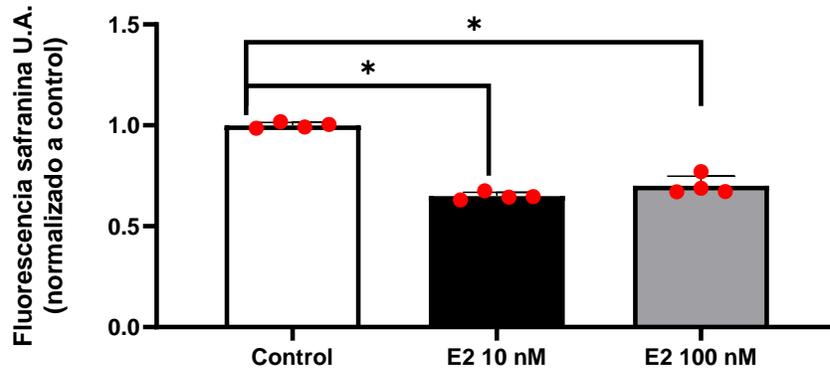
Tanto E2 (**Figura 14**), como 4-ME (**Figura 15**) aumentaron los niveles de ROSmt determinados por MitoSOX, 48 horas después del tratamiento. Así también, estos estrógenos depolarizaron la mitocondria, generando una pérdida del potencial mitocondrial determinado por safranina (**Figuras 16 y 17**), sugiriendo una disfunción mitocondrial inducida por estrógenos. Para evaluar esta última aseveración, se analizó la tasa de consumo de oxígeno en hPASCs tratadas durante 48 horas con E2 y 4-ME (**Figuras 18 y 19**).



**Figura 14. Estradiol aumenta mtROS en hPASC.** Las hPASC se trataron con control, E2 10 y 100 nM por 48 horas. Las mtROS se determinaron utilizando MitoSOX seguido por citometría de flujo. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 4) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \* $p \leq 0,05$ .

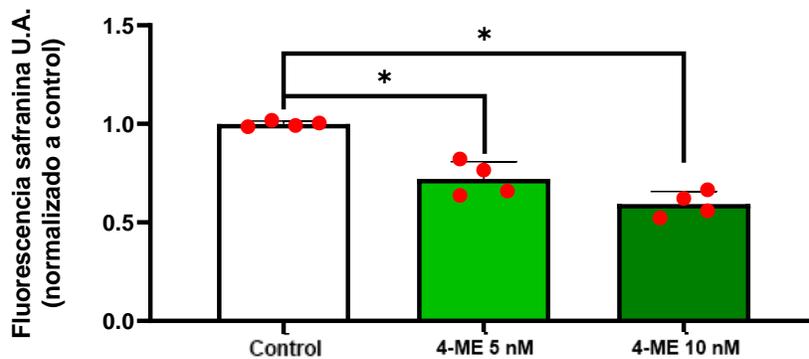


**Figura 15. 4-Metoxiestradiol aumenta mtROS en hPASC.** Las hPASC se trataron con control, 4ME 5 y 10 nM por 48 horas. Las mtROS se determinaron utilizando MitoSOX seguido por citometría de flujo. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 4) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \* $p \leq 0,05$ .



**Figura 16. Estradiol depolariza la mitocondria en hPASC.** Las hPASC se trataron con control, E2 10 y 100 nM por 48 horas. El potencial mitocondrial se determinó utilizando safranina y detección en el equipo OROBOROS. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 4) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \* $p \leq 0,05$ .

. \* $p \leq 0,05$ . N=4.



**Figura 17. 4-Metoxiestradiol depolariza la mitocondria en hPASC.** Las hPASC se trataron con control, 4ME 5 y 10 nM por 48 horas. El potencial mitocondrial se determinó utilizando safranina y detección en el equipo OROBOROS. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 4) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \* $p \leq 0,05$ .

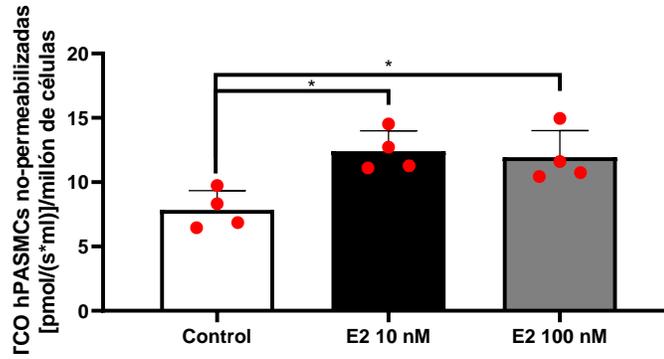
E2 aumentó el consumo de oxígeno basal en hPASC a 48 horas (**Figura 18A**), efecto que no se encontró en los tratamientos con 4-ME (**Figura 19A**). Posteriormente, y al modular farmacológicamente la actividad respiratoria mitocondrial encontramos que E2 aumentó la tasa de consumo de oxígeno (TCO) en estado 3, entendida como la máxima actividad respiratoria asociada a síntesis de ATP, para ambas concentraciones utilizadas (**Figuras 18B y 18C**). Así también a concentración 100 nM, E2 aumentó significativamente la TCO desacoplada (**Figura**

**18C**). No se observaron diferencias significativas al inhibir la actividad OXPHOS o la respiración extra mitocondrial.

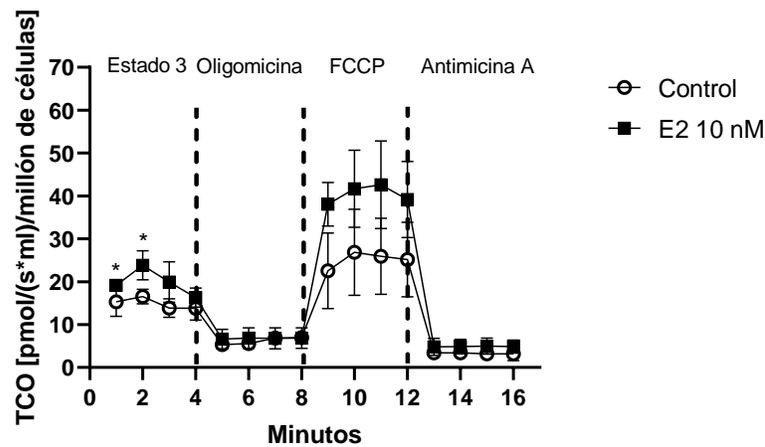
Por otra parte, 4-ME en su máxima concentración de trabajo (**Figuras 19C**) pareciera aumentar la TCO en estado 3, pero este efecto no se evidenció a lo largo del curso temporal intervenido, ya que solamente presentó diferencia significativa a los 3 minutos de medición.

Interesantemente, 4-ME en ambas concentraciones de trabajo mostró una actividad diferencial en comparación al E2 (**Figuras 19B y 19C**). Esto pues este metoxiestrógeno aumentó la TCO al inhibirse la OXPHOS, utilizando oligomicina, y al inhibirse el transporte de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones, utilizando antimicina A. Esto último sugiere un efecto de 4-ME sobre la respiración extra-mitocondrial, a diferencia de los resultados obtenidos con E2.

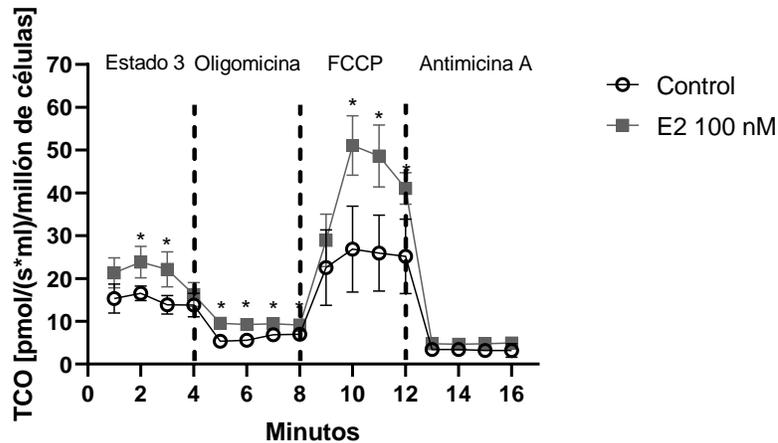
A



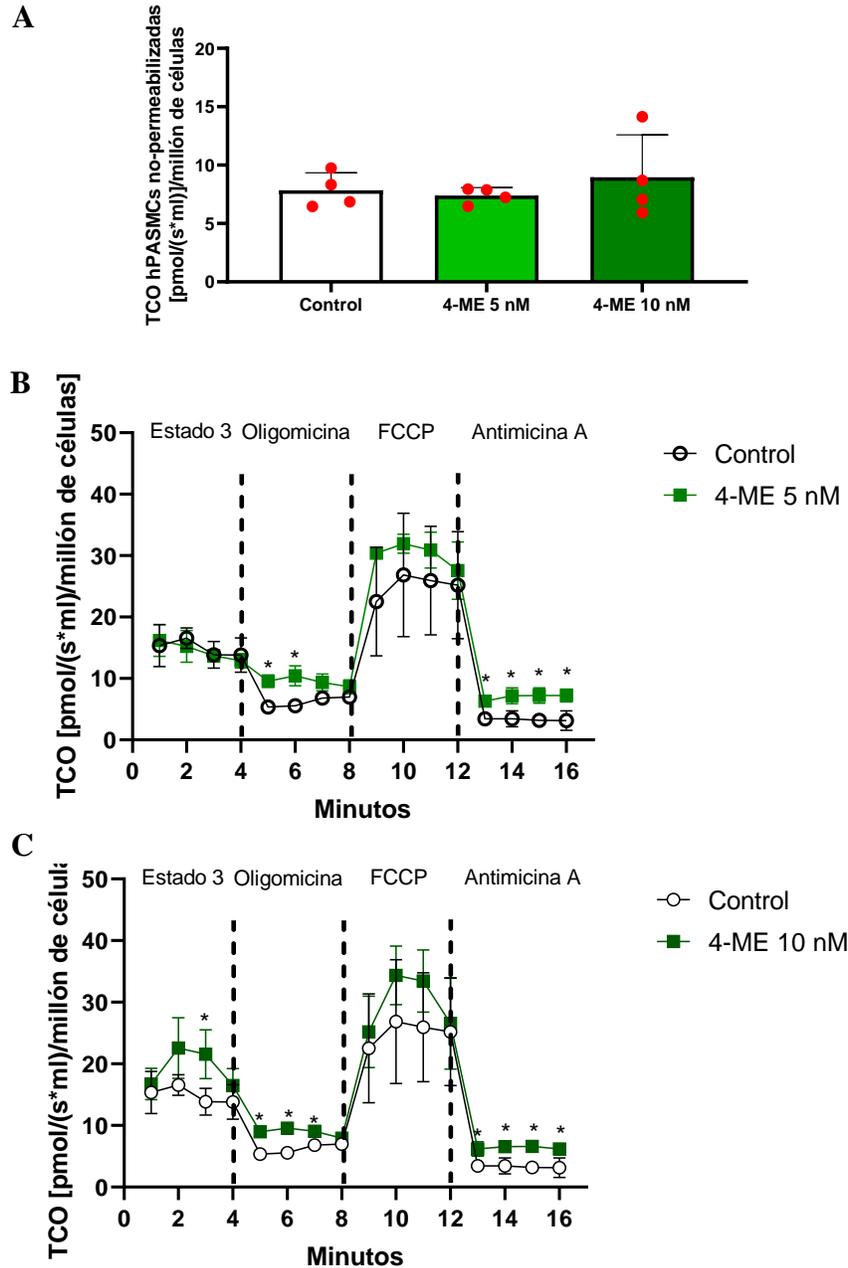
B



C



**Figura 18. Estradiol aumenta el consumo de oxígeno basal, en estado 3 y desacoplada en hPASC.** hPASCs fueron tratadas con control, E2 10 y 100 nM por 48 horas. (A) la respiración basal sin permeabilizar fue medida durante 4 minutos mediante respirometría de alta resolución ORBOROS. hPASCs fueron permeabilizadas con digitonina y durante intervalos de 4 minutos se midió la TCO en estado 3 (máxima TCO fisiológica); independiente de CV (oligomicina); asociado a desacople mitocondrial (FCCP) y extramitocondrial (Antimicina A) mediante respirometría de alta resolución ORBOROS. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 4) y se analizaron usando prueba estadística t de student minuto a minuto. \*p $\leq$ 0,05.

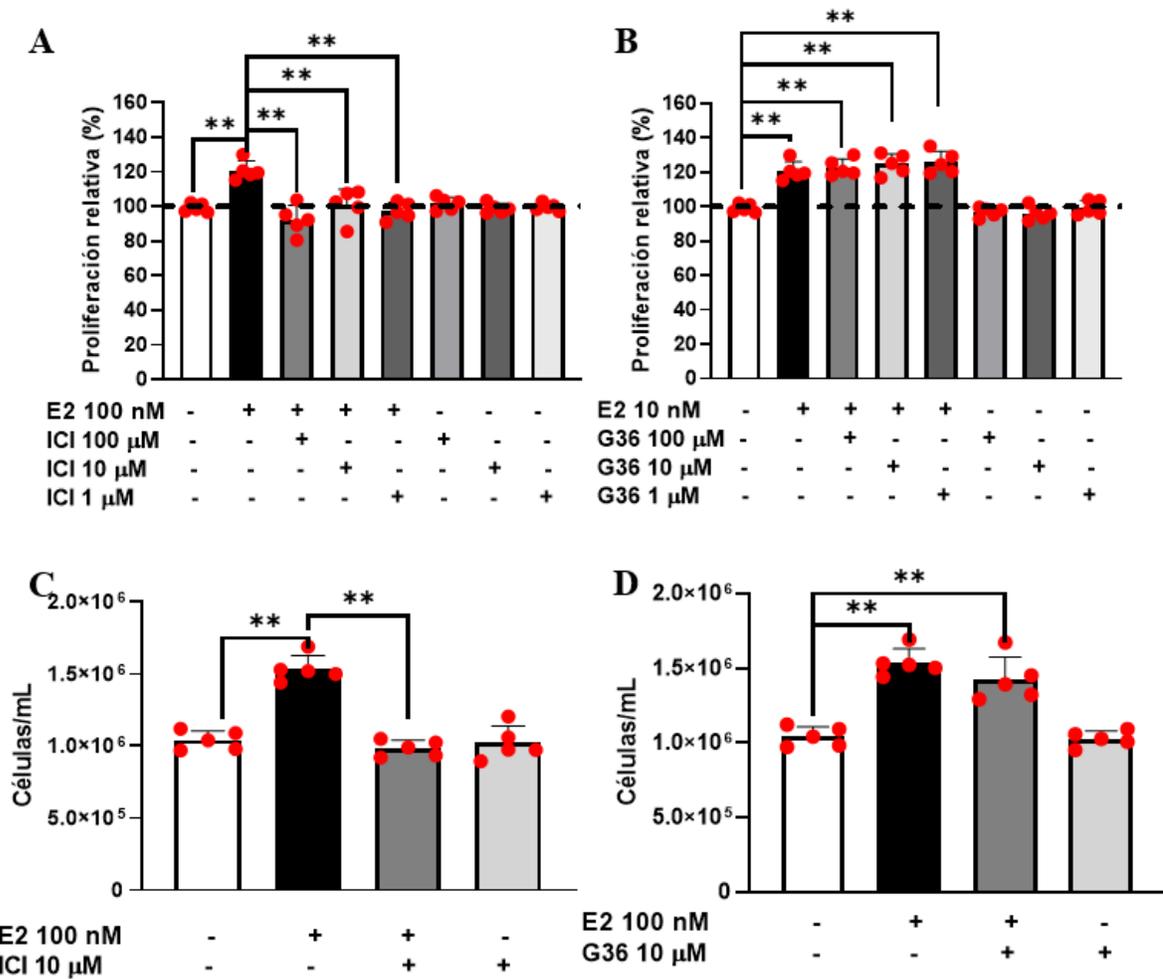


**Figura 19. 4-Metoxiestradiol aumenta la TCO independiente de CV y extramitocondrial en hPASC.** hPASCs fueron tratadas con control, E2 10 y 100 nM por 48 horas. (A) la respiración basal sin permeabilizar fue medida durante 4 minutos mediante respirometría de alta resolución ORBOROS. hPASCs fueron permeabilizadas con digitonina y durante intervalos de 4 minutos se midió la TCO en estado 3 (máxima TCO fisiológica); independiente de CV (oligomicina); asociado a desacople mitocondrial (FCCP) y extramitocondrial (Antimicina A) mediante respirometría de alta resolución ORBOROS. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 4) y se analizaron usando prueba estadística t de student minuto a minuto. \* $p \leq 0,05$ .

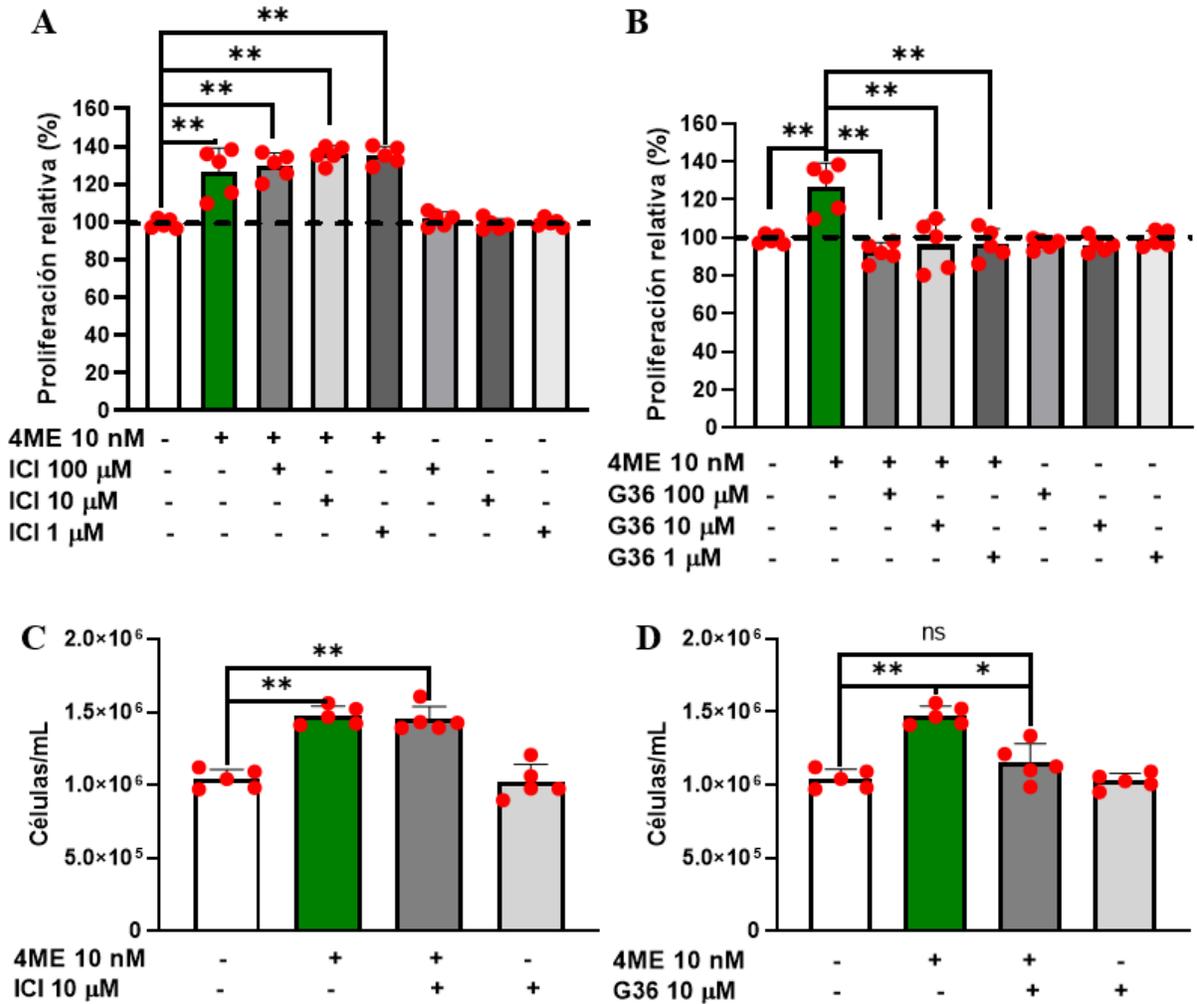
### **6.3 Evaluar la participación de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$ y GPER en los efectos sobre hPASCs inducido por estrógenos.**

Una vez identificado que E2 y 4-ME inducían un fenotipo proliferativo y que ambos estrógenos inducían cambio en la función mitocondrial, pero de características diferentes en hPASCs; es necesario dilucidar por cuál/es receptor/es se están ejerciendo dichos efectos. Para esto se utilizó el inhibidor de ER  $\alpha$  y  $\beta$  ICI182,780 y el inhibidor del receptor acoplado a proteína G para estrógenos (GPER), G36.

El pretratamiento con ICI 182,780 bloqueó el efecto proliferativo inducido por E2 determinado por MTS (**Figura 20A**) y conteo celular (**Figura 20C**), sin prevenir el efecto proliferativo de 4-ME (**Figuras 20B y 20D**) a 48 horas. Por otra parte, el pretratamiento con G36 previno el efecto proliferativo de 4-ME sobre hPASCs determinado por MTS (**Figura 21B**) y conteo celular (**Figura 21D**), más no el efecto de E2 (**Figuras 21A y 21C**). Este hallazgo nos sugiere que ambos estrógenos estarían actuando por vías farmacológicas distintas entre sí.



**Figura 20. La proliferación inducida por E2 en hPASC es dependiente de la vía genómica o clásica (Receptores de estrógeno  $\alpha$  y  $\beta$ ).** hPASC se pretrataron con ICI182780 (Fulvestrant) (A y C) o G36 (inhibidor del receptor de estrógenos acoplado a proteína G) (B y D) durante tres horas y posteriormente se trataron con E2 100 nM por 48 horas. (A y B) Proliferación relativa hPASC determinada por MTS. (C y D) Conteo celular hPASC determinada por exclusión de azul tripán. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 5) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .



**Figura 21.** La proliferación inducida por 4-ME en hPASC es dependiente de la vía no genómica o no clásica (Receptores de estrógeno acoplado a proteína G). hPASC se pretrataron con ICI182780 (Fulvestrant) (A y C) o G36 (inhibidor del receptor de estrógenos acoplado a proteína G) (B y D) durante 3 horas y posteriormente se trataron con 4-ME 10 nM por 48 horas. (A y B) Proliferación relativa hPASC se determinó por MTS. (C y D) Cuento celular hPASC determinado por exclusión de azul tripán. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n= 4) y se analizaron usando ANOVA seguido de Kruskal Wallis. \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; NS: no significativo

#### **6.4 Analizar redes de regulación transcripcional asociadas al metabolismo energético y hormonal que se encuentren controladas por nodos estrogénicos en bases de datos transcripcionales de tejido pulmonar provenientes de pacientes HPAi**

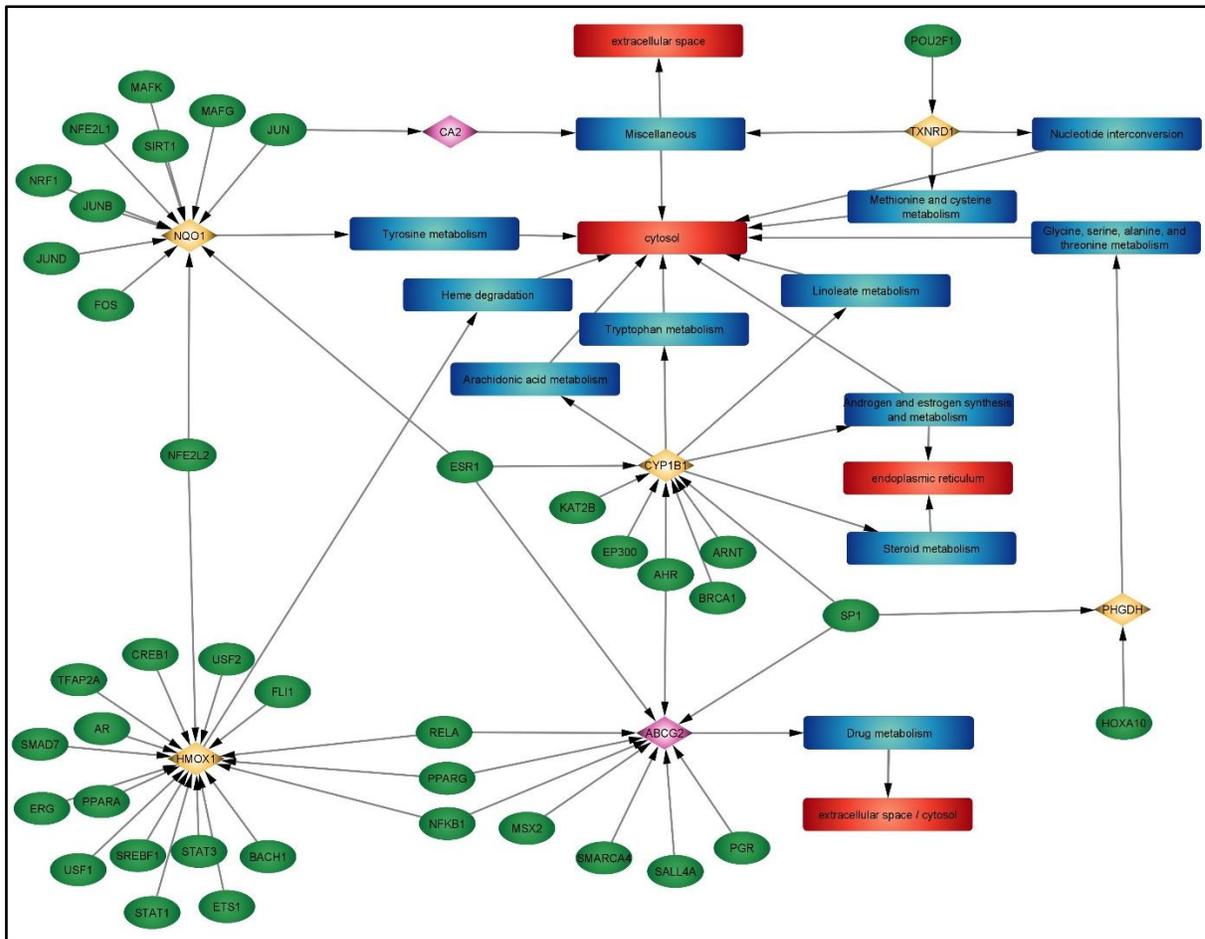
Los datos obtenidos mostraron un rol preponderante de la señalización estrogénica y del rol de los ERs sobre un fenotipo proliferativo y disfuncional mitocondrialmente. Esta información nos sugiere un rol único e inicial de los estrógenos en el desarrollo de la HPAi independiente de mutaciones hereditarias, producto de que hPASCs provienen de individuos sanos. Es por esto que surgió la necesidad de validar este control estrogénico mediante la construcción de una red regulatoria transcripcional (RTR) que adicionalmente integró parámetros metabólicos asociados a dicha patología.

Derivado de la construcción de la red regulatoria transcripcional (RTR) común en pacientes con HPAi obtuvimos 19 genes regulados al alza y 4 regulados a la baja (**Figura anexa 1**). En esta red destacan nodos de regulación sobre ABCG2 (baja), PHGDH, HMOX1, NQO1 y CYP1B1 (alza). Así también se obtuvieron redes regulatorias individualizadas según sexo. Para los hombres se obtuvo una RRT compleja en donde 25 genes están regulados a la baja y 23 están regulados al alza (**Figura anexa 2**). Entre los que podemos destacar surgen ACADL, SLC25A2F y FABP6 (regulados a la baja) como también ALPL, ANPEP y HK3 (regulados al alza). Adicionalmente, en la RRT exclusiva para mujeres se obtuvo una red más simplificada y en donde predomina la expresión a la baja de FOS en conjunto con CCL5 y la expresión al alza de CFTR en conjunto con TIMP1 (**Figura anexa 3**).

Los datos obtenidos desde estas redes y analizados en la base de datos Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) nos indican que, para la red común, principalmente vemos afectado al alza procesos involucrados a la fisiopatología del cáncer, artritis e hiperglicemia y que el factor transcripcional que controla preferentemente la red es ESR1 (**Figura anexa 4A**). En los nodos regulados a la baja, ESR1 continúa siendo el principal controlador de la RRT con un fenotipo similar a la anemia congénita diseritropoyética, talasemia y fibroadenoma mamario. Así también, los genes que se apagan en esta RRT común presentan una firma similar a un pulmón infectado con tuberculosis, a un vaso aterosclerótico y a la activación de vías inflamatorias asociadas a TNF alfa (**Figura anexa 4B**). En cuanto a los análisis realizados sobre los datos de RRT individualizados por sexo, se obtuvieron resultados similares a los reportados

en la red común, con la adición del cofactor transcripcional RELA como regulador para ambos sexos, pero con una regulación génica diferencial (**Figura anexa 5 y 6**).

Posteriormente, y comprendiendo que esta patología posee una base íntimamente metabólica, es que se procedió a analizar cómo es que RRT regula el metabolismo utilizando la base de datos RECON 3D (Brunk *et al.*, 2018). Los resultados nos muestran que en la red metabólica común existe una clara desregulación metabólica/energética asociada al alza de la expresión de CYP1B1 controlada por ESR1, KAT2B, EP300, AHR, BRCA1, ARNT y SP1. Este nodo estimula las rutas metabólicas del triptófano, ácido araquidónico, linoleato, esteroides y de la síntesis y metabolismo de andrógenos y estrógenos (**Figura 22**). Adicionalmente podemos destacar el rol de los factores transcripcionales AHR y ESR1. Por una parte, AHR se encuentra regulando a la baja la expresión de ABCG2 disminuyendo el metabolismo de drogas. Por otra parte, ESR1 también controla a la baja la expresión de ABCG2, teniendo el mismo efecto descrito para AHR, pero aumenta NQO1, estimulando el metabolismo de tirosinas. Esto nos demuestra el importante rol que tiene ESR1, gen que codifica para ER $\alpha$ , en el cambio fenotípico metabólico común para los pacientes HPai.



**Figura 22. Red regulación transcripcional metabólica común en pacientes HPai.** La red se compone de genes diferencialmente expresados comparando pacientes hombres y mujeres HPai vs control (n=10). La red se construyó filtrando la base de datos publicada por Stearman et al., 2019, emparejándola con la base de datos TRRUST v2 (Han H et al., 2018), posteriormente se integró con la base de datos Recon 3D (Brunk *et al.*, 2018) y se visualizó en el software Cytoscape (Shannon et al., 2003). Las elipses verdes representan factores transcripcionales; los rombos indican genes. En amarillo los genes regulados significativamente al alza y en rosa los genes regulados significativamente a la baja. Los rectángulos azules indican el subsistema de reacciones afectadas y los rectángulos rojos la ubicación celular del subsistema.

Para la red regulatoria exclusiva de hombres (**Figura anexa 7**), encontramos una red metabólica enfocada principalmente en la inactivación de reacciones mitocondriales asociadas a la beta oxidación mediada por la expresión a la baja de los genes ACADL, SLC25A2F y FABP6. Por otra parte, se activa un conjunto de genes asociados a la obtención de energía por rutas glicolíticas y compensatorias de actividad mitocondrial como lo son ANPEP y HK3.

En paralelo, es importante destacar que en la red metabólica regulatoria exclusiva para mujeres (**Figura anexa 8**) encontramos 4 nodos. Uno que afecta al alza la expresión de SLC1A3, aumentando el transporte extracelular; el segundo que regula a la baja ENPP2, disminuyendo el metabolismo de hidratos de carbono; el tercer nodo que regula ME1, aumentando el metabolismo de piruvato; y el último en donde CFTR ve regulado al alza su expresión controlado por 16 factores de transcripción y afectando al alza el transporte extracelular.

## 7. DISCUSIÓN

Para iniciar la discusión de los resultados obtenidos en la presente tesis, podemos destacar los siguientes como hallazgos principales:

- E2 y 4-ME aumentan la proliferación celular en hPASMCs.
- E2 y 4-ME depolarizan la mitocondria, disminuyendo su potencial y aumentando las mtROS.
- E2 y 4-ME aumentan la respiración celular, pero con una huella dactilar distinta.
- El fenotipo proliferativo en hPASMC inducido por E2 depende de la vía genómica/clásica.
- 4-ME induce un fenotipo proliferativo dependiente de la vía no genómica/no clásica.
- Las redes reguladoras transcripcionales metabólicas presentan un fenotipo principalmente “canceroso”, encontrándose controlado por el gen que codifica para ER $\alpha$  y teniendo como nodo central el alza en la expresión de *CYP1B1* con la consecuente alza en el metabolismo de estrógenos.

### 7.1 Los estrógenos E2 y 4-ME en la inducción de un fenotipo proliferativo en hPASMC

El modelo *in vitro* de hPASMCs nos mostró que el tratamiento con E2 10 nM y 100 nM aumentó la viabilidad relativa y el número de células al ser tratadas durante 48 horas (**Figuras 8B y 8D**), efecto no visto en tratamientos de 24 horas (**Figuras 8A y 8C**). Este hallazgo se encuentra respaldado por los resultados de Mair *et al.* (2015) quienes observaron que el tratamiento con E2 100 nM aumenta la proliferación de PASMC. Adicionalmente, el hallazgo de que, a menores concentraciones, incluso consideradas en el borde de lo fisiológico (E2 10 nM), se evidencie un aumento en la proliferación celular nos indica que el equilibrio estrogénico sobre la capa muscular de la arteria pulmonar debe ser considerado como un evento crítico, pues a esta concentración encontramos que aumentó el inmunomarcaje para Ki67 a 48 horas (**Figura anexa 9**). Ante cualquier duda que pueda quedar del efecto proliferativo, y por ende de la aparición de fenotipo hipertenso inducido por E2, se realizó análisis de ciclo celular. El ciclo celular se define como el proceso por el cual las células pasan por diversos puntos de control para evaluar su

estado general, esto con el fin de impedir la aparición de células enfermas o con distintas mutaciones al momento de dividirse, siendo la fase crucial el paso a G2/M, considerada la fase proliferativa del ciclo celular (Matthews *et al.*, 2022). Relacionado a esto, E2 10 nM y 100 nM generó un desplazamiento en el porcentaje de la población que se encuentra en fase S hacia la fase G2/M, respaldado en la disminución significativa de la población celular en S y el aumento significativo de la población celular en fase proliferativa (**Figura 9B**). El fenómeno descrito no se apreció a 24 horas (**Figura 9A**).

Por otra parte, hemos descrito por primera vez que 4-ME aumenta la proliferación celular relativa y el conteo celular 48 horas post tratamientos con concentraciones de 5 nM y 10 nM (**Figuras 10B y 10D**). Si bien estos resultados mostraron un efecto similar en la proliferación celular al presentado por E2 y concuerdan con lo propuesto, surge la duda de si efectivamente la concentración de trabajo para 4-ME fue la adecuada. En un trabajo previo, se describió que ante la imposibilidad de evaluar el porcentaje de E2 que se convierte a metoxiestrógenos (4-ME o 2-ME) localmente en un tejido, es que se estima que del total de E2 un 10% como máximo se convierte en cada uno de los metoxiestrógenos (Gujardo-Correa *et al.*, 2019). Esta información, en conjunto con los datos obtenidos desde la red transcripcional metabólica (**Tabla 3**), nos permite sugerir incluso que el metabolismo hormonal hacia metoxiestrógenos podría estar aumentado. Utilizando el mismo razonamiento aplicado para evaluar ciclo celular en células tratadas con E2, es que evaluamos este parámetro en tratamientos con 4-ME a 24 horas y 48 horas. Los resultados mostraron que existe un desplazamiento significativo desde la proporción de células en fase S hacia células en fase G2/M a 48 horas (**Figura 11B**). Para esto último, la proporción de células en la fase proliferativa del ciclo solo fue significativa para el tratamiento 4-ME 5 nM a 48 horas, presentando una tendencia al alza en concentración 10 nM. En los tratamientos a 24 horas no se observó ningún cambio significativo (**Figura 11A**).

En nuestro laboratorio, se desarrolló un modelo de hipoxia en hPASCs que muestra un fenotipo canceroso proliferativo, pero con una alta tasa de muerte celular (Parra *et al.*, 2017). Para descartar que en nuestro modelo la existencia de muerte celular, se realizó análisis de exclusión por azul tripán y de inducción de apoptosis por anexina V/IP. E2 (10 nM y 100 nM) y 4-ME (5 nM y 10 nM) no indujeron cambios en la viabilidad celular, ni tampoco inducción de apoptosis tardía o temprana (**Figuras 12 y 13**). Dichos hallazgos nos permiten sugerir que el

efecto de E2 podría no ser únicamente activando la proliferación, sino que podría otorgar resistencia a la muerte celular, lo que es característica fundamental del cambio fenotípico “tipo canceroso” descrito para HPA (Pullamsetti *et al.*, 2020).

### **7.2 E2 y 4-ME inducen disfunción mitocondrial con resultados divergentes sobre la tasa de consumo de oxígeno celular.**

Luego de confirmar que el tratamiento con estrógenos indujo un fenotipo proliferativo en hPASCs, sin afectar su viabilidad, es que se procedió a evaluar el potencial mitocondrial y la acumulación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mtROS).

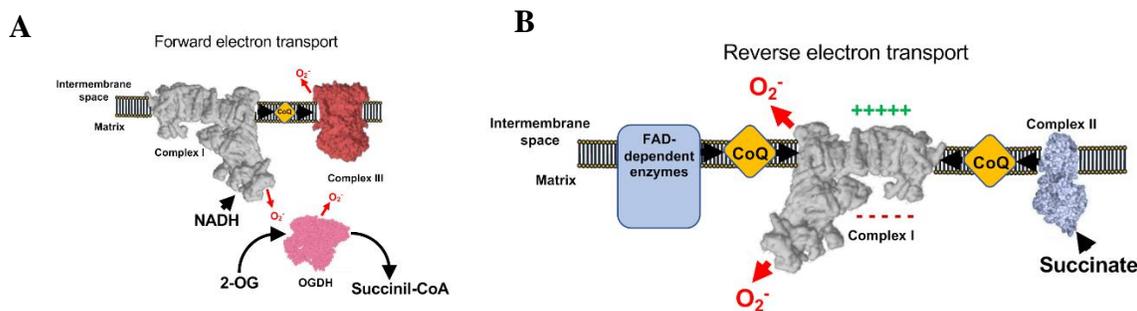
Las ROS son un conjunto de productos químicos originados por una o más reducciones del oxígeno. En condiciones fisiológicas normales, las ROS se encuentran en un estado de equilibrio homeostático que permite una apropiada función celular, activación de mecanismos antiinflamatorios mediados por la vía NRF2 y un sistema inmunológico responsivo. La mitocondria es la principal fuente de ROS celular, siendo los complejos del respirósoma mitocondrial los principales responsables de esto (Hernansanz-Agustín & Enríquez., 2021). Por lo anterior, es natural indicar que la función mitocondrial se encuentra íntimamente ligada a la presencia y señalización de ROS, dado que cualquier desbalance en las mtROS conlleva a disfunción en procesos de muerte celular, angiogénesis, expresión génica y proliferación celular (Zhang *et al.*, 2022; Zorov, Juhaszova & Sollot, 2014).

Entre los mecanismos por los cuales la mitocondria produce ROS, se pueden considerar tres puntos de vistas generales: inhibición farmacológica de la CTE; función normal de las enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico, pero con un aumento de actividad de la CTE y; la inducción patológica por inhibición del transporte de electrones (estados patológicos que inducen actividad reversa de la CTE) (Hernansanz-Agustín & Enríquez., 2021).

Bajo condiciones fisiológicas, la respiración celular mitocondrial se induce por actividad de las enzimas 2-oxoglutarato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa; inducida por sus sustratos que mantienen el  $\Delta\psi$  m producto de la actividad del complejo V. Estas enzimas reducen el  $\text{NAD}^+$  a NADH, generando sustrato para el complejo I, permitiendo

el flujo de electrones a lo largo de la CTE con la consecuente producción de mtROS (Murphy, 2009; Quinlan *et al.*, 2013).

La ubiquinona, también conocida como coenzima Q10 (CoQ), está ubicada en la matriz mitocondrial interna y es sustrato de enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, dihidroorotato deshidrogenasa y de la flavoproteína que transfiere electrones. Esta actividad asociada al complejo II (succinato deshidrogenasa) mantiene el  $\Delta\Psi_m$ , pero en condiciones de inhibición del complejo V o hiperpolarización, induciendo el denominado transporte de electrones reverso, lo que conlleva a que los electrones fluyan de regreso al CI, reduciendo  $\text{NAD}^+$  a NADH, produciendo elevados niveles de superóxido (**Figura 23**) (Robb *et al.*, 2018; Hernansanz-Agustín & Enríquez, 2021).



**Figura 23. Producción de mtROS asociado al complejo respiratorio I (CI).** (A) En condiciones fisiológicas se producen cantidades mínimas de mtROS asociado a la oxidación de NADH, como así también de CoQ y 2-oxoglutarato. (B) Bajo condiciones de transición desde un  $\Delta\Psi_m$  normal hacia uno alto combinado con la acumulación de CoQ reducida (o succinato) el CI funciona de manera reversa, promoviendo elevados niveles de mtROS. Así también, las enzimas dependientes de FAD, como la succinato deshidrogenasa, contribuyen a la mantención del transporte reverso de electrones (Tomado desde Hernansanz-Agustín & Enríquez., 2021).

E2 y 4-ME aumentaron las mtROS en tratamientos a 48 horas en hPASCs (**Figuras 17 y 18**). Entre las marcas de aparición de un fenotipo patológico en HP se encuentra la familia de enzimas NADPH oxidasas (NOX), que son las principales responsables de generar ROS extramitocondriales, y se encuentran sobreexpresadas en la patología (Adesina *et al.*, 2017; Ghoulé *et al.*, 2019). Por la naturaleza de la sonda utilizada, MitoSOX, esta fuente se descarta, ya que detecta específicamente la producción de mtROS por su localización mitocondrial.

Continuando en el contexto de HP, se ha demostrado que existe una respuesta vasoconstrictora de vasos pequeños pulmonares que conlleva a una perfusión disminuída de los alvéolos, con la consecuente hipoxia (Dunham-Snary *et al.*, 2017). Si bien, esta condición no es directamente hipertensión pulmonar, nos puede entregar herramientas que nos acerquen a mecanismos de producción mtROS. En esta patología existe la denominada “hipótesis del ROS”, que señala a la hipoxia como el principal mediador del alza de ROS por causa del transporte reverso de electrones y sobrecarga de calcio en PASMCM (Waypa *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo mitocondrial ha demostrado tener una actividad primordial en la remodelación vascular pulmonar en la HPA inducida por hipoxia (Siques *et al.*, 2021). El ya mencionado estrés oxidativo en PASMCMs, se encuentra asociado a la producción de elevados niveles de ROS, conllevando a daño celular y respuestas inflamatorias exacerbadas (Culley & Chan, 2018). Esta acumulación de mtROS sería consistente con la información reportada en modelo hipóxico, en donde la actividad del CI lleva a la resistencia a la apoptosis, gatillando el daño en la OXPHOS, donde la glicólisis aumentada sería la responsable (Ma *et al.*, 2022). Esta acumulación de mtROS desencadena la disfunción de la mitocondria, despolarizándola, contribuyendo así a una disminución en la masa mitocondrial y una menor generación de ATP, forzando un estado glicolítico o, en este caso, el “efecto Warburg” (Leopold & Maron, 2016; Ryan *et al.*, 2015). Lo descrito anteriormente resume uno de los eventos característicos del fenotipo “tipo canceroso” observado en HPA.

Complementariamente, otro parámetro relevante para evaluar el estado fisiológico/fisiopatológico de la mitocondria es el  $\Delta\Psi_m$ , que en condiciones patológicas puede despolarizarse o hiperpolarizarse (Yu y Chan, 2018). En el presente caso, la disminución observada en la señal de safranina inducida por E2 y 4-ME (**Figuras 16 y 17**) es indicador de una despolarización mitocondrial (Figueira *et al.*, 2012) que está íntimamente ligada a una disfunción mitocondrial tipo patológica en HPA, la cual suele acompañarse con acumulación de mtROS, como se detalló previamente (Liang *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2015; Suliman y Nozik-Grayck, 2019).

La caída del potencial mitocondrial suele estar asociada a una pérdida de la integridad mitocondrial y por ende a una reducida capacidad respiratoria, entendiéndose esta última, como

la capacidad de producir ATP en un ambiente aeróbico (Ryan *et al.*, 2015; Suliman y Nozik-Grayck, 2019).

En cuanto a lo reportado en la literatura respecto al rol de los estrógenos sobre el  $\Delta\Psi_m$ , podemos destacar la dicotomía que presenta el efecto protector del estradiol sobre modelos patológicos neurológicos (Simpkins *et al.*, 2008), musculares (Ronda, Vasconsuelo & Boland., 2013) y cardiovasculares (Guajardo-Correa *et al.*, 2022); en contraste con lo encontrado en la presente tesis doctoral (**Figuras 14 y 16**). Relacionado a la protección de estrógenos en la función mitocondrial, se ha descrito al ER $\beta$  como un factor de vulnerabilidad en modelos neuronales, ya que este receptor se encuentra en la mitocondria y su delección induce disfunción mitocondrial (Yang *et al.*, 2009); como también su activación farmacológica, permite optimizar tratamientos antineoplásicos en células de cáncer mamario (Karakas *et al.*, 2021). Es de destacar, que, en el campo de las neurociencias, en donde se ha descrito la mayoría de los efectos protectores del E2, también se han encontrado hallazgos que relacionan la estrogenización crónica en roedores con una desmielinización y degeneración de las dendritas en el hipotálamo (Naftolin *et al.*, 1988). Esta información nos sugiere que existe disfunción celular asociada a la exposición crónica y/o a concentraciones suprafisiológicas de E2 que aún no se ha descrito de manera apropiada. Esta idea también se respalda por el destacable comportamiento diferencial de VSMCs, en comparación con PSMCs frente a un mismo estímulo; ya que E2 ejerce protección en VSMCs mediante regulación a nivel de miARNs y regulación al alza de estriatina (Zheng *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2013), pero induce fenotipo proliferativo asociado a disfunción metabólica en PSMCs (Mair *et al.*, 2014).

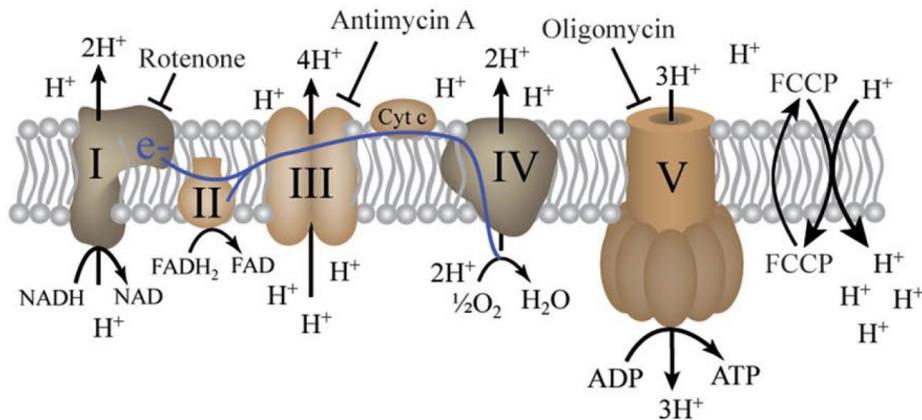
Como se describió en la introducción, HPA es la manifestación de la reprogramación fenotípica “cancerosa” de PSMCs. Entre los efectos de los estrógenos en cáncer, se ha demostrado que estos inducen una conformación anormal de las crestas mitocondriales, gatillando una disminución en la producción de ATP mitocondrial, aumentando la glicólisis para la obtención de energía y una regulación al alza de los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Felly & Roy, 2005). Así también, los estrógenos inducen producción de ROS mediante inhibición directa de la CTE, sobrecarga de calcio mitocondrial e inhibición de la respuesta antioxidante celular (Felly & Roy, 2005); generando el mencionado cambio proliferativo y daño celular (Castro-Rivera & Safe, 2001). Una de las estrategias por las cuales los estrógenos inducen un aumento de mtROS es la

inhibición de la función mitocondrial mediante inactivación de NRF1, inhibiendo la CTE y favoreciendo glicólisis (Cuezva *et al.*, 2002). Toda esta información está vinculada principalmente a los efectos de E2, ya que el 4-ME no presenta reportes sobre sus efectos mitocondriales hasta la fecha.

Con todos estos antecedentes, más los hallazgos descritos tanto para  $\Delta\Psi_m$  y mtROS, en esta tesis, podemos proponer que los cambios observados en hPASCs tratadas con estrógenos manifestarían una reprogramación “cancerosa” inicial enfocada en la mitocondria, la cual es mediada por estrógenos.

Por otro lado, la función mitocondrial está también íntimamente ligada a la respiración mitocondrial, la que determina la actividad de CTE y OXPHOS. Nuestros datos de respirometría, nos indican que E2 aumentó significativamente el consumo de oxígeno basal en células no permeabilizadas (**Figura 18A**), la TCO en la máxima actividad respiratoria (estado 3) y la TCO desacoplada (**Figura 18B y 21C**). Considerando que la inhibición del transporte de electrones en la CTE y de la actividad ATPasa (CV) no induce diferencias significativas en la TCO, es que estos cambios pueden ser atribuibles a un aumento en la síntesis y/o función de los complejos de la CTE inducida por estrógenos (Guajardo-Correa *et al.*, 2022). Esto último se demostró con la dependencia de la actividad según la modulación farmacológica mitocondrial (**Figura 23**), ya que la actividad diferencialmente regulada por E2 en hPASCs es indicativa de una mayor actividad o masa del respirosoma mitocondrial. Esto último, debido a la mayor TCO en presencia de sustratos del CAT y, mayor TCO al inhibir la síntesis de ATP; todo lo cual sugiere una condición de fuga de protones basal inducida por estrógenos. En referencia a esto último, en modelo de cáncer de mama, se ha reportado que E2 por medio de un mecanismo dependiente de ERs, induce un mayor estrés oxidativo disminuyendo las proteínas desacoplantes mitocondriales (Sastre-Serra *et al.*, 2010) y que además aumenta la TCO basal (Klinge, 2020).

Adicionalmente, la TCO extra-mitocondrial e independiente de CV en los tratamientos con 4-ME, aumentó (**Figuras 19B y 19C**). Por otro lado, la respiración basal de hPASCs, (**Figura 19A**) y la TCO asociada al estado 3 y respiración desacoplada tratadas con 4-ME no presentaron diferencias significativas consistentes (**Figuras 19B y 19C**).



**Figura 24. Modulación farmacológica de la CTE y OXPHOS.** (A) Representación simplificado de la CTE ubicada dentro de la membrana mitocondrial interna. La transferencia de electrones está acoplada a la transferencia de protones ( $H^+$ ) a través de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente de protones. Este gradiente es utilizado por el complejo V para la síntesis de ATP. Los protones reaccionan con el oxígeno para generar agua. Se indican los objetivos de los inhibidores (oligomicina, antimicina A y rotenona) y protonóforo desacoplante (FCCP) (Editado de Underwood *et al.*, 2020).

De lo discutido anteriormente, 4-ME no estaría induciendo cambios en la respiración mitocondrial, tal como lo hace el E2, proponiendo mecanismos de acción diferenciales. Considerando que los resultados de 4-ME sobre la TCO en hPASCs sugieren un impacto de este metabolito en la respiración extramitocondrial y, que no existen reportes de 4-ME modulando la actividad de enzimas consumidoras de oxígeno, tanto mitocondriales como extramitocondriales; es que discutiremos el tópico ya previamente mencionado en la sección dedicada a mtROS.

Una de las marcas más relevantes en la aparición del fenotipo patológico es la sobreexpresión de enzimas NOX, principal fuente de ROS extramitocondrial asociado a NOX (Adesina *et al.*, 2017; Ghoulé *et al.*, 2019). Las NOX comprometen una familia de 7 enzimas oxidoreductasas de transmembrana dependientes de NADPH. Su activación resulta en el transporte de electrones desde NADPH a través de los dominios contenedores de FAD hacia la fracción hemo para su inserción al oxígeno. Esta actividad conlleva al transporte de  $O_2^-$  al lado opuesto de la membrana biológica, que puede ser tanto el lado extracelular o intraorganelar (Bedard & Krause, 2007)

En diferentes modelos y presentaciones de HPA, se ha reportado que el disminuir o silenciar la actividad/expresión de las enzimas NOX, se previene o atenúa el fenotipo patológico en la arteria pulmonar y los pulmones, principalmente disminuyendo la proliferación de la musculatura lisa e induciendo apoptosis (Fulton *et al.*, 2017). Específicamente, en HPAi, NOX4 está regulada al alza y la disminución de su activación modulando la vía mTORC2, atenúa el remodelado de la musculatura lisa de la arteria pulmonar (Goncharov *et al.*, 2014; Mittal *et al.*, 2007).

NOX4 se encuentra regulada de manera distinta en comparación a otros miembros de su familia. Esta no requiere la presencia de un organizador citosólico o de una subunidad activadora. NOX4 transfiere electrones de manera constitutiva a NADPH, puede convertir rápidamente  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  y posee un importante rol en la regulación de la sintasa endotelial de óxido nítrico y los niveles de especies reactivas de nitrógeno (Fulton *et al.*, 2017). De lo indicado, NOX4 es una enzima altamente sensible a la concentración de oxígeno tisular debido a una alta  $K_m$  por su sustrato (Nisimoto *et al.*, 2014).

Esta evidencia expuesta, nos propone la necesidad de dilucidar la manera por la cual 4-ME esté regulando la expresión o actividad de enzimas extra mitocondriales que consumen oxígeno y si esta firma moduladora está ligada a la aparición de parámetros fenotípicos patológicos en PSMC.

### **7.3 E2 y 4-ME inducen un fenotipo “canceroso” mediante vías estrogénicas distintas.**

Finalmente, la inhibición de ER $\alpha$  y ER $\beta$  previno el efecto proliferativo de E2 100 nM sobre hPASCs a 48 horas (**Figuras 20A y 20C**), mientras que la inhibición de GPER mediante el uso de G36 no previno dicho efecto (**Figuras 20B y 20D**). Este hallazgo se correlaciona con la prueba clínica que muestra el efecto beneficioso del uso del ICI 182,780 (fulvestrant) en pacientes HPA (Kawut *et al.*, 2019) y en otras patologías, como el cáncer (Boér, 2017; Prins *et al.*, 2019). Este hallazgo nos sugiere que E2 en hPASCs estaría utilizando la vía clásica/genómica para la reprogramación fenotípica “cancerosa”. El pretratamiento con este modulador farmacológico inhibe la dimerización de ERs, manteniendo inactivos los cofactores con función activante AF1 y AF2, disminuyendo la translocación de ERs al núcleo y acelerando su degradación por el proteosoma (Carlson, 2005).

Por otra parte, el efecto de 4-ME sobre la proliferación no fue mediado por ER $\alpha$  y ER $\beta$  (**Figuras 21A y 21C**), pero la inhibición de GPER utilizando G36 si lo previno (**Figuras 21B y 21D**). Este resultado nos resulta conflictivo, pues existen dos reportes del rol de GPER en modelos de HP. Alencar *et al.* demostraron que en modelos de ratas tratadas con monocrotalina, la activación de GPER utilizando G1 disminuye la HP (Alencar *et al.*, 2017). En contraste, Ahmadian *et al.* demostraron en ratas hembra con HP inducida por hipoxia crónica, que la inhibición de GPER utilizando G36 atenúa la aparición de un fenotipo hipertenso (Ahmadian *et al.*, 2020). Considerando que los hallazgos reportados y referenciados son obtenidos desde especies distintas, es importante destacar que, si bien los modelos de HP en roedores son un buen acercamiento a lo que se encuentra en un paciente HPA, tienen manifestaciones fisiológicas y mecanismos que difieren (Colvin y Yeager, 2014). Para complementar, se ha reportado que GPER media tanto efectos proliferativos en células de mamas normales y cancerosas (Scaling *et al.*, 2014); que su activación prolongada por señalización estrogénica crónica tendría un rol en la neoplasia (Prossnitz & Barton, 2011) y aparición del síndrome metabólico (Sharma & Prossnitz, 2017); que su activación mediante agonistas sintéticos puede ser un efectivo tratamiento para la obesidad y la diabetes (Sharma *et al.*, 2020); y que además también media la protección en modelos de enfermedades cardiovasculares (Fu *et al.*, 2021). Todo lo anterior, nos indica una alta variabilidad del rol de GPER dependiendo del tejido, del ligando y su concentración, así como también del tiempo de exposición al mismo. Adicionalmente, al comparar las diferencias entre modelos *in vivo* e *in vitro*, es necesario continuar con la investigación asociada a la aparición de un fenotipo hipertenso mediado por 4-ME a través de GPER.

#### **7.4 RRT y metabólicas reguladas en la fisiopatología de la HPAi**

Los resultados presentados en la RRT metabólica (RRTM) común (**Figura 22**) obtenida durante el desarrollo del objetivo específico 1 de este trabajo de tesis, nos mostró una serie de genes como efectores directos del metabolismo celular en tejido pulmonar completo provenientes de pacientes HPAi que se encontraban regulados por uno o más factores de transcripción (FT). Los más importantes de estos genes serán mencionados a continuación, así como su relación e implicancia en la fisiopatología de la HPAi:

**A. PHGDH:** Este gen codifica para la enzima fosfoglicerato deshidrogenasa. Su función es catalizar la oxidación reversible del 3-fosfo-D-glicerato a 3-fosfoenoxipiruvato, el cual es el primer paso de la biosíntesis de la fosforilación de L-Serina. Así también, se ha reportado que cataliza la oxidación reversible de 2-hidroxiglutarato a 2-oxoglutarato y la oxidación reversible de (S)-malato a oxalacetato (Li *et al.*, 2021; Mullarky *et al.*, 2011; Spillier & Frédérick., 2021). Esta enzima es considerada un blanco terapéutico emergente en oncología por causa de su papel en la aparición del efecto Warburg, principalmente por la conversión del intermediario glicolítico 3-fosfoglicerato a fosfohidroxipiruvato. Esta reacción enzimática es un paso limitante para la ruta sintética de la serina (Zog., 2014). Está reportado que su variante humana es inducida por 17  $\beta$ -estradiol y 4-hidroxitamoxifeno (Metcalf *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2015), por lo que su alza es consistente con el hecho de que en HPAi encontramos como factor de riesgo el poseer E2 plasmático elevado (Mair *et al.*, 2014).

Se ha descrito que la expresión de PHGDH es necesaria para mantener la homeostasis redox mitocondrial, supervivencia de células madre de cáncer mamario y estimulación de la metástasis pulmonar. Este efecto descrito tanto en modelos negativos y positivos para ERs, involucra la mantención de los niveles de NADPH y desensibilización frente a estímulos apoptóticos como el carboplatino o la doxorubicina (Samanta *et al.*, 2019). Adicionalmente, esta proteína se encuentra predominantemente elevada en la formación de tumores mamarios, independiente de su malignidad. Complementariamente, la sobre expresión de PHGDH es una característica intrínseca de las células ER+ (Gromova *et al.*, 2015). Es tan relevante el papel de PHGDH en el rescate y mantención de células cancerosas que p53 no mutada controla la inducción de muerte celular mediante la inhibición de esta enzima (Ou *et al.*, 2015).

Es destacable que en la RRTM este gen no apareció controlado directamente por el factor transcripcional ESR1, pero sí estaba controlada su alza por el factor transcripcional SP1 y HOXA10 (**Figura 22**). SP1 codifica para la proteína de especificidad 1. Dentro de sus funciones descritas se encuentra el interactuar con un amplio rango de proteínas, entre las que se encuentran factores transcripcionales, miembros del complejo iniciador de la transcripción y reguladores epigenéticos, lo que le permite una específica y ajustada regulación génica en el tejido efector (O'Connor *et al.*, 2016). Se ha reportado que SP1 aumenta la actividad transcripcional inducida por E2, siendo específico para su interacción con ER $\alpha$  (ESR1)

(Schanton *et al.*, 2017). Interesantemente, en cáncer pulmonar, SP1 se encuentra elevado en etapas tempranas, disminuyendo su expresión en estadios avanzados de la patología. Siendo esta disminución controlada en dos puntos, directamente por E2 y SP1 en el aumento de la expresión de los miARN miR-3194-5p, miR-218-5p, miR-193-5p, miR-182-5p y miR-135-5p conllevando a la malignidad de la patología (Young *et al.*, 2022). Enriqueciendo los antecedentes de SP1 en patologías cancerosas, el tratamiento con E2 aumenta los niveles del transcrito 1 asociado a metástasis de adenocarcinoma pulmonar, en un mecanismo de transcripción dependiente de interacción directa con ER $\alpha$  en células de osteosarcoma (Hu *et al.*, 2017). Por otra parte, HOXA10 codifica para la proteína con actividad de factor transcripcional homeobox 10A. Este factor de transcripción corresponde a un controlador del programa génico durante el desarrollo embrionario que se encuentra regulado por E2 en diferentes modelos de cáncer, induciendo su expresión y contribuyendo a la consolidación del fenotipo canceroso, además de controlar los elementos de respuesta a estrógenos de HOXA10 (Chu *et al.*, 2001; Akbas *et al.*, 2004). Esta información nos muestra que si bien la RRTM no muestra una regulación estrogénica directa para PHGDH, este gen sí se encuentra regulado por factores transcripcionales gobernados por estrógenos y la actividad de sus ERs.

PHGDH se encuentra descrita dentro de la red transcripcional descrita por Stearman *et al.* (2019) como un blanco con alta representación, pero no específica para HPA. Es esperable que no exista esta exclusividad pues tanto en células neoplásicas como en PSMC hipertensas se presenta un fenotipo canceroso cuyos mecanismos de aparición son conservados evolutivamente.

**B. TXNRD1:** Este gen codifica para la enzima tioredoxina reductasa 1. Su función es reducir la disulfidoproteína tioredoxina a su forma ditiol (Tamura & Stadtman., 1996). Regula reacciones celulares redox, crecimiento y diferenciación celular. Se ha descrito en células HeLa que puede ser inducido por el 17  $\beta$ -estradiol. Relacionado a esto, su aumento en actividad incrementa la actividad transcripcional de los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Dammeyer *et al.*, 2008; Damdimopoulos *et al.*, 2004). El alza en la expresión de TXNRD1 se ha descrito que protege a las células del túbulo renal de la apoptosis inducida por hipoxia (Zhu *et al.*, 2022).

En nuestra RRTM común, POU2F1 es el FT que regula al alza la expresión de TXNRD1. Este FT se une a la secuencia octamérica 5'ATTTGCAT-3' activando la transcripción para ARNs

pequeños nucleares e histona 2B (H2B), que en su conjunto regulan la actividad transcripcional global. Se ha descrito que este FT está involucrado en la actividad transcripcional inducida por E2 que conlleva la construcción del complejo activador de la transcripción AP1 y que su activación por COLCA2 incide en la promoción del crecimiento tumoral (Zhou *et al.*, 2022; Klein & Assoian, 2008; Guo *et al.*, 2011).

TXNRD1 no fue encontrado por Stearman *et al.* (2019), pero recientemente fue descrito como un biomarcador de prognosis en HPAi en un robusto estudio donde se describió desde un punto *in silico* en muestras de pacientes, que la disminución en la expresión de este gen se correlaciona con una mejor prognosis. Específicamente, su expresión disminuye en un modelo proliferativo de PSMCs inducida por factor de crecimiento derivado de plaquetas y en suero de 9 pacientes HPAi en comparación con 13 controles (Lin *et al.*, 2022). Este hallazgo nos muestra que nuestra red rescató un gen relevante en la fisiopatología de la HPAi. Si bien ambos hallazgos difieren en si este gen se regula al alza o a la baja, podemos atribuirlo a que cada cohorte de pacientes es distinta y podríamos encontrar un patrón heterogéneo sobre TXNRD1 dependiendo del estudio realizado y de la efectiva representación entre controles y pacientes.

**C. *HMOX1*:** Este gen codifica para la enzima hemo oxigenasa 1. Esta proteína presenta dos actividades enzimáticas principales, la primera es catalizar el corte oxidativo del grupo hemo para generar la biliverdina IX $\alpha$ , liberando hierro ferroso (Wilks *et al.*, 1995; Lightning *et al.*, 2005). La segunda, es entregar protección contra la muerte celular programada, mediante su actividad catabolizadora del grupo hemo libre, previniendo que las células sufran apoptosis (Gozzelino, Jeney & Soares., 2010). En nuestra red transcripcional metabólica, este gen está regulado al alza por un conjunto de 18 FTs distintos, lo que nos indica una regulación redundante en HPAi atribuible a que HMOX1 ha sido descrito como un gen importante en la patogénesis de la HPA ligado al factor de transcripción TBX4 (Cai *et al.*, 2021; Thoré *et al.*, 2020). Adicionalmente, existen variados reportes que indican que una alta actividad/expresión de HMOX1 inhibe la remodelación de las células musculares lisas vasculares (VSMC) (Durante, 2020), lo que estaría contradiciendo lo encontrado en HPA. Esto es explicable debido a que se ha descrito que los cambios fenotípicos y respuestas celulares de PSMC difieren de las VSMC frente a un mismo estímulo, como, por ejemplo, lo descrito anteriormente en el contexto de la paradoja del estrógeno (Umar *et al.*, 2012).

**D. NQO1:** Este gen codifica para la enzima NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1. Esta enzima es una reductasa que cataliza la reducción de quinonas hacia hidroquinonas mediante el uso de 2 electrones provenientes de NADH o NADPH (Chen *et al.*, 1997; Siegel *et al.*, 1997). Se ha descrito que esta proteína se induce principalmente por estrés oxidativo (Guryanova *et al.*, 2011). De esto último, frente a estrés oxidativo interactúa con las proteínas supresoras de tumores TP53 y TP73 de manera dependiente de NADH, inhibiendo su degradación independiente de ubiquitina (Asher *et al.*, 2005; Medina-Carmona, 2017).

La expresión de este gen se encuentra controlado por la vía de señalización asociada a NRF2. Específicamente, la activación de NRF2 en un modelo de PASMCs sano expuesto a condiciones de normoxia e hipoxia aumentan la expresión de NQO1 y disminuye el agente vasoconstrictor EDN1 y el regulador fibrótico y angiogénico THBS1. Conllevando esta activación a una reducción del remodelamiento vascular (Pan *et al.*, 2023). Este factor protector de NQO1 también se ha descrito en un modelo de HP inducido por la molécula inhibidora del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, SU5416, en combinación con hipoxia (SuHx) (Kang *et al.*, 2020) y en PASMC provenientes de pacientes HPA (Kurosawa *et al.*, 2019).

Destacablemente, este gen está regulado al alza en nuestra RRTM por la actividad de sirtuinas (SIRT1), FOS, NRF1, NFE2L2 (compartido con HMOX1) y controlado por el receptor de estrógenos  $\alpha$  (ESR1). Esta vía regulatoria atribuible a protección en el remodelado pulmonar puede atribuirse al brazo protector descrito en la paradoja del estrógeno, ya que está ampliamente reportado que los estrógenos y la consecuente activación de sus receptores con actividad transcripcional inducen un aumento en el tono antioxidante celular (Guajardo-Correa *et al.*, 2022).

**E. ABCG2:** Este gen regulado a la baja en nuestra RRTM, codifica para la proteína casete de unión ATP, subfamilia G miembro 2. Así también, es conocida como casete de la subfamilia G de unión a ATP para transporte de salida relacionada con la resistencia a múltiples fármacos. Su actividad está descrita como transportador dependiente de ATP de amplia especificidad por sustrato de la familia de casetes de unión a ATP (ABC) que extruye activamente una amplia variedad de compuestos fisiológicos, toxinas dietéticas y xenobióticos de las células (Robey *et al.*, 2009; Heyes, Kapoor & Kerr, 2018). De manera general, está involucrada en la excreción de estrógenos y andrógenos (Suzuki *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2017; Manolaridis *et al.*, 2018).

Entre sus reacciones descritas destacan para nuestro interés  $ATP + \text{estrón-3-sulfato (intracelular)} + H_2O = ADP + \text{estrón-3-sulfato (extracelular)} + H^+ + \text{fosfato}$  (Broquet *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2017) y  $17 \beta\text{-estradiol } 17\text{-O-(}\beta\text{-D-glucuronato) (intracelular)} + ATP + H_2O = 17 \beta\text{-estradiol } 17\text{-O-(}\beta\text{-D-glucuronate) (extracelular)} + ADP + H^+ + \text{fosfato}$  (Suzuki *et al.*, 2003). En un modelo de ratones hipóxicos de HPA, se reportó que la pérdida en la expresión de ABCG2 conlleva a un fenotipo fibrótico y de disfunción cardíaca biventricular (Nagy *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha utilizado a ABCG2 como un marcador de estudio para evaluar vías de señalización/regulación génica claves en la enfermedad vascular pulmonar (Gaskill *et al.*, 2016). Esta actividad de ABCG2 nos indica, claramente, que entre las estrategias que puede generar el tejido pulmonar y vascular HPAi se encuentra el retener metabolitos del estradiol que tradicionalmente serían expulsados de la célula para ser eliminados por la orina, lo que conlleva a un mayor efecto estrogénico, mitótico y metabólico.

Esta última aseveración se respalda en que uno de los FTs que controlan la disminución en la expresión de ABCG2 es ESR1, del cual a lo largo de este escrito se ha referenciado como un factor crucial en la actividad de los estrógenos en nuestro tejido de interés.

**F. CA2:** Este gen regulado a la baja en nuestra RRTM codifica para la enzima anhidrasa carbónica 2 y cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono (Hudalla *et al.*, 2019).

Este hallazgo es bastante interesante, pues existen antecedentes de que la disminución en la actividad de CA induce una acidosis metabólica que ejerce un efecto protector en HP inducida por hipoxia y que la inhibición farmacológica por acetazolamida genera un fenotipo antiinflamatorio por inhibición de CA en macrófagos y acidosis sistémica (Hudalla *et al.*, 2019). Así también, su inhibición en un modelo SuHx mejora la respuesta funcional de relajación en la arteria pulmonar frente a óxido nítrico (Christou *et al.*, 2021).

La disminución de CA2 en nuestra RRTM está controlada por el factor transcripcional JUN. Este proto-oncogen puede ser inducido por estrógenos regulando principalmente sus efectos mitóticos gracias a que contiene una secuencia *enhancer* específica inducible por estrógenos y que es un efector específico para estrógenos en el útero (Hyder *et al.*, 1995; Chiappetta *et al.*, 1992). Su disminución es atribuible, hipotéticamente, a los efectos protectores sobre el estado oxidativo e inflamatorio mediado por estrógenos (Guajardo-Correa *et al.*, 2022).

De manera global, podemos observar que el nodo principal desregulado en la RRTM común muestra un claro predominio del receptor de estrógeno  $\alpha$  (ESR1) como controlador maestro río arriba de la red transcripcional HPAi, lo que se comparte como hallazgo en la red transcripcional de la publicación fuente (Stearman *et al.*, 2019). Stearman *et al.* (2019) discuten sobre ESR1 como un regulador de poca relevancia debido a la paradoja del estrógeno, decidiéndose por otras vías reguladas debido a que también atribuyen el rol de ESR1 al sesgo por sexo (universo 3:1) entre mujeres y hombres. El presente trabajo eliminó el sesgo por sexo reportado por los autores originales y validó que al emparejar la representación de los sexos (1:1) y comparando pares de individuos de la misma edad, eliminando sesgo por grupo etario (**Tabla 2**); obtuvimos el mismo resultado de ESR1 como un regulador maestro (**Tabla 3**). Este controlador maestro nos sugiere que, durante el progreso de la patología, ESR1 incrementa al alza el metabolismo de los estrógenos y andrógenos mediado por CYP1B1 conllevando a un aumento teórico en los niveles de estriol, 16  $\alpha$ -hidroxiestradiol y de 4-hidroxiestradiol (4-HE) (**Figura 4**). Este último metabolito es el precursor del 4-ME, del cual no existen reportes sobre su efecto en PSMC, al menos hasta el punto de realización de esta tesis doctoral. Relacionado a esto, podemos suponer que la producción local de 4-ME en el tejido pulmonar efectivamente ocurre, pues la estabilidad del hidroxiestrógeno 4-HE es baja ya que es rápidamente metabolizado a su correspondiente metoxiestrógeno (Parada-Bustamante *et al.*, 2013). Este control del metabolismo mediado por CYP1B1 ha sido ampliamente reportado en diversos modelos y pacientes HPA, pero con pobre evidencia experimental en su variante idiopática. Respecto a esto, se ha reportado que pacientes HPAi poseen un aumento en la expresión de CYP1B1 y que este metabolismo estaría correlacionado con un aumento en 16  $\alpha$ -hidroxiestradiol. Esto nos conlleva a un problema de construcción de proyecto pues nos mostraría evidencia de perturbación clara de metabolismo estrogénico similar a las variantes de HPA hereditarias mediadas por mutaciones en BMP2. Específicamente, para nuestro objetivo de investigación, esto no presenta un inconveniente, ya que el hallazgo referenciado fue utilizando muestras de sangre periférica y estímulos de 16  $\alpha$ -hidroxiestradiol sobre PSMC, de los que ya se tiene ampliamente reportado que induce el fenotipo “canceroso” en modelos HPA.

Para nuestro contexto, apuntamos hacia una producción local de 4-ME específica de la arteria pulmonar que deriva del estímulo de E2, lo que estaría induciendo el fenotipo patológico en las PSMCs. De esta manera se propone una vía nueva patológica que debería ser clasificada,

frente a la perspectiva de este autor como hipertensión pulmonar arterial mediada por estrógenos (HPAe).

De lo discutido, podemos indicar que en nuestra RRTM común (**Figura 22**), los estrógenos controlaban el cambio fenotípico en HPAi tanto de manera directa como indirecta. Esto mediado por una respuesta transcripcional mixta, en donde podemos identificar un grupo de genes que estarían actuando de manera protectora/compensatoria ante la reprogramación fenotípica hipertensa y otro grupo de genes que se encarga de asegurar la obtención de mediadores energéticos no mitocondriales, inducir proliferación y estimular la aparición de metabolitos de estrógenos con actividad perjudicial para la vasculatura pulmonar.

Con la intención de encontrar marcadores *in silico* que puedan otorgarnos diferencias en los mecanismos que subyacen a la aparición de HPAi dependiente del sexo es que se construyeron las RRTM exclusivas para hombres (**Figura anexa 7**) o mujeres (**Figura anexa 8**). La discusión a profundidad para estos resultados se encuentra en la discusión anexa. Esto pues nos enfocaremos en discutir los resultados más relevantes para el presente trabajo.

En HPA, la suplementación con melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), hormona involucrada en la regulación del ciclo circadiano, ha mostrado favorables efectos en los pacientes, siendo utilizada tanto en fase preclínica como clínica (Maarman y Lecour., 2021). Respecto a melatonina, la red transcripcional metabólica muestra que su metabolismo se encuentra alterado (**Tabla 3**), sugiriendo que es altamente probable que, para la aparición de la patología, sean requisito dos eventos metabólicos hormonales simultáneamente desregulados, o que un evento sea dependiente del otro. Considerando que ESR1 es uno de los controladores maestros de la red, podemos descartar la primera opción.

**Tabla 3. Tejido pulmonar proveniente de pacientes HPAi presentan nodos, reacciones metabólicas y compartimentalización distintas entre ellos, destacando la excepción del control transcripcional de ESR1 y metabolismo hormonal para ambos sexos biológicos.**

<b>Ubicación espacial</b>	<b>Hombres</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Ambos</b>
Espacio extracelular/citosol	145 reacciones (6 al alza, 139 a la baja) (22 exclusivas del EE)	22 reacciones al alza (2 exclusiva del EE)	479 reacciones a la baja (1 exclusiva del EE)
Mitocondria	57 reacciones a la baja	0 reacciones	0 reacciones
Citosol	56 reacciones (22 al alza, 34 a la baja)	2 reacciones (1 a la baja, 1 al alza)	96 reacciones (1 a la baja, 95 al alza)
Retículo endoplásmico	1 reacción a la baja (prostaglandinas)	0 reacciones	<u>14 reacciones al alza</u> (todo metabolismo de estrona/estradiol)
Sin compartimentalizar	150 reacciones (60 a la baja, 90 al alza)	96 reacciones (38 al alza, 58 a la baja)	53 reacciones (10 a la baja, 43 al alza)
<b>Clase gen</b>			
CYP1B1	0 reacciones	0 reacciones	<u>63 reacciones alza</u> ( <u>Metabolismo melatonina y hormonas sexuales</u> )
GPER1	0 genes	0 genes	0 genes
<b>Clase FT</b>			
ESR1	0 genes	1 gen bajo su control	<u>59 genes bajo su control</u>
ESR2	0 genes	1 gen bajo su control	0 genes

Clase hormona			
Estrógenos	0 reacciones	0 reacciones	<u>14 reacciones directas al alza</u>
Andrógenos	0 reacciones	0 reacciones	<u>14 reacciones directas al alza (7 compartidas con estrógenos)</u>

En cuanto a localización celular de las reacciones metabólicas alteradas, nuestra red global (hombres + mujeres) nos mostró que existen reacciones metabólicas afectadas a nivel de citosol, espacio extracelular, retículo endoplásmico y otras reacciones sin compartimentalizar (**Tabla 3**). Considerando la importancia que tiene la dinámica y el metabolismo mitocondrial sobre la aparición de un fenotipo hipertenso en HPA (Parra *et al.*, 2017) es que llama nuestra atención que el único organelo en donde no se comparten reacciones en la red global es la mitocondria. Específicamente, los hombres poseían 57 reacciones mitocondriales alteradas, mientras que, en las mujeres, ninguna (**Tabla 3**). Esto podría estar indicando que, si bien la disrupción de reacciones metabólicas mitocondriales es de alta relevancia en HPA, es más importante un hipotético aumento sobre la fisión en la dinámica mitocondrial, pues recordemos que la red construida está en base a la expresión génica y no considera la dinámica que poseen los organelos. Esto se encuentra respaldado además en que es el equilibrio fisión/fusión de la mitocondria el que regula la actividad metabólica en las células, siendo además un proceso que controla el fenotipo proliferativo, pues el uso de inhibidores de fisión previene la aparición de un fenotipo hipertenso y los cambios metabólicos (Buck *et al.*, 2016; Dorn *et al.*, 2015; Parra *et al.*, 2017).

### **7.5 Efectos de E2 y 4ME sobre hPASCs en el contexto de la “paradoja del estrógeno”**

Los resultados mostrados en la presente tesis nos entregan puntos en común sobre el efecto de estrógenos en células musculares lisas vasculares, como también efectos diferenciales. Se ha reportado que el aumento en la TCO por estrógenos en las células se correlaciona con una

mitocondria protegida que genera elevados niveles de ATP, conllevando a un efecto vasoprotector endotelial-muscular liso que involucra adicionalmente la inhibición en la proliferación de las células musculares lisas vasculares (VSMC) (Guajardo-Correa et al., 2022; Lee et al., 2017; Xing et al., 2009; Niță et al., 2021), lo que se contradice en parte con lo reportado en el presente trabajo para hPASM. Esto pues tanto E2, como 4-ME, a pesar de aumentar la TCO (**Figura 19 y 18**), indujeron una mitocondria disfuncional por causa de la pérdida de potencial mitocondrial y aumento de mtROS (**Figura 14, 15, 16 y 17**), efecto que no se relacionó con lo reportado en los efectos protectores de E2 en VSMC. Adicionalmente, y a pesar de aumentar la respiración celular en hPASCs, los estrógenos aumentaron la proliferación de hPASCs (**Figura 8, 9, 10 y 11**), al contrario de su efecto reportado en VSMCs (Lee et al., 2017; Xing et al., 2009; Niță et al., 2021).

Lo discutido en el párrafo anterior nos muestra fuerte evidencia en el efecto diferencial de los estrógenos en HPAi, que conlleva a la paradoja del estrógeno.

Esta paradoja puede ser explicada en dos perspectivas generales, una que toca los efectos rápidos de los estrógenos en la cardiovascular/cardioprotección, que ya fue analizada en el párrafo anterior, y otra que se correlaciona a cómo este efecto se encuentra regulado por los receptores de estrógenos en conjunto con coactivadores y correpresores.

Un punto base para discutir esta actividad se encuentra en el coactivador de receptores esteroidales 1 (SRC-1, también conocido como NCOA1). SRC-1 es un coactivador del receptor de progesterona, glucocorticoides, hormonas tiroideas, retinoico y del ER $\alpha$  (Walsh et al., 2012). Es de destacar que es para el ER $\alpha$  por quien SRC-1 posee una mayor afinidad de unión (Zhou et al., 1998). Relacionado a esto, la pérdida de SRC-1 se ha relacionado con la formación de lesiones en la neointima y una elevada proliferación de VSMC en respuesta a lesiones vasculares, perdiendo también el efecto cardioprotector inducido por estrógenos (Yuan & Xu., 2007). Por otra parte, en hPASCs se ha descrito que la inhibición de SRC, específicamente su fosforilación en el residuo tirosina 416, revierte la remodelación vascular en un modelo *in vitro* hipóxico y en un modelo *in vivo* SuHx (Liu et al., 2019). Adicionalmente, SRC, mediante su interacción con STAT3 se encuentra constitutivamente activos en HPA, previniéndose dicha activación gracias al uso de dehidroepiandrosterona (Paulin et al., 2011).

Considerando lo expuesto, el estudiar la familia de SRC y cómo se regulan diferencialmente sus actividades en la musculatura lisa de la arteria pulmonar nos puede entregar las respuestas del porqué su activación en VSMC es protectora, pero en hPASMCs mantiene un fenotipo patológico, correlacionando esto a la función de coactivador del ER $\alpha$  y el fenotipo observado en la paradoja del estrógeno.

### 7.6 Perspectivas farmacológicas en HPAi/HPAe

Como ya se ha referenciado, en un modelo hipóxico de HP sobre hPASMCs se reportó la aparición de una subpoblación celular que se vuelve senescente, y que es esta subpoblación quien induce proliferación celular mediante la secreción de IL-6 (Wang et al., 2021). Respecto con los hallazgos encontrados en la presente tesis, es necesario dilucidar a futuro si esta subpoblación senescente puede también ser inducida por E2 o 4-ME y si, en caso de aparecer, gobierna la proliferación de hPASMCs (**Figura 8, 9, 10 y 11**). Esto nos otorgaría una estrategia interesante para nuevas propuestas de tratamientos basados en la inhibición de la señalización de IL-6 e inhibición de los receptores de estrógenos (ERs y GPER) combinados.

En el presente trabajo se describió que el efecto proliferativo de E2 está mediado por ER  $\alpha$  y/o ER $\beta$ , lo que es enriquecido con el reporte de que al inhibir específicamente el ER $\alpha$  se previene proliferación de hPASMCs (Mair et al., 2014). De esto último, es relevante destacar la necesidad de encontrar un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERMs) específico para ER $\beta$  en hPASMCs para ser utilizado en el tratamiento de la HPAi. Es interesante esta perspectiva por causa de que el ER $\beta$  se ha relacionado como un factor protector en VSMC (Hodges et al., 2000) y adicionalmente se encuentra localizado en la mitocondria (Guajardo-Correa et al., 2022); siendo el único REs reportado con esta localización específica, por lo que su activación particular es una perspectiva factible para prevenir o atenuar las manifestaciones celulares y tisulares de la HPAi/HPAe.

En esta dirección, se ha descrito un SERM específico del ER $\beta$  que presenta agonismo completo por dicho receptor y que se ha utilizado en modelos *in vitro* por tener propiedades parecidas a las de un antidepresivo (Clark et al., 2012).

Adicionalmente, podemos realizar intervenciones con precursores de la ruta sintética del metabolismo de hormonas esteroideas. Se han reportado efectos protectores de la androstenediona sobre musculatura lisa vascular. Incluso ya se está utilizando dehidroepiandrosterona, precursor del androstenediol, como alternativa de tratamiento en una prueba clínica de HP (NCT03648385), sin reportarse resultados oficiales al momento de la finalización del presente trabajo. Complementariamente, en un estudio piloto, el uso de dehidroepiandrosterona mejora los parámetros hemodinámicos de pacientes con HP y reduce la proliferación de PSMCs (Dumas de La Roque et al.; 2010; Dumas de La Roque et al., 2012). Esto se respalda además en el trabajo que muestra el uso de dehidroepiandrosterona para la prevención del fenotipo HPA (Paulin et al., 2011) y que niveles reducidos de dehidroepiandrosterona combinado con elevados niveles de E2 aumentan el riesgo y la severidad de HPA (Baird et al., 2018; Ventetuolo et al., 2016). Dicha información sobre un SERM selectivo para ER $\beta$  y dehidroepiandrosterona nos sugiere su utilización combinada para el tratamiento de la patología HP*Ai*, lo que en contexto del cáncer ya se ha reportado como estrategia experimental (Labrie., 2006). A modo de enriquecer el potencial de esta terapia combinada, es de destacar que análogos del androstenediol se han desarrollado como SERMs selectivos para ER $\beta$  (Blizzard et al., 2007).

Es importante considerar los reportes asociados a la “paradoja del estrógeno” y del efecto diferencial de estrógenos según el sexo (Mair et al., 2014). La estrategia/perspectiva que surge del presente trabajo es que si bien a pesar de que los niveles de estrógenos elevados son un factor de riesgo relevante para ambos sexos, existe un efecto diferencial basado en la proporción de ERs expresados en hPSMCs según el sexo del paciente y como se afecta su actividad según la presencia o ausencia de corepresores o coactivadores específicos según el sexo, como también de moduladores de histonas expresados específicamente en el cromosoma Y (Cunningham et al., 2022).

En conclusión, el presente trabajo muestra por primera vez el efecto sobre la inducción de un fenotipo hipertenso en hPSMCs inducido por 4-ME. Así también se describe por primera vez un efecto sobre las mitocondrias ejercido por 4-ME y una vía distinta a E2, para un mismo efecto celular.

Confirmamos que E2 es un regulador maestro en la aparición de un fenotipo tipo hipertenso asociado a la actividad de CYP1B1 en pacientes HPAi, pues ESR1 codifica para ER $\alpha$ , modulando directamente parámetros energéticos metabólicos. En el modelo *in vitro*, hPASCs, también se muestra un cambio fenotípico “hipertenso”, cuyo mecanismo está asociado a receptores independientes entre E2 y 4-ME. Por otro lado, el efecto del E2 al ser mediado por ER, nos sugiere que está ligado a modulación genómica directa o modulación de segundos mensajeros. Por otra parte, es necesario dilucidar si el mecanismo asociado a la actividad de 4-ME dependiente de GPER, es el que está controlando las diferencias encontradas en las redes transcripcionales, específicamente dado que en mujeres la aparición de HPAi es independiente de cambios de expresión genética asociada a la mitocondria; planteando la posibilidad de que sea directamente por los cambios en la dinámica mitocondrial, en este caso, un aumento en la fisión mitocondrial, la cual debe ser evaluada.

## 8. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos y la discusión realizada se concluyen los siguientes puntos:

- E2 induce un cambio tipo “canceroso” caracterizado por un aumento en la proliferación y disfunción mitocondrial asociada a pérdida de  $\Delta\Psi$ M y acumulación de ROS.
- 4-ME induce un cambio tipo “canceroso” caracterizado por un aumento en la proliferación y disfunción mitocondrial asociada a pérdida de  $\Delta\Psi$ M y acumulación de ROS.
- E2 y 4-ME aumentan la respiración celular, siendo el efecto de 4-ME asociado a la respiración extramitocondrial y el del E2 asociada a la respiración mitocondrial.
- Los estrógenos difieren en sus mecanismos de acción para inducir un fenotipo “canceroso”, siendo la vía genómica utilizada por E2 y la vía no genómica la utilizada por 4-ME.
- Los cambios transcripcionales metabólicos patológicos en HPAi común para hombres y mujeres están controlados por señalización estrogénica y aumento en el metabolismo de esteroides sexuales.
- Para hombres, los cambios transcripcionales y metabólicos conllevan a una disminución destacable de expresión de la maquinaria de  $\beta$ -oxidación.

- Para mujeres, los cambios transcripcionales metabólicos conllevan a un aumento de la glicólisis, sin afectar a nivel de expresión génica procesos mitocondriales.

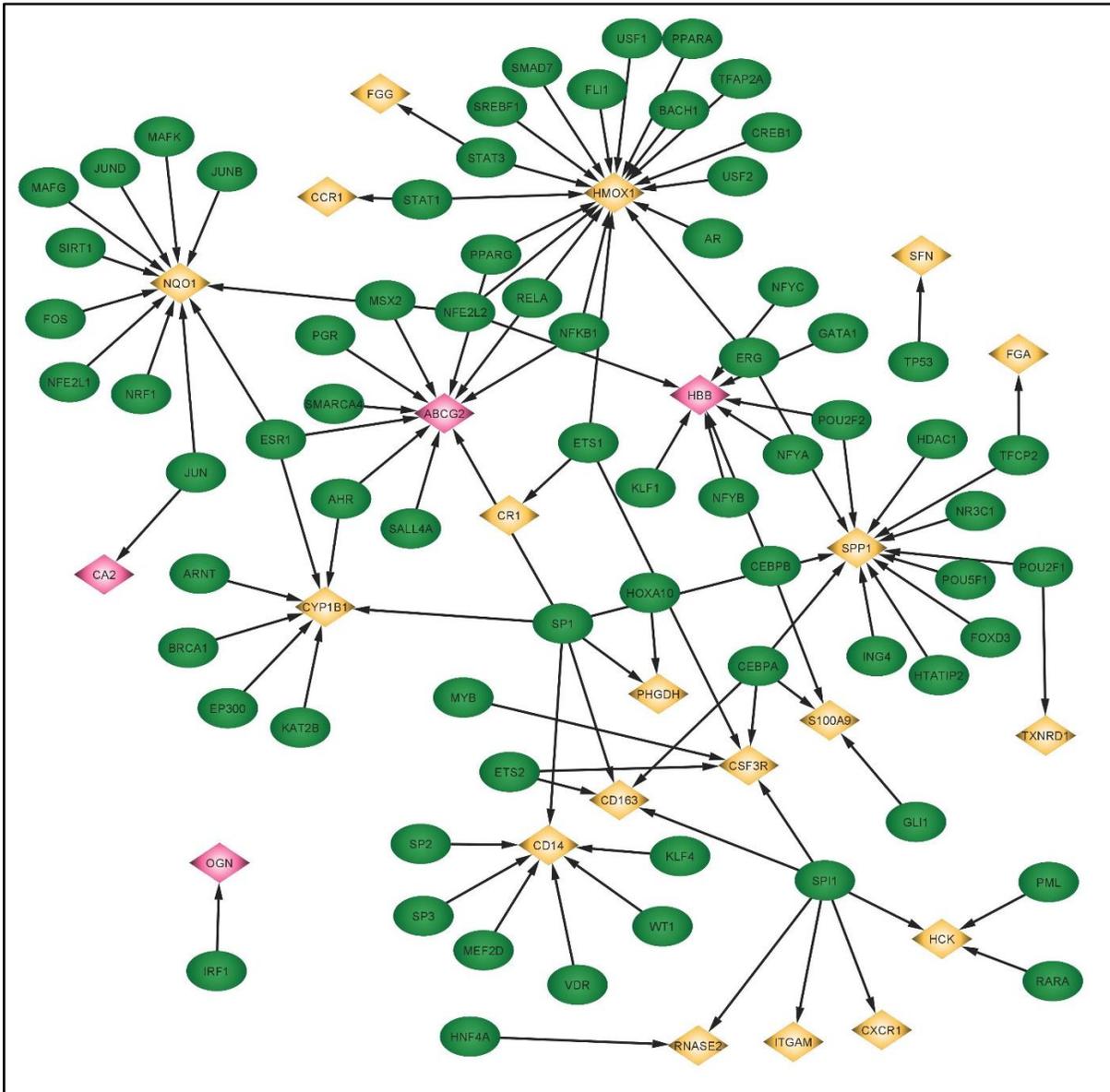
Por lo que al finalizar esta tesis se puede concluir que la hipótesis planteada inicialmente “*17 $\beta$ -estradiol y su metabolito 4-metoxiestradiol, inducen proliferación de las hPASCs a través de un mecanismo dependiente de la inhibición de la función mitocondrial y de las vías de receptores de estrógenos clásicas y no clásicas, reflejando el fenotipo patológico encontrado en pacientes hipertensos pulmonares arteriales idiopáticos*” ha sido comprobada.

## 9. LIMITACIONES Y PROYECCIONES

Las limitaciones de la presente tesis son las siguientes:

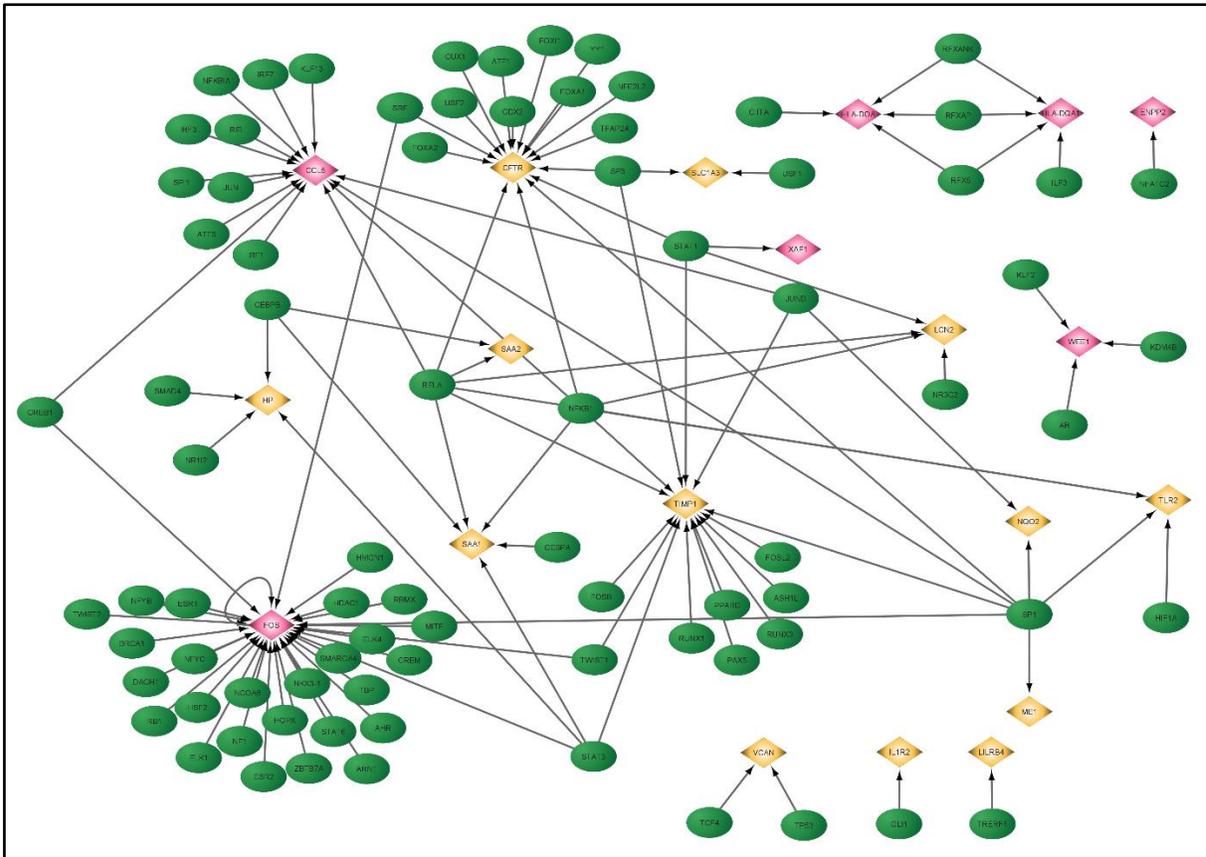
- La red transcripcional metabólica debe ser contrastada con resultados *in vitro* e *in vivo* en cuanto a la producción de metabolitos asociados a las reacciones reguladas y el confirmar que los genes rescatados por la red efectivamente aumentan o disminuyen su expresión en modelos de HPA, como es en el caso de esta tesis, las células hPASCs.
- Los resultados obtenidos en RRTM exclusivas para hombres y mujeres requieren la contrastar si el efecto sobre disfunción mitocondrial en HPAi y modelos *in vitro* es exclusiva para hombres.
- Si bien nuestro trabajo es novedoso en cuanto al reporte de mecanismos de acción de estrógenos en hPASCs, específicamente los efectos de 4-ME, es necesario dilucidar a futuro si estos efectos de los estrógenos pueden estar dependiendo o no de la dinámica mitocondrial. Esto se justifica, además, en los hallazgos diferenciales entre hombres y mujeres en la RRTM.
- Las limitaciones más importantes de este estudio es que los cambios, regulaciones, efectos proliferativos y asociados a función mitocondrial deben ser descritos en modelos *in vivo* y contrastarlo con cohortes de pacientes HPAi.
- Otra limitación es la necesidad de caracterizar la actividad metabólica de estrógenos en hPASCs obtenidas desde pacientes HPAi. Esto permitiría definir finalmente si este tipo celular genera los metabolitos de estrógenos descritos en suero de pacientes HPA hereditarios o 4-ME sería una molécula firma de HPAi.

## 10. FIGURAS ANEXAS



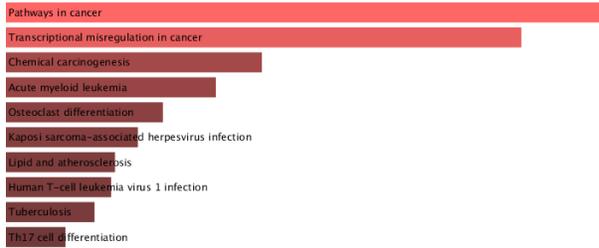
**Figura anexa 1. Red regulación transcripcional común en pacientes HPai.** La red se compone de genes diferencialmente expresados comparando pacientes hombres y mujeres HPai vs control (n=10). Las elipses verdes representan factores transcripcionales; los rombos indican genes. En amarillo los genes regulados significativamente al alza y en rosa los genes regulados a la baja en la red. La red se construyó filtrando la base de datos publicada por Stearman *et al.*, 2019 y emparejándola con la base de datos TRRUST v2 (Han H *et al.*, 2018) se visualizó en el software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003).



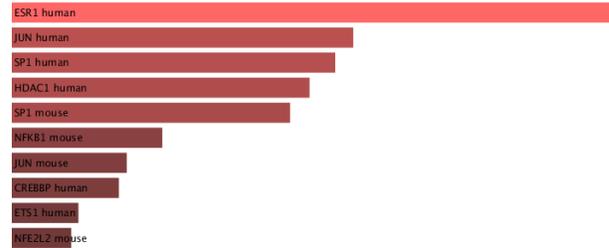


**Figura anexa 3. Red regulación transcripcional exclusiva para mujeres pacientes HPai.** La red se compone de genes diferencialmente expresados comparando pacientes mujeres HPai vs control (n=5). Las elipses verdes representan factores transcripcionales; los rombos indican genes. En amarillo los genes regulados significativamente al alza y en rosa los genes regulados a la baja en la red. La red se construyó filtrando la base de datos publicada por Stearman *et al.*, 2019 y emparejándola con la base de datos TRRUST v2 (Han H et al., 2018) se visualizó en el software Cytoscape (Shannon et al., 2003).

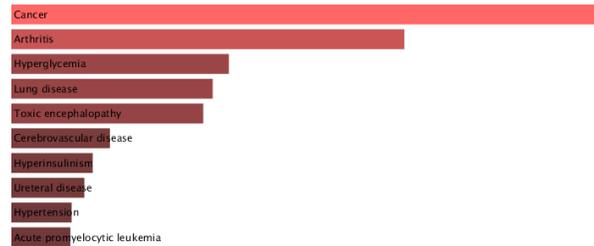
## A KEGG 2021 Humano



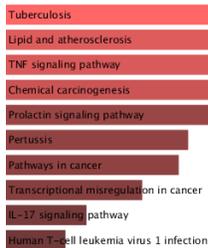
## TRRUST – Factores de transcripción



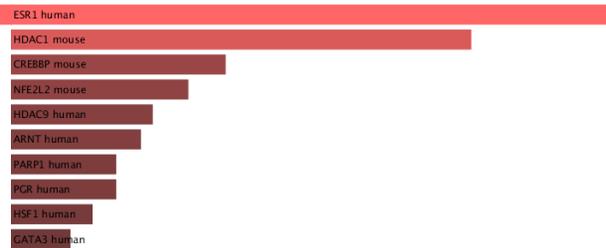
## Enfermedades – Jensen



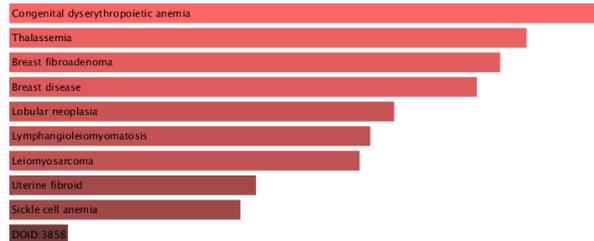
## B KEGG 2021 Humano



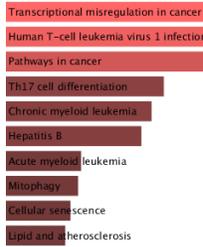
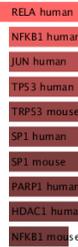
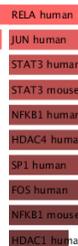
## TRRUST – Factores de transcripción



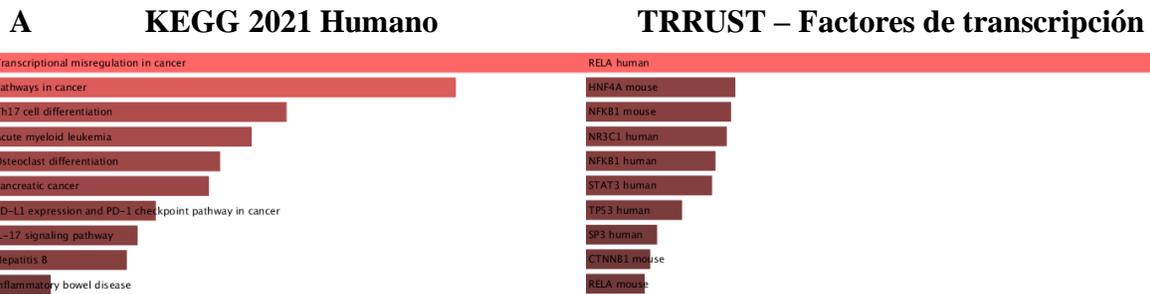
## Enfermedades - Jensen



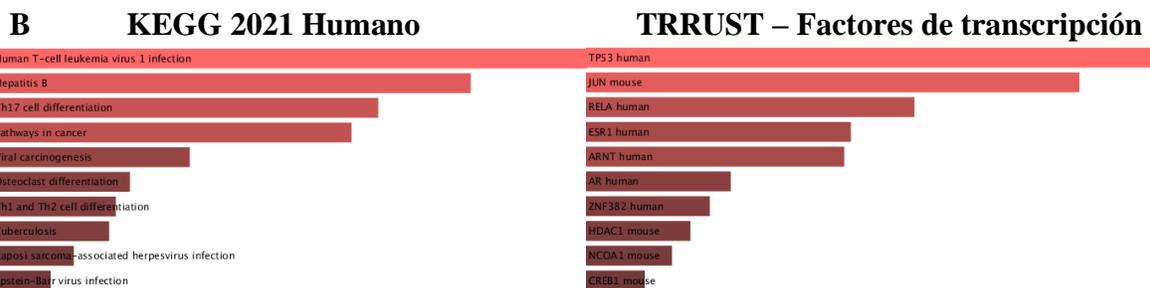
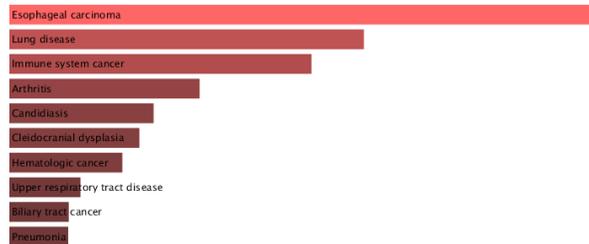
**Figura anexa 4. Análisis mediante *Enrichr* de redes regulatorias transcripcionales común al alza (A) y a la baja (B).** Las redes transcripcionales metabólicas fueron ingresadas en la base de datos *Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) para evaluar el fenotipo funcional de la red utilizando la base de datos *KYOTO encyclopedia of genes and genomes* (<https://www.genome.jp/kegg/>) y de asociaciones de enfermedad-gen extraídas desde literatura *JENSENLAB* (<https://diseases.jensenlab.org/>). El código presentado indica que mientras más extensa y roja sea la banda presentada en la gráfica, mayor es su significancia estadística.

**A****KEGG 2021 Humano****TRRUST – Factores de transcripción****Enfermedades - Jensen****B****KEGG 2021 Humano****TRRUST – Factores de transcripción****Enfermedades - Jensen**

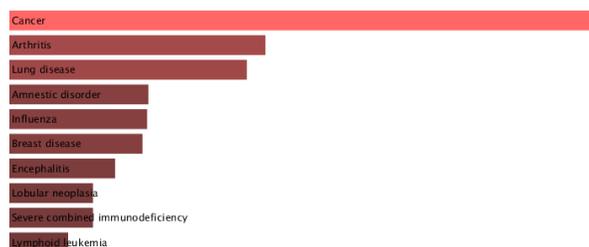
**Figura anexa 5. Análisis mediante *Enrichr* de redes regulatorias transcripcionales exclusivas para hombres al alza (A) y a la baja (B).** Las redes transcripcionales metabólicas fueron ingresadas en la base de datos *Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) para evaluar el fenotipo funcional de la red utilizando la base de datos *KYOTO encyclopedia of genes and genomes* (<https://www.genome.jp/kegg/>) y de asociaciones de enfermedad-gen extraídas desde literatura JENSENLAB (<https://diseases.jensenlab.org/>). El código presentado indica que mientras más extensa y roja sea la banda presentada en la gráfica, mayor es su significancia estadística.



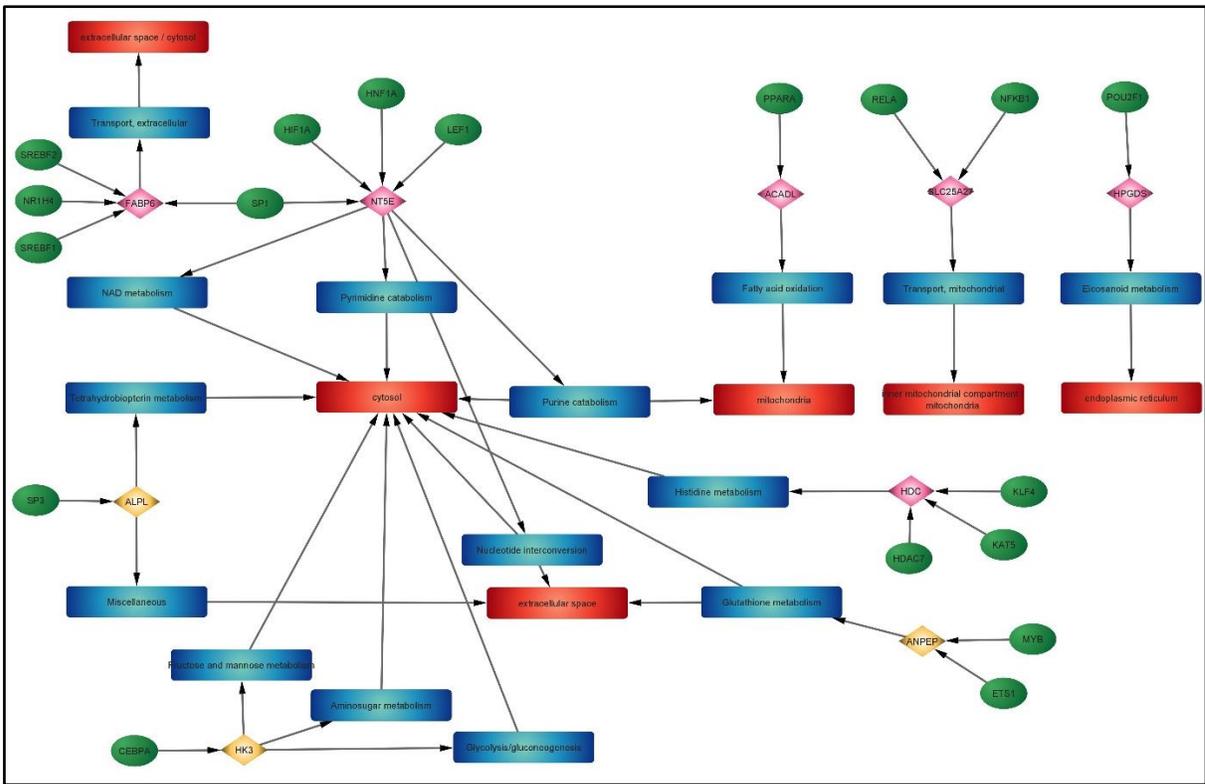
### Enfermedades - Jensen



### Enfermedades - Jensen

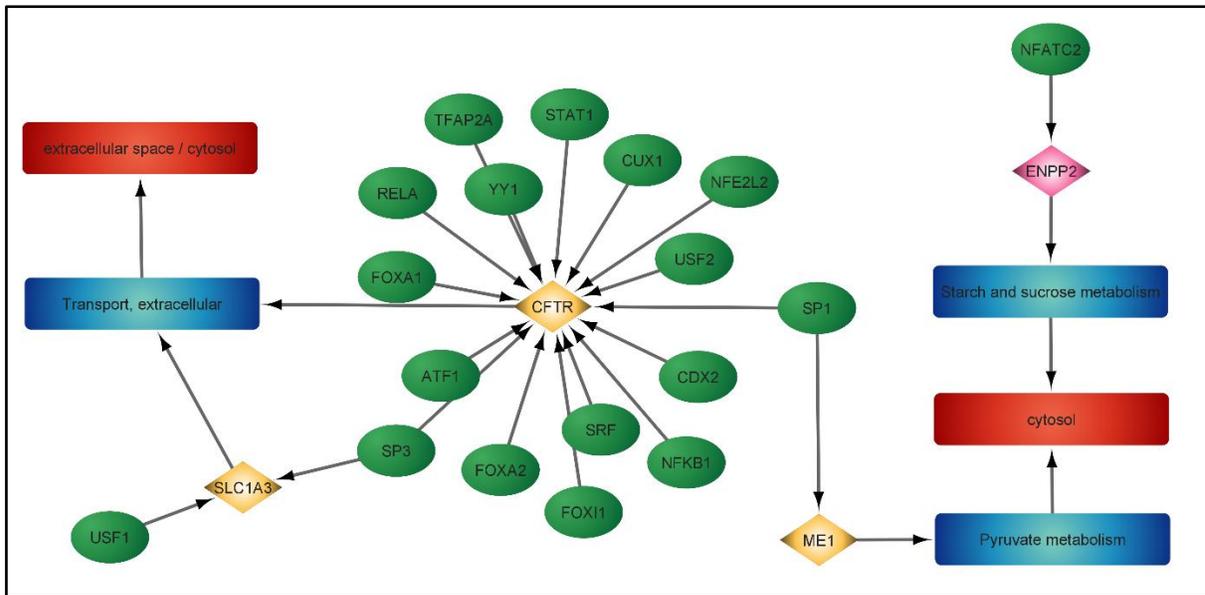


**Figura anexa 6. Análisis mediante *Enrichr* de redes regulatorias transcripcionales exclusivas para mujeres al alza (A) y a la baja (B).** Las redes transcripcionales metabólicas fueron ingresadas en la base de datos *Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) para evaluar el fenotipo funcional de la red utilizando la base de datos *KYOTO encyclopedia of genes and genomes* (<https://www.genome.jp/kegg/>) y de asociaciones de enfermedad-gen extraídas desde literatura *JENSENLAB* (<https://diseases.jensenlab.org/>). El código presentado indica que mientras más extensa y roja sea la banda presentada en la gráfica, mayor es su significancia estadística.



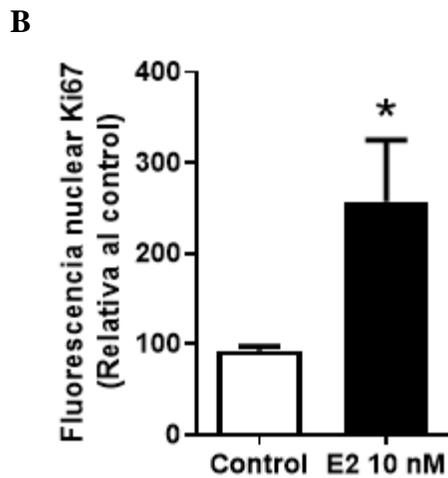
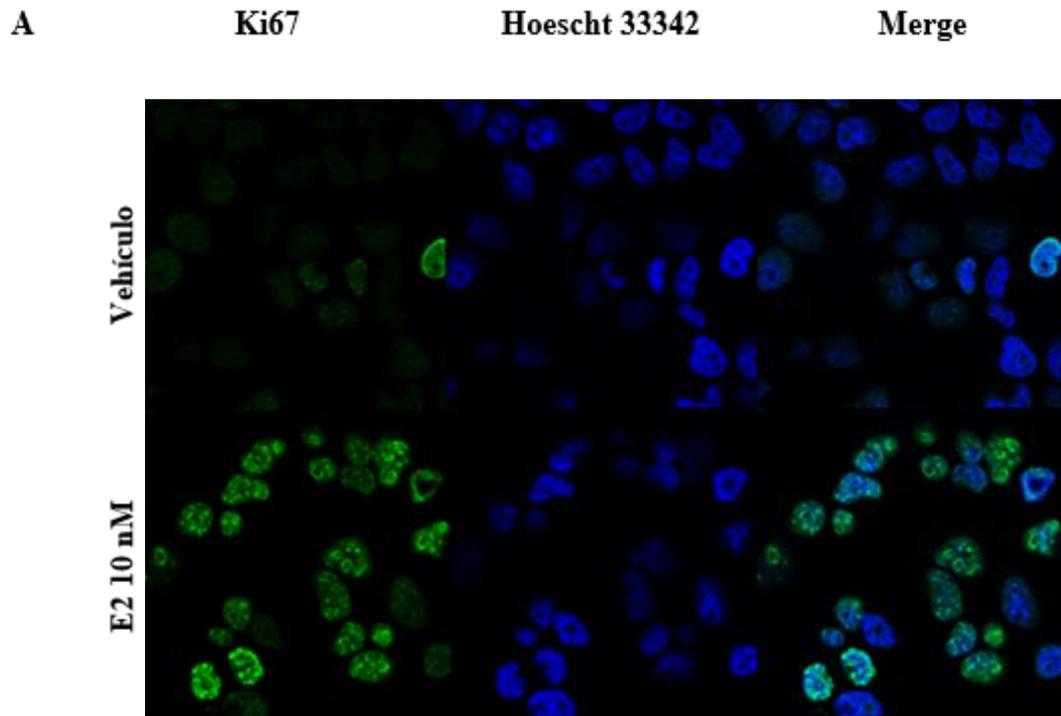
**Figura anexa 7. Red regulación transcripcional metabólica en pacientes hombres HPAi.**

La red se compone de genes diferencialmente expresados comparando pacientes hombres HPAi vs control (n=5). La red se construyó filtrando la base de datos publicada por Stearman et al., 2019, emparejándola con la base de datos TRRUST v2 (Han H et al., 2018), posteriormente se integró con la base de datos Recon 3D (Brunk *et al.*, 2018) y se visualizó en el software Cytoscape (Shannon et al., 2003). Las elipses verdes representan factores transcripcionales; los rombos indican genes. En amarillo los genes regulados significativamente al alza y en rosa los genes regulados significativamente a la baja. Los rectángulos azules indican el subsistema de reacciones afectadas y los rectángulos rojos la ubicación celular del subsistema.



**Figura anexa 8. Red regulación transcripcional metabólica en pacientes mujeres HPai.**

La red se compone de genes diferencialmente expresados comparando pacientes mujeres HPai vs control (n=5). La red se construyó filtrando la base de datos publicada por Stearman et al., 2019, emparejándola con la base de datos TRRUST v2 (Han H et al., 2018), posteriormente se integró con la base de datos Recon 3D (Brunk et al., 2018) y se visualizó en el software Cytoscape (Shannon et al., 2003). Las elipses verdes representan factores transcripcionales; los rombos indican genes. En amarillo los genes regulados significativamente al alza y en rosa los genes regulados significativamente a la baja. Los rectángulos azules indican el subsistema de reacciones afectadas y los rectángulos rojos la ubicación celular del subsistema.



**Figura anexa 9. E2 induce aumento en el inmunomarcaje de Ki67, indicativo de proliferación en hPASMC.** (A) Imágenes de microscopía confocal representativas de PASMC tratadas con E2 10 nM o Vehículo a 48 horas indicando inmunofluorescencia verde para Ki67 y señal azul para tinción nuclear Hoescht 33342. (B) E2 10 nM aumenta la fluorescencia nuclear de KI67 en hPASMC a 48 horas. N=4 \*p ≤ 0,05.

## 11. DISCUSIÓN ANEXA

### 11.1 RRT y metabólicas reguladas en hombres importantes para la fisiopatología de la HPAi

Para la RRTM exclusiva para hombres (**Figura anexa 7**), encontramos una red metabólica asociada a inactivación de reacciones mitocondriales, principalmente desregulación de la  $\beta$ -oxidación y aumento de vías glicolíticas. Esta RRTM se detallará y discutirá a continuación:

**A. ALPL:** Este gen regulado al alza codifica para la enzima fosfatasa alcalina asociada a procesos de biomineralización, también conocida como fosfocreatina fosfatasa. Esta fosfatasa regula diversas funciones hepáticas y celulares (Nickel *et al.*, 2021). Actualmente, no se ha descrito un rol específico en PASMC o en tejido pulmonar HPA. Los estudios más cercanos a la aproximación de HPA indican que dichos pacientes presentan colestasis hepática conllevando a elevación de los marcadores fosfatasa alcalina, CGT y bilirrubina en aproximadamente un 37% (Nickel *et al.*, 2021). Esta elevación en la fosfatasa alcalina sérica se explica principalmente porque la disfunción diastólica ventricular derecha conlleva a una congestión hepática subclínica, lo que en combinación con la enfermedad crónica renal explica este fenotipo (Ortega *et al.*, 2011; Rosenkranz *et al.*, 2020).

**B. ANPEP:** Este gen codifica para la enzima alanil aminopeptidasa de membrana. Se ha descrito que posee un efecto de amplio espectro sobre la digestión de péptidos, entre los que se destacan proteínas provenientes de la dieta y hormonas peptídicas como angiotensina III, IV, neuropéptidos y quimioquinas. Adicionalmente, se describió a ANPEP (CD13) como uno de los receptores para el coronavirus humano, el cual se encuentra sobreexpresado en la enfermedad de Parkinson (Lowe *et al.*, 2020). Adicionalmente, la disminución en su expresión se ha correlacionado con un empeoramiento en el pronóstico clínico de pacientes con cáncer prostático (Sørensen *et al.*, 2013). Finalmente, análisis bioinformáticos han presentado a ANPEP como un nodo relevante en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo II (Ding *et al.*, 2019).

**C. HK3:** Este gen codifica para la enzima hexoquinasa 3. Cataliza el paso inicial de la glicólisis mediante la fosforilación de D-glucosa a D-glucosa-6-fosfato (Palma *et al.*, 1996). Esta enzima

alostérica es inhibida por producto y adicionalmente fosforila la D-fructosa para la generación de D-fructosa-6-fosfato (Palma *et al.*, 1996). Aún no se reporta un efecto específico de HK3 en el desarrollo de HPA, pero si se ha descrito que eleva su actividad y expresión en el ventrículo derecho de ratas HP inducidas por monocrotalina (Zhang *et al.*, 2014). Adicionalmente, pacientes HPA muestran niveles elevados de HK2 (Xu, Janocha & Erzurum, 2021).

Este cambio fenotípico en la red se condice con la aparición de una reprogramación glicolítica en el tejido pulmonar de los pacientes HPAi, ya que genes y funciones ligadas a la obtención de energía por parte de OXPHOS disminuyen, como se discute a continuación en los genes regulados a la baja en la RRTM exclusiva para hombres.

**D. FABP6:** Este gen expresado a la baja codifica para la proteína ligadora de ácidos grasos 6, también conocida como gastrotropina. Su principal función descrita es el transporte intracelular de sales biliares en el intestino delgado (Harmat *et al.*, 2019). Así también, FABP6 es esencial para la sobrevivencia de células de cáncer de colon (Zhang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019). Se ha descrito adicionalmente como un marcador sérico que permite diferenciar un fenotipo HPA/insuficiencia cardíaca derecha de un fenotipo HFpEF o HFrEF (Ahmed, S., Ahmed, A., & Rådegran *et al.*, 2021). Su disminución nos estaría indicando una menor disponibilidad celular de ácidos grasos para ser utilizados en la  $\beta$ -oxidación.

En cuanto a efectos directos en HPA sobre el tejido pulmonar no se han reportado trabajos hasta la fecha de redacción de esta tesis doctoral.

**E. NT5E:** Este gen regulado a la baja en nuestra RRTM codifica para la enzima ecto 5' nucleotidasa. Su función consiste en hidrolizar los nucleótidos extracelulares en nucleósidos permeables a la membrana y es utilizado como un marcador para la diferenciación linfocitaria y se identificó como un regulador metabólico oncológico maestro (Kordaß, Osen & Eichmüller, 2018; Nevedomskaya *et al.*, 2016). Análisis *in silico* sugieren que NT5E es un nodo central estratégico en HPA que regula el fenotipo patológico y que su modulación farmacológica con ruxolitinib podría prevenir la progresión y aparición de la patología (Dong *et al.*, 2021). Adicionalmente, y considerando que los datos entregados por Stearman *et al.* (2019) provienen desde tejido completo, podemos teorizar que esta disminución en la expresión de NT5E tiene como finalidad, la estimulación de un ambiente proinflamatorio mediado por respuesta inmune que estimula la proliferación y acumulación de mutaciones. Esto por causa que la actividad de

NT5E libera adenosina libre, la que es conocida por inhibir respuestas inmunitarias (Kordaß, Osen & Eichmüller, 2018). Adicionalmente, en los datos madre de este análisis *in silico* no se describió a NT5E como un gen diferencialmente regulado en HPAi (Stearman *et al.*, 2019).

**F. ACADL:** Este gen diferencialmente regulado a la baja codifica para la enzima acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga. Cataliza el primer paso de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos mitocondriales, proceso aeróbico que descompone los ácidos grasos en acetyl-CoA. El proceso de iniciación consiste en la eliminación de un hidrógeno C2 y C3 del tioéster de acil-CoA graso de la cadena lineal, formando trans-2-enoilCoA (Nandy *et al.*, 1996; He *et al.*, 2011).

En contexto de HPA, ACADL en conjunto con la maquinaria de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos se encuentran elevados en expresión, pero dicotómicamente la oxidación global de ácidos grasos se ve reducida. Este cambio se explica principalmente pues existe una reprogramación metabólica hacia la  $\omega$ -oxidación (Liang *et al.*, 2022). Por lo que este hallazgo de ACADL a la baja pueda deberse al estadio de la patología, encontrándose aumentado en estadios tempranos de la enfermedad, pero perdiendo su expresión a medida que esta progresa. Esto pues se ha reportado que los primeros hallazgos metabólicos en HPA indicaban que la reprogramación predominante es la aparición del efecto Warburg (Culley & Chan *et al.*, 2018), lo que sigue sin descartarse; pero que a medida que se han generado nuevas y mejores técnicas de detección clínica, se nos hace posible la visualización de cambios más tempranos durante el desarrollo de la HPA.

Para complementar esta discusión, en modelos experimentales de roedores HPA tratados con SuHx se aprecia una disminución en la batería de genes que codifican para las acil-CoA deshidrogenasas (Gomez-Arroyo *et al.*, 2013). Debido a esto, para este gen en particular efectivamente es relevante el modelo y la gravedad sintomática del modelo analizado.

**G. SLC25A2F:** Este gen regulado a la baja en nuestra RRTM codifica para el transportador de ornitina mitocondrial. Entre sus funciones destacables encontramos el aumento del transporte de ornitina a la mitocondria para luego ser convertida a  $\alpha$ -cetoglutarato o glutamato y utilizarse como sustrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Xu, Janocha & Erzurum, 2021). Por otra parte, se ha descrito que una elevada actividad de la ruta sintética de ornitina depletaría las reservas de L-Arginina, impidiendo su utilización por parte de ONS para producir citrulina, agua y óxido nítrico (Kao *et al.*, 2015; Xu, Janocha & Erzurum, 2021).

En el presente contexto, la hipotética baja de suministro de un precursor como el  $\alpha$ -cetoglutarato estaría incidiendo en una menor actividad de la CTE. Esto forzaría el fenotipo patológico glicolítico en los pacientes HPAi.

**H. HPGDS:** Este gen regulado a la baja en la red de regulación transcripcional metabólica, codifica para la enzima sintasa hematopoiética de prostaglandina D. Es una enzima bifuncional que cataliza tanto la conversión de PGH<sub>2</sub> a PGD<sub>2</sub>, prostaglandina implicada en los procesos de relajación/contracción del músculo liso y además posee actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria. Adicional a la actividad vasorelajadora de PGD<sub>2</sub>, se le añade la estimulación de la resolución inflamatoria (Jia *et al.*, 2020).

En el único trabajo reportado en donde se explora el rol de HPGDS en HPA, se demostró que la inducción de su actividad mediante el uso de niacina disminuye el remodelamiento vascular pulmonar en ratones SuHx. Así también, la delección de HPGDS exacerba el fenotipo patológico HPA (Jia *et al.*, 2020).

**I. HDC:** Este gen regulado a la baja en nuestra RRTM codifica para la enzima decarboxilasa de histidina. Esta enzima cataliza la biosíntesis de histamina utilizando histidina como precursor. Esta baja en la expresión de HDC, hipotéticamente, estaría disminuyendo la respuesta inflamatoria mediada por la estimulación de macrófagos en el tejido (Hao & Whitelaw., 2013). Adicionalmente, se ha reportado en conejos, que el alza de histamina en la arteria pulmonar mediada por toxinas estaría incidiendo en la aparición de HPA (Matsuda *et al.*, 2003).

Con lo reportado, y ante la inexistencia de reportes sobre el rol de HDC en HPAi, es que este gen regulado a la baja podría ser parte de un mecanismo compensatorio que busca disminuir la inflamación crónica en el tejido pulmonar de los pacientes.

Analizando lo encontrado en la RRTM exclusiva para hombres HPAi, podemos destacar que las rutas metabólicas afectadas, muestran una disminución en la actividad mitocondrial y oxidación de ácidos grasos, como también en la disponibilidad del poder reductor celular; lo que paralelamente se contrasta con una reprogramación glicolítica y génica que conlleva a un fenotipo proliferativo tipo canceroso (**Figura anexa 7**).

## 11.2 RRT y metabólicas reguladas en mujeres importantes para la fisiopatología de la hpai

Para la RRTM exclusiva para mujeres (**Figura anexa 8**) es importante destacar que encontramos 4 nodos regulatorios. Uno que afecta el transporte extracelular; el segundo que regula metabolismo de hidratos de carbono; el tercer nodo que regula aumenta el metabolismo de piruvato; y el último en donde CFTR ve regulado al alza su expresión afectando al alza el transporte extracelular. Estos cambios en la expresión génica serán discutidos a continuación:

**A. CFTR:** Este gen codifica para el regulador de conductancia de transmembrana asociado a fibrosis quística. Media el transporte de iones cloruro a través de la membrana celular en una actividad del canal asociada a la hidrólisis de ATP (Li *et al.*, 1996).

Entre los eventos que ocurren en la patogénesis de la HPA se encuentra una reducción en la capacidad de relajación de la arteria pulmonar. CFTR se expresa en la arteria pulmonar y se ha visto que controla la relajación del músculo independiente de endotelio (Le Ribeuz *et al.*, 2021). Si bien en nuestra RRTM, CFTR se encuentra al alza, la evidencia tanto en pacientes HPAi y en ratas HP inducida con monocrotalina es que la activación de CFTR induce relajación vascular y que su expresión se encuentra fuertemente disminuida en las células musculares lisas y endoteliales de la arteria pulmonar de pacientes HPAi (Le Ribeuz *et al.*, 2021). Esto nos sugiere nuevamente, tal como ocurrió con otros genes descritos en este trabajo que ninguna red *in silico* posee un poder predictivo 100% confiable, por lo que sugiere la necesidad futura de validar los hallazgos obtenidos a través de esta metodología.

**B. SLC1A3:** Este gen regulado al alza codifica para el transportador de solutos perteneciente a la familia 1, miembro 3. También es conocido como el transportador de glutamato/aspartato. Actúa como un simportador de alta afinidad que transporta glutamato y aspartato utilizando 3 Na<sup>+</sup> y un protón (Ryan *et al.*, 2010). Se ha descrito que este transportador permite el uso de ácido aspártico para compensar la deficiencia de glutamina, otorgándole mayor resistencia a células tumorales (Tajan *et al.*, 2018). Adicionalmente, la regulación del transporte de glutamato mediado por agonistas de ERs ha mostrado ser un mecanismo protector frente a la muerte celular en modelos de privación de oxígeno, nutrientes e insultos farmacológicos (Cimarosti *et al.*, 2006; karki *et al.*, 2014; Pajarillo *et al.*, 2018). En nuestra red transcripcional metabólica se

encuentra regulado por el FT USF1 (*upstream transcription factor 1*). En modelos de adenocarcinoma de pulmón, USF1 ha mostrado incidir significativamente en la aparición y progresión del fenotipo canceroso en tejidos de pacientes, modelos celulares y animales promoviendo la supervivencia, proliferación, migración e invasión celular (Wang *et al.*, 2022).

**C. ME1:** Este gen regulado al alza en nuestra RRTM, codifica para la enzima málica 1. Esta enzima dependiente de NADP también es conocida como malato dehidrogenasa. Cataliza la descarboxilación oxidativa de malato en presencia de NADP<sup>+</sup> y iones metálicos divalentes hacia piruvato, como también la descarboxilación de oxalacetato (Simmen, Alhallak & Simmen, 2020).

La enzima málica se presenta como un marcador metabólico para estimular la glutaminólisis en insuficiencia cardíaca ventricular derecha derivada de HPA y en conjunto con un incremento de los transportadores de glutamina SLC1A5 y SLC7A5 (Piao *et al.*, 2013). Dicha proteína se encuentra elevada en pacientes HPA hereditaria (Fessel *et al.*, 2012). Esta respuesta en el tejido pulmonar de paciente HPAi se basa en que al momento de la aparición del cambio glicolítico energético, la glutaminólisis actúa como una vía alterna para la obtención de carbonos que serán utilizados en la síntesis de macromoléculas como lípidos, proteínas y purinas (Xu, Janocha & Erzurum, 2021).

**D. ENPP2:** Este gen regulado a la baja codifica para la enzima pirofosfatasa/fosfodiesterasa de ectionucleótidos 2. Hidroliza lisofosfolípidos para producir ácido lisofosfatídico (LPA) (van Meeteren *et al.*, 2005). Adicionalmente puede metabolizar la esfingosilfosforilcolina para producir esfingosina-1-fosfato (Clair *et al.*, 2003). Su actividad estimula la angiogénesis y el crecimiento neuronal en conjunto con la migración de células musculares lisas (Nam *et al.*, 2001; Gennero *et al.*, 1999). Así también su expresión se encuentra regulada por estrógenos tanto al alza como a la baja, dependiendo del modelo utilizado (Takeo *et al.*, 2009; Ahn *et al.*, 2011).

La evidencia actual indica que la pérdida de la señalización asociada a LPA promueve la remodelación vascular pulmonar en roedores, volviéndolos hipersensibles a estímulos hipóxicos y sin alterar la musculatura lisa vascular periférica, mostrando que la musculatura lisa de la arteria pulmonar responde de manera distinta, ya que la administración de LPA induce aumento en la presión arterial y remodelado vascular periférico (Cheng *et al.*, 2012).

En nuestra RRTM ENPP2 está regulado por el factor transcripcional NFATC2. Se ha reportado que este FT colabora en la aparición de un fenotipo hipertenso/canceroso en PASMC mediada por la interacción Calcineurina/NFATC2 en ratas HPA inducidas por monocrotalina (He *et al.*, 2018). Incluso, es tan relevante el rol de NFATC2 y otros miembros de su familia en la patología, que se sugiere utilizar como blanco de modulación para prevenir el remodelamiento inflamatorio y mitocondrial en HPA (Bonnet *et al.*, 2007).

## 12. REFERENCIAS

Adesina SE, Wade BE, Bijli KM, Kang BY, Williams CR, Ma J, Go YM, Hart CM, Sutliff RL. (2017). Hypoxia inhibits expression and function of mitochondrial thioredoxin 2 to promote pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 312: L599– L608. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00258.2016>.

Ahmadian, Rosstin & Sheak, Joshua & Weise-Cross, Laura & Jernigan, Nikki & Arterburn, Jeffrey & Prossnitz, Eric & Snow, Jessica & Resta, Thomas. (2020). GPER Contributes to the Development of Pulmonary Hypertension in Female Rats. *The FASEB Journal*. 34. 1-1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.07087>.

Ahmed, S., Ahmed, A., & Rådegran, G. (2021). Data on plasma tumour and metabolism related proteins' potential in differentiation of HFpEF-PH from PAH and in prognosis of left heart failure patients with pulmonary hypertension. *Data in brief*, 40, 107747. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107747>

Ahn, H. J., Yang, H., An, B. S., Choi, K. C., & Jeung, E. B. (2011). Expression and regulation of Enpp2 in rat uterus during the estrous cycle. *Journal of veterinary science*, 12(4), 379–385. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.4.379>

Akbas, G. E., Song, J., & Taylor, H. S. (2004). A HOXA10 estrogen response element (ERE) is differentially regulated by 17 beta-estradiol and diethylstilbestrol (DES). *Journal of molecular biology*, 340(5), 1013–1023. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.052>

Alencar AK, Montes GC, Montagnoli T, Silva AM, Martinez ST, Fraga AG, Wang H, Groban L, Sudo RT, Zapata-Sudo G. Activation of GPER ameliorates experimental pulmonary hypertension in male rats. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Jan 15;97:208-217. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.009>

Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C., & Shaul, Y. (2005). A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes & development*, 19(3), 316–321. <https://doi.org/10.1101/gad.319905>

Austin, E. D., Cogan, J. D., West, J. D., Hedges, L. K., Hamid, R., Dawson, E. P., ... Phillips, J. A. (2009). Alterations in oestrogen metabolism: implications for higher penetrance of familial

pulmonary arterial hypertension in females. *European Respiratory Journal*, 34(5), 1093–1099. <https://doi.org/10.1183/09031936.00010409>

Azuma, K., & Inoue, S. (2012). Genomic and non-genomic actions of estrogen: recent developments. *Biomolecular concepts*, 3(4), 365–370. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0002>

Babu, M. M., Luscombe, N. M., Aravind, L., Gerstein, M., & Teichmann, S. A. (2004). Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Current opinion in structural biology*, 14(3), 283-291.

Baird, G. L., Archer-Chicko, C., Barr, R. G., Bluemke, D. A., Foderaro, A. E., Fritz, J. S., Hill, N. S., Kawut, S. M., Klinger, J. R., Lima, J. A. C., Mullin, C. J., Ouyang, P., Palevsky, H. I., Palmisicano, A. J., Pinder, D., Preston, I. R., Roberts, K. E., Smith, K. A., Walsh, T., Whittenhall, M., ... Ventetuolo, C. E. (2018). Lower DHEA-S levels predict disease and worse outcomes in post-menopausal women with idiopathic, connective tissue disease- and congenital heart disease-associated pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*, 51(6), 1800467. <https://doi.org/10.1183/13993003.00467-2018>

Barnes, E. A., Chen, C. H., Sedan, O., & Cornfield, D. N. (2017). Loss of smooth muscle cell hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  underlies increased vascular contractility in pulmonary hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(2), 650–662. <https://doi.org/10.1096/fj.201600557R>

Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>

Blizzard, T. A., Gude, C., Chan, W., Birzin, E. T., Mojena, M., Tudela, C., Chen, F., Knecht, K., Su, Q., Kraker, B., Holmes, M. A., Rohrer, S. P., & Hammond, M. L. (2007). Bridged androstenediol analogs as ER-beta selective SERMs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(10), 2944–2948. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.053>

Boér K. (2017). Fulvestrant in advanced breast cancer: evidence to date and place in therapy. *Therapeutic advances in medical oncology*, 9(7), 465–479. <https://doi.org/10.1177/1758834017711097>

Bonnet, S., Michelakis, E. D., Porter, C. J., Andrade-Navarro, M. A., Thébaud, B., Bonnet, S., Haromy, A., Harry, G., Moudgil, R., McMurtry, M. S., Weir, E. K., & Archer, S. L. (2006). An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 113(22), 2630–2641. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008>

Bonnet, S., Rochefort, G., Sutendra, G., Archer, S. L., Haromy, A., Webster, L., Hashimoto, K., Bonnet, S. N., & Michelakis, E. D. (2007). The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11418–11423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610467104>

Bravo-sagua, R., Albornoz, F., Latorre G., Mera C., Navarro M., Pennanen C., Rodriguez A., Silva n., Troncoso R., Parra V., Cartes-Saavedra B., López-crisosto, C., Morales P., Oyarzún A., Quiroga C., Rodríguez-peña, M., Torrealba N. (2016). LIBRO DE PROCEDIMIENTOS v5. Cultivo, S. D. E. (n.d.), 6-23.

Broquet, A. H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G., & Bachelet, M. (2003). Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21601–21606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302326200>

Brunk E, Sahoo S, Zielinski DC, Altunkaya A, Dräger A, Mih N, Gatto F, Nilsson A, Preciat Gonzalez GA, Aurich MK, Prlić A, Sastry A, Danielsdottir AD, Heinken A, Noronha A, Rose PW, Burley SK, Fleming RMT, Nielsen J, Thiele I, Palsson BO. (2018) Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. *Nat Biotechnol*. Mar;36(3):272-281. <https://doi.org/10.1038/nbt.4072>.

Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang CH, Sanin DE, Qiu J, Kretz O, Braas D, van der Windt GJ, Chen Q, Huang SC, O'Neill CM, Edelson BT, Pearce EJ, Sesaki H, Huber TB, Rambold AS, Pearce EL. (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*. Jun 30;166(1):63-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035>

- Bull, T. M., Coldren, C. D., Moore, M., Sotto-Santiago, S. M., Pham, D. V., Nana-Sinkam, S. P., Voelkel, N. F., & Geraci, M. W. (2004). Gene microarray analysis of peripheral blood cells in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 170(8), 911–919. <https://doi.org/10.1164/rccm.200312-1686OC>
- Burenina, O. Y., Oretskaya, T. S., & Kubareva, E. A. (2017). Non-Coding RNAs As Transcriptional Regulators In Eukaryotes. *Acta naturae*, 9(4), 13–25.
- Cai, Y., Yan, L., Kiehl, M. J., Cogan, J. D., Hedges, L. K., Nunley, B., West, J., Austin, E. D., & Hamid, R. (2021). TBX4 Transcription Factor Is a Positive Feedback Regulator of Itself and Phospho-SMAD1/5. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 64(1), 140–143. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0331LE>
- Carlson R. W. (2005). The history and mechanism of action of fulvestrant. *Clinical breast cancer*, 6 Suppl 1, S5–S8. <https://doi.org/10.3816/cbc.2005.s.008>
- Castro-Rivera, E., Samudio, I., & Safe, S. (2001). Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), 30853–30861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103339200>
- Chen, S., Knox, R., Wu, K., Deng, P. S., Zhou, D., Bianchet, M. A., & Amzel, L. M. (1997). Molecular basis of the catalytic differences among DT-diaphorase of human, rat, and mouse. *The Journal of biological chemistry*, 272(3), 1437–1439. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1437>
- Chen, Z., Liu, M., Li, L., & Chen, L. (2017). Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes. *Journal of Cellular Physiology*, 233. <https://doi.org/10.1002/jcp.25998>
- Cheng, H. Y., Dong, A., Panchatcharam, M., Mueller, P., Yang, F., Li, Z., Mills, G., Chun, J., Morris, A. J., & Smyth, S. S. (2012). Lysophosphatidic acid signaling protects pulmonary vasculature from hypoxia-induced remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(1), 24–32. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.234708>
- Cheng, Y., Chang, L. W., Cheng, L. C., Tsai, M. H., & Lin, P. (2007). 4-Methoxyestradiol-induced oxidative injuries in human lung epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(3), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.024>

Chiappetta, C., Kirkland, J. L., Loose-Mitchell, D. S., Murthy, L., & Stancel, G. M. (1992). Estrogen regulates expression of the jun family of protooncogenes in the uterus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 41(2), 113–123. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90037-j](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90037-j)

Christou, H., Michael, Z., Spyropoulos, F., Chen, Y., Rong, D., & Khalil, R. A. (2021). Carbonic anhydrase inhibition improves pulmonary artery reactivity and nitric oxide-mediated relaxation in sugen-hypoxia model of pulmonary hypertension. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 320(6), R835–R850. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00362.2020>

Cimarosti, H., O'Shea, R. D., Jones, N. M., Horn, A. P., Simão, F., Zamin, L. L., Nassif, M., Frozza, R., Netto, C. A., Beart, P. M., & Salbego, C. (2006). The effects of estradiol on estrogen receptor and glutamate transporter expression in organotypic hippocampal cultures exposed to oxygen--glucose deprivation. *Neurochemical research*, 31(4), 483–490. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9043-9>

Clair, T., Aoki, J., Koh, E., Bandle, R. W., Nam, S. W., Ptaszynska, M. M., Mills, G. B., Schiffmann, E., Liotta, L. A., & Stracke, M. L. (2003). Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer research*, 63(17), 5446–5453.

Clark, J. A., Alves, S., Gundlach, C., Rocha, B., Birzin, E. T., Cai, S. J., Flick, R., Hayes, E., Ho, K., Warriar, S., Pai, L., Yudkovitz, J., Fleischer, R., Colwell, L., Li, S., Wilkinson, H., Schaeffer, J., Wilkening, R., Mattingly, E., Hammond, M., ... Rohrer, S. P. (2012). Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim test. *Neuropharmacology*, 63(6), 1051–1063. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.004>

Colvin KL, Yeager ME. (2014). Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease. *J Pulm Respir Med*. Aug 4;4(4):198. <https://doi.org/10.4172/2161-105X.1000198>

Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaría, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M., & Reed, J. C. (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer research*, 62(22), 6674–6681

Cui, S., Wu, Q., West, J., & Bai, J. (2019). Machine learning-based microarray analyses indicate low-expression genes might collectively influence PAH disease. *PLoS computational biology*, 15(8), e1007264. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007264>

Culley, M. K., & Chan, S. Y. (2018). Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: Beyond mountains there are mountains.. *Journal of Clinical Investigation*, 128(9), 3704–3715. <https://doi.org/10.1172/JCI120847>

Cullivan, S., Lennon, D., Meghani, S., Minnock, C., McCullagh, B., & Gaine, S. (2022). Incidence and outcomes of pulmonary hypertension in the Ireland. *BMJ open respiratory research*, 9(1), e001272. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2022-001272>

Cunningham, C. M., Li, M., Ruffenach, G., Doshi, M., Aryan, L., Hong, J., Park, J., Hrcir, H., Medzikovic, L., Umar, S., Arnold, A. P., & Eghbali, M. (2022). Y-Chromosome Gene, Uty, Protects Against Pulmonary Hypertension by Reducing Proinflammatory Chemokines. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 206(2), 186–196. <https://doi.org/10.1164/rccm.202110-2309OC>

D'Alessandro, A., El Kasmi, K. C., Plecítá-Hlavatá, L., Ježek, P., Li, M., Zhang, H., Gupte, S. A., & Stenmark, K. R. (2018). Hallmarks of Pulmonary Hypertension: Mesenchymal and Inflammatory Cell Metabolic Reprogramming. *Antioxidants & redox signaling*, 28(3), 230–250. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7217>

Damdimopoulos, A. E., Miranda-Vizuete, A., Treuter, E., Gustafsson, J. A., & Spyrou, G. (2004). An alternative splicing variant of the selenoprotein thioredoxin reductase is a modulator of estrogen signaling. *The Journal of biological chemistry*, 279(37), 38721–38729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402753200>

Dammeyer, P., Damdimopoulos, A. E., Nordman, T., Jiménez, A., Miranda-Vizuete, A., & Arnér, E. S. (2008). Induction of cell membrane protrusions by the N-terminal glutaredoxin domain of a rare splice variant of human thioredoxin reductase 1. *The Journal of biological chemistry*, 283(5), 2814–2821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708939200>

- de Jesus Perez V. A. (2011). Making sense of the estrogen paradox in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184(6), 629–630. <https://doi.org/10.1164/rccm.201107-1184ED>
- Del Campo, A., Perez, G., Castro, P. F., Parra, V., & Verdejo, H. E. (2021). Mitochondrial function, dynamics and quality control in the pathophysiology of HFpEF. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(10), 166208. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166208>
- Diaz-Vegas, A., Sanchez-Aguilera, P., Krycer, J. R., Morales, P. E., Monsalves-Alvarez, M., Cifuentes, M., Rothermel, B. A., & Lavandero, S. (2020). Is Mitochondrial Dysfunction a Common Root of Noncommunicable Chronic Diseases?. *Endocrine reviews*, 41(3), bnaa005. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa005>
- Ding, L., Fan, L., Xu, X., Fu, J., & Xue, Y. (2019). Identification of core genes and pathways in type 2 diabetes mellitus by bioinformatics analysis. *Molecular medicine reports*, 20(3), 2597–2608. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10522>
- Dodson, M. W., Brown, L. M., & Elliott, C. G. (2018). Pulmonary Arterial Hypertension. *Heart Failure Clinics*, 14(3), 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2018.02.003>
- Dong, H., Li, X., Cai, M., Zhang, C., Mao, W., Wang, Y., Xu, Q., Chen, M., Wang, L., & Huang, X. (2021). Integrated bioinformatic analysis reveals the underlying molecular mechanism of and potential drugs for pulmonary arterial hypertension. *Aging*, 13(10), 14234–14257. <https://doi.org/10.18632/aging.203040>
- Dorn, G. W., 2nd, Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2015). Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes & development*, 29(19), 1981–1991. <https://doi.org/10.1101/gad.269894.115>
- Dubroff, J., Melendres, L., Lin, Y., Beene, D. R., & Ketai, L. (2020). High geographic prevalence of pulmonary artery hypertension: associations with ethnicity, drug use, and altitude. *Pulmonary circulation*, 10(1), 2045894019894534. <https://doi.org/10.1177/2045894019894534>

Dumas de la Roque, E., Savineau, J. P., & Bonnet, S. (2010). Dehydroepiandrosterone: A new treatment for vascular remodeling diseases including pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & therapeutics*, 126(2), 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.02.003>

Dumas de La Roque, E., Savineau, J. P., Metivier, A. C., Billes, M. A., Kraemer, J. P., Doutreleau, S., Jougon, J., Marthan, R., Moore, N., Fayon, M., Baulieu, E. É., & Dromer, C. (2012). Dehydroepiandrosterone (DHEA) improves pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a pilot study. *Annales d'endocrinologie*, 73(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.12.005>

Dunham-Snary, K. J., Wu, D., Sykes, E. A., Thakrar, A., Parlow, L. R. G., Mewburn, J. D., Parlow, J. L., & Archer, S. L. (2017). Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest*, 151(1), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.09.001>

Durante W. (2020). Targeting Heme Oxygenase-1 in the Arterial Response to Injury and Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(9), 829. <https://doi.org/10.3390/antiox9090829>

Eddahibi, S., Chaouat, A., Tu, L., Chouaid, C., Weitzenblum, E., Housset, B., Maitre, B., & Adnot, S. (2006). Interleukin-6 gene polymorphism confers susceptibility to pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(6), 475–476. <https://doi.org/10.1513/pats.200603-038MS>

Eliassen, A. H., Spiegelman, D., Xu, X., Keefer, L. K., Veenstra, T. D., Barbieri, R. L., ... Ziegler, R. G. (2012). Urinary estrogens and estrogen metabolites and subsequent risk of breast cancer among premenopausal women. *Cancer Research*, 72(3), 696–706. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2507>

Felty, Q., & Roy, D. (2005). Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *Journal of carcinogenesis*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-4-1>

Fessel, J. P., Hamid, R., Wittmann, B. M., Robinson, L. J., Blackwell, T., Tada, Y., Tanabe, N., Tatsumi, K., Hemnes, A. R., & West, J. D. (2012). Metabolomic analysis of bone morphogenetic protein receptor type 2 mutations in human pulmonary endothelium reveals widespread metabolic reprogramming. *Pulmonary circulation*, 2(2), 201–213. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.97606>

Figueira TR, Melo DR, Vercesi AE, Castilho RF. (2012). Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol Biol.* 810:103-17. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_7).

Fu, L., Zhang, H., Ong'achwa Machuki, J., Zhang, T., Han, L., Sang, L., Wu, L., Zhao, Z., James Turley, M., Hu, X., Hou, H., Li, D., E Harding, S., & Sun, H. (2021). GPER mediates estrogen cardioprotection against epinephrine-induced stress. *The Journal of endocrinology*, 249(3), 209–222. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0451>

Fulton, D. J. R., Li, X., Bordan, Z., Haigh, S., Bentley, A., Chen, F., & Barman, S. A. (2017). Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Development of Pulmonary Hypertension. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 6(3), 54. <https://doi.org/10.3390/antiox6030054>

Gaskill, C., Marriott, S., Pratap, S., Menon, S., Hedges, L. K., Fessel, J. P., Kropski, J. A., Ames, D., Wheeler, L., Loyd, J. E., Hemnes, A. R., Roop, D. R., Klemm, D. J., Austin, E. D., & Majka, S. M. (2016). Shared gene expression patterns in mesenchymal progenitors derived from lung and epidermis in pulmonary arterial hypertension: identifying key pathways in pulmonary vascular disease. *Pulmonary circulation*, 6(4), 483–497. <https://doi.org/10.1086/688314>

Gennero, I., Xuereb, J. M., Simon, M. F., Girolami, J. P., Bascands, J. L., Chap, H., Boneu, B., & Sié, P. (1999). Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and cytosolic Ca<sup>++</sup> of human adult vascular smooth muscle cells in culture. *Thrombosis research*, 94(5), 317–326. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(99\)00004-3](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(99)00004-3)

Ghouleh IA, Sahoo S, Meijles DN, Amaral JH, de Jesus DS, Sembrat J, Rojas M, Goncharov DA, Goncharova EA, Pagano PJ. (2017). Endothelial Nox1 oxidase assembly in human pulmonary arterial hypertension; driver of Gremlin1-mediated proliferation. *Clin Sci (Lond)* 131: 2019–2035. <https://doi.org/10.1042/CS20160812>.

Gomez-Arroyo, J., Mizuno, S., Szczepanek, K., Van Tassell, B., Natarajan, R., dos Remedios, C. G., Drake, J. I., Farkas, L., Kraskauskas, D., Wijesinghe, D. S., Chalfant, C. E., Bigbee, J., Abbate, A., Lesnefsky, E. J., Bogaard, H. J., & Voelkel, N. F. (2013). Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to

pulmonary arterial hypertension. *Circulation. Heart failure*, 6(1), 136–144. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.966127>

Goncharov, D. A., Kudryashova, T. V., Ziai, H., Ihida-Stansbury, K., DeLisser, H., Krymskaya, V. P., Tuder, R. M., Kawut, S. M., & Goncharova, E. A. (2014). Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) coordinates pulmonary artery smooth muscle cell metabolism, proliferation, and survival in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 129(8), 864–874. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004581>

Gorr, M. W., Sriram, K., Muthusamy, A., & Insel, P. A. (2020). Transcriptomic analysis of pulmonary artery smooth muscle cells identifies new potential therapeutic targets for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *British journal of pharmacology*, 177(15), 3505–3518. <https://doi.org/10.1111/bph.15074>

Gozzelino, R., Jeney, V., & Soares, M. P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 323–354. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600>

Gromova, I., Gromov, P., Honma, N., Kumar, S., Rimm, D., Talman, M. L., Wielenga, V. T., & Moreira, J. M. (2015). High level PHGDH expression in breast is predominantly associated with keratin 5-positive cell lineage independently of malignancy. *Molecular oncology*, 9(8), 1636–1654. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.05.003>

Guajardo-Correa, E., Silva-Agüero, J. F., Calle, X., Chiong, M., Henríquez, M., García-Rivas, G., Latorre, M., & Parra, V. (2022). Estrogen signaling as a bridge between the nucleus and mitochondria in cardiovascular diseases. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 968373. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.968373>

Guignabert, C., Tu, L., Le Hiress, M., Ricard, N., Sattler, C., Seferian, A., Huertas, A., Humbert, M., & Montani, D. (2013). Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 22(130), 543–551. <https://doi.org/10.1183/09059180.00007513>

Guo, Z. Y., Hao, X. H., Tan, F. F., Pei, X., Shang, L. M., Jiang, X. L., & Yang, F. (2011). The elements of human cyclin D1 promoter and regulation involved. *Clinical epigenetics*, 2(2), 63–76. <https://doi.org/10.1007/s13148-010-0018-y>

- Guryanova, O. A., Drazba, J. A., Frolova, E. I., & Chumakov, P. M. (2011). Actin cytoskeleton remodeling by the alternatively spliced isoform of PDLIM4/RIL protein. *The Journal of biological chemistry*, 286(30), 26849–26859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241554>
- Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(10), 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
- Han H, Cho JW, Lee S, Yun A, Kim H, Bae D, Yang S, Kim CY, Lee M, Kim E, Lee S, Kang B, Jeong D, Kim Y, Jeon HN, Jung H, Nam S, Chung M, Kim JH, Lee I. (2018). TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res. Jan 4;46(D1):D380-D386*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1013>.
- Hao, N., & Whitelaw, M. L. (2013). The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochemical pharmacology*, 86(5), 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.004>
- Hassoun, P. M., Mouthon, L., Barberà, J. A., Eddahibi, S., Flores, S. C., Grimminger, F., Jones, P. L., Maitland, M. L., Michelakis, E. D., Morrell, N. W., Newman, J. H., Rabinovitch, M., Schermuly, R., Stenmark, K. R., Voelkel, N. F., Yuan, J. X., & Humbert, M. (2009). Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(1 Suppl), S10–S19. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.006>
- He, M., Pei, Z., Mohsen, A. W., Watkins, P., Murdoch, G., Van Veldhoven, P. P., Ensenauer, R., & Vockley, J. (2011). Identification and characterization of new long chain acyl-CoA dehydrogenases. *Molecular genetics and metabolism*, 102(4), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.12.005>
- He, R. L., Wu, Z. J., Liu, X. R., Gui, L. X., Wang, R. X., & Lin, M. J. (2018). Calcineurin/NFAT Signaling Modulates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration and Apoptosis in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 49(1), 172–189. <https://doi.org/10.1159/000492852>
- Hemnes, A. R., & Humbert, M. (2017). Pathobiology of pulmonary arterial hypertension: Understanding the roads less travelled. *European Respiratory Review*, 26(146). <https://doi.org/10.1183/16000617.0093-2017>

Hernansanz-Agustín, P., & Enríquez, J. A. (2021). Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(3), 415. <https://doi.org/10.3390/antiox10030415>

Heyes, N., Kapoor, P., & Kerr, I. D. (2018). Polymorphisms of the Multidrug Pump ABCG2: A Systematic Review of Their Effect on Protein Expression, Function, and Drug Pharmacokinetics. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 46(12), 1886–1899. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083030>

Hodges, Y. K., Tung, L., Yan, X. D., Graham, J. D., Horwitz, K. B., & Horwitz, L. D. (2000). Estrogen receptors alpha and beta: prevalence of estrogen receptor beta mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation*, 101(15), 1792–1798. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.15.1792>

Hu, Q., Li, S., Chen, C., Zhu, M., Chen, Y., & Zhao, Z. (2017). 17 $\beta$ -Estradiol treatment drives Sp1 to upregulate MALAT-1 expression and epigenetically affects physiological processes in U2OS cells. *Molecular medicine reports*, 15(3), 1335–1342. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6115>

Hudalla, H., Michael, Z., Christodoulou, N., Willis, G. R., Fernandez-Gonzalez, A., Filatava, E. J., Dieffenbach, P., Fredenburgh, L. E., Stearman, R. S., Geraci, M. W., Kourembanas, S., & Christou, H. (2019). Carbonic Anhydrase Inhibition Ameliorates Inflammation and Experimental Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 61(4), 512–524. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0232OC>

Hyder, S. M., Nawaz, Z., Chiappetta, C., Yokoyama, K., & Stancel, G. M. (1995). The protooncogene c-jun contains an unusual estrogen-inducible enhancer within the coding sequence. *The Journal of biological chemistry*, 270(15), 8506–8513. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8506>

Jia, D., Bai, P., Wan, N., Liu, J., Zhu, Q., He, Y., Chen, G., Wang, J., Chen, H., Wang, C., Lyu, A., Lazarus, M., Su, Y., Urade, Y., Yu, Y., Zhang, J., & Shen, Y. (2020). Niacin Attenuates Pulmonary Hypertension Through H-PGDS in Macrophages. *Circulation research*, 127(10), 1323–1336. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316784>

- Kabakov AE, Gabai VL. (2018). Cell Death and Survival Assays. *Methods Mol Biol.* 1709:119. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9)
- Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., & Wang, Z.-Y. (2010). Involvement of Estrogen Receptor Variant ER- $\alpha$ 36, Not GPR30, in Nongenomic Estrogen Signaling. *Molecular Endocrinology*, 24(4), 709–721. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0317>
- Kang, Y., Zhang, G., Huang, E. C., Huang, J., Cai, J., Cai, L., Wang, S., & Keller, B. B. (2020). Sulforaphane prevents right ventricular injury and reduces pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 318(4), H853–H866. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00321.2019>
- Kao, C. C., Wedes, S. H., Hsu, J. W., Bohren, K. M., Comhair, S. A., Jahoor, F., & Erzurum, S. C. (2015). Arginine metabolic endotypes in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*, 5(1), 124–134. <https://doi.org/10.1086/679720>
- Karahalil B. (2016). Overview of Systems Biology and Omics Technologies. *Current medicinal chemistry*, 23(37), 4221–4230. <https://doi.org/10.2174/09298673233666160926150617>
- Karakas, B., Aka, Y., Giray, A., Temel, S. G., Acikbas, U., Basaga, H., Gul, O., & Kutuk, O. (2021). Mitochondrial estrogen receptors alter mitochondrial priming and response to endocrine therapy in breast cancer cells. *Cell death discovery*, 7(1), 189. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00573-2>
- Karki, P., Webb, A., Zerguine, A., Choi, J., Son, D. S., & Lee, E. (2014). Mechanism of raloxifene-induced upregulation of glutamate transporters in rat primary astrocytes. *Glia*, 62(8), 1270–1283. <https://doi.org/10.1002/glia.22679>
- Kauffman, M. E., Kauffman, M. K., Traore, K., Zhu, H., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)*, 2(5), 361–370. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>
- Kawut, S. M., Pinder, D., Al-Naamani, N., McCormick, A., Palevsky, H. I., Fritz, J., Smith, K. A., Mazurek, J. A., Doyle, M. F., MacLean, M. R., DeMichele, A., & Mankoff, D. A. (2019). Fulvestrant for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Annals of the American Thoracic Society*, 16(11), 1456–1459. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201904-328RL>

- Klein, E. A., & Assoian, R. K. (2008). Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *Journal of cell science*, 121(Pt 23), 3853–3857. <https://doi.org/10.1242/jcs.039131>
- Klinge C. M. (2020). Estrogenic control of mitochondrial function. *Redox biology*, 31, 101435. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101435>
- Klinge, C. M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(6), 1342– 1351. <https://doi.org/10.1002/jcb.21936>
- Klinge, C. M. (2017). Estrogens regulate life and death in mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49(4), 307– 324. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9704-1>
- Kordaß, T., Osen, W., & Eichmüller, S. B. (2018). Controlling the Immune Suppressor: Transcription Factors and MicroRNAs Regulating CD73/NT5E. *Frontiers in immunology*, 9, 813. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00813>
- Kurosawa, R., Satoh, K., Kikuchi, N., Kikuchi, H., Saigusa, D., Al-Mamun, M. E., Siddique, M. A. H., Omura, J., Satoh, T., Sunamura, S., Nogi, M., Numano, K., Miyata, S., Uruno, A., Kano, K., Matsumoto, Y., Doi, T., Aoki, J., Oshima, Y., Yamamoto, M., ... Shimokawa, H. (2019). Identification of Celastramycin as a Novel Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation research*, 125(3), 309–327. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315229>
- Labrie F. (2006). Future perspectives of selective estrogen receptor modulators used alone and in combination with DHEA. *Endocrine-related cancer*, 13(2), 335–355. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00883>
- Lakshmanan, I., & Batra, S. K. (2013). Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio-protocol*, 3(6), e374. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.374>
- Lan, N., Massam, B., Kulkarni, S., & Lang, C. (2018). Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*, 6(2), 38. <https://doi.org/10.3390/diseases6020038>
- Lang, I. M., & Palazzini, M. (2019). The burden of comorbidities in pulmonary arterial hypertension. *European heart journal supplements : journal of the European Society of Cardiology*, 21(Suppl K), K21–K28. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/suz205>

Le Ribeuz, H., To, L., Ghigna, M. R., Martin, C., Nagaraj, C., Dreano, E., Rucker-Martin, C., Girerd, B., Bouligand, J., Pechoux, C., Lambert, M., Boet, A., Issard, J., Mercier, O., Hoetzenecker, K., Manoury, B., Becq, F., Burgel, P. R., Cottart, C. H., Olschewski, A., Sermet-Gaudelus, I., Perros, F., Humbert, M., Montani, D., Antigny, F. (2021). Involvement of CFTR in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*, 58(5), 2000653. <https://doi.org/10.1183/13993003.00653-2020>

Lee, C. H., Su, S. C., Chiang, C. F., Chien, C. Y., Hsu, C. C., Yu, T. Y., Huang, S. M., Shieh, Y. S., Kao, H. W., Tsai, C. S., Hung, Y. J., & Lin, C. Y. (2017). Estrogen modulates vascular smooth muscle cell function through downregulation of SIRT1. *Oncotarget*, 8(66), 110039–110051. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22546>

Leopold JA, Maron BA. (2016). Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Int J Mol Sci* 17: 761. <https://doi.org/10.3390/ijms17050761>.

Li, C., Ramjeesingh, M., Wang, W., Garami, E., Hewryk, M., Lee, D., Rommens, J. M., Galley, K., & Bear, C. E. (1996). ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of biological chemistry*, 271(45), 28463–28468. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28463>

Li, F., Zhu, W., & Gonzalez, F. J. (2017). Potential role of CYP1B1 in the development and treatment of metabolic diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 178, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.007>

Li, M., Wu, C., Yang, Y., Zheng, M., Yu, S., Wang, J., Chen, L., & Li, H. (2021). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase: a potential target for cancer treatment. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 44(3), 541–556. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00599-9>

Liang X, Xu S, Zhang J, Li J, Shen Q. (2018). Cascade Amplifiers of Intracellular Reactive Oxygen Species Based on Mitochondria- Targeted Core-Shell ZnO-TPP@D/H Nanorods for Breast Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. Nov 14;10(45):38749- 38759. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b12590>

Liang, S., Yegambaram, M., Wang, T., Wang, J., Black, S. M., & Tang, H. (2022). Mitochondrial Metabolism, Redox, and Calcium Homeostasis in Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomedicines*, 10(2), 341. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020341>

- Liao, T. L., Tzeng, C. R., Yu, C. L., Wang, Y. P., & Kao, S. H. (2015). Estrogen receptor- $\beta$  in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1350(1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/nyas.12872>
- Lightning, L. K., Huang, H., Moenne-Loccoz, P., Loehr, T. M., Schuller, D. J., Poulos, T. L., & de Montellano, P. R. (2001). Disruption of an active site hydrogen bond converts human heme oxygenase-1 into a peroxidase. *The Journal of biological chemistry*, 276(14), 10612–10619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010349200>
- Lin, W., Tang, Y., Zhang, M., Liang, B., Wang, M., Zha, L., & Yu, Z. (2022). Integrated Bioinformatic Analysis Reveals TXNRD1 as a Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Frontiers in medicine*, 9, 894584. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.894584>
- Liu, P., Gu, Y., Luo, J., Ye, P., Zheng, Y., Yu, W., & Chen, S. (2019). Inhibition of Src activation reverses pulmonary vascular remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension via Akt/mTOR/HIF-1 signaling pathway. *Experimental cell research*, 380(1), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.022>
- Lowes, H., Robertson, F., Pyle, A., Hussain, R., Coxhead, J., Jane Yarnall, A., Burn, D., Payne, B. A. I., Santibanez-Koref, M., & Hudson, G. (2020). The Human Coronavirus Receptor ANPEP (CD13) Is Overexpressed in Parkinson's Disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 35(12), 2134–2136. <https://doi.org/10.1002/mds.28354>
- Luo, J., Li, H., Liu, Z., Li, C., Wang, R., Fang, J., Lu, S., Guo, J., Zhu, X., & Wang, X. (2020). Integrative analyses of gene expression profile reveal potential crucial roles of mitotic cell cycle and microtubule cytoskeleton in pulmonary artery hypertension. *BMC medical genomics*, 13(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00740-x>
- M. R., DeMichele, A., & Mankoff, D. A. (2019). Fulvestrant for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Annals of the American Thoracic Society*, 16(11), 1456–1459. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201904-328RL>
- M.C Chu, D.O Cermik, H.S Taylor. (2001). Estrogen induces HOXA10 expression and HOXA10 upregulates p53 in human breast cancer. *Fertility and Sterility*, 76(3),1-38. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02130-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02130-6).

Ma, C., Wang, X., He, S., Zhang, L., Bai, J., Qu, L., Qi, J., Zheng, X., Zhu, X., Mei, J., Guan, X., Yuan, H., & Zhu, D. (2022). Ubiquitinated AIF is a major mediator of hypoxia-induced mitochondrial dysfunction and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Cell & bioscience*, 12(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00744-3>

Maarman GJ, Lecour S. (2021). Melatonin against pulmonary arterial hypertension: is it ready for testing in patients? *Cardiovasc J Afr.* Mar-Apr;32(2):111-112. <https://doi.org/10.5830/CVJA-2021-008>

Maggiolini, M., & Picard, D. (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *Journal of Endocrinology*, 204(2), 105–114. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0242>

Mair, K. M., Johansen, A. K. Z., Wright, A. F., Wallace, E., & Maclean, M. R. (2014). Pulmonary arterial hypertension: Basis of sex differences in incidence and treatment response. *British Journal of Pharmacology*, 171(3), 567–579. <https://doi.org/10.1111/bph.12281>

Mair, K. M., Yang, X. D., Long, L., White, K., Wallace, E., Ewart, M. A., Docherty, C. K., Morrell, N. W., & MacLean, M. R. (2015). Sex affects bone morphogenetic protein type II receptor signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(6), 693–703. <https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1802OC>

Manolaridis, I., Jackson, S. M., Taylor, N. M. I., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2018). Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature*, 563(7731), 426–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0680-3>

Maron, B. A., & Galiè, N. (2016). Diagnosis, Treatment, and Clinical Management of Pulmonary Arterial Hypertension in the Contemporary Era: A Review. *JAMA cardiology*, 1(9), 1056–1065. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2016.4471>

Matsuda, N., Hattori, Y., Zhang, X. H., Fukui, H., Kemmotsu, O., & Gando, S. (2003). Contractions to histamine in pulmonary and mesenteric arteries from endotoxemic rabbits: modulation by vascular expressions of inducible nitric-oxide synthase and histamine H1-receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307(1), 175–181. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054163>

- Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan;23(1):74-88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Mattingly, K. A., Ivanova, M. M., Riggs, K. A., Wickramasinghe, N. S., Barch, M. J., & Klinge, C. M. (2008). Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(3), 609–622. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0029>
- McCafferty, M. P., McNeill, R. E., Miller, N., & Kerin, M. J. (2009). Interactions between the estrogen receptor, its cofactors and microRNAs in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 116(3), 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0429-7>
- McDevitt, M. A., Glidewell-Kenney, C., Jimenez, M. A., Ahearn, P. C., Weiss, J., Jameson, J. L., & Levine, J. E. (2008). New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: Evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.003>
- Medina-Carmona, E., Neira, J. L., Salido, E., Fuchs, J. E., Palomino-Morales, R., Timson, D. J., & Pey, A. L. (2017). Site-to-site interdomain communication may mediate different loss-of-function mechanisms in a cancer-associated NQO1 polymorphism. *Scientific reports*, 7, 44532. <https://doi.org/10.1038/srep44532>
- Metcalf, S., Petri, B. J., Kruer, T., Green, B., Dougherty, S., Wittliff, J. L., Klinge, C. M., & Clem, B. F. (2021). Serine synthesis influences tamoxifen response in ER+ human breast carcinoma. *Endocrine-related cancer*, 28(1), 27–37. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0510>
- Mittal, M., Roth, M., König, P., Hofmann, S., Dony, E., Goyal, P., Selbitz, A. C., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Kwapiszewska, G., Kummer, W., Klepetko, W., Hoda, M. A., Fink, L., Hänze, J., Seeger, W., Grimminger, F., Schmidt, H. H., & Weissmann, N. (2007). Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circulation research*, 101(3), 258–267. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.148015>
- Mullarky, E., Mattaini, K. R., Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Locasale, J. W. (2011). PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 24(6), 1112–1115. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00919.x>

Murphy M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

Naftolin, F., MacLusky, N. J., Leranath, C. Z., Sakamoto, H. S., & Garcia-Segura, L. M. (1988). The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues. *Journal of steroid biochemistry*, 30(1-6), 195–207. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(88\)90093-3](https://doi.org/10.1016/0022-4731(88)90093-3)

Nagai, S., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Shiba, S., Nagasawa, S., Takeda, S., & Inoue, S. (2016). Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 480(4), 758–764. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.129>

Nagy, B. M., Nagaraj, C., Egemnazarov, B., Kwapiszewska, G., Stauber, R. E., Avian, A., Olschewski, H., & Olschewski, A. (2017). Lack of ABCG2 Leads to Biventricular Dysfunction and Remodeling in Response to Hypoxia. *Frontiers in physiology*, 8, 98. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00098>

Nam, S. W., Clair, T., Kim, Y. S., McMarlin, A., Schiffmann, E., Liotta, L. A., & Stracke, M. L. (2001). Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer research*, 61(18), 6938–6944.

Nandy, A., Kieweg, V., Kräutle, F. G., Vock, P., Küchler, B., Bross, P., Kim, J. J., Rasched, I., & Ghisla, S. (1996). Medium-long-chain chimeric human Acyl-CoA dehydrogenase: medium-chain enzyme with the active center base arrangement of long-chain Acyl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry*, 35(38), 12402–12411. <https://doi.org/10.1021/bi960785e>

Nevedomskaya, E., Perryman, R., Solanki, S., Syed, N., Mayboroda, O. A., & Keun, H. C. (2016). A Systems Oncology Approach Identifies NT5E as a Key Metabolic Regulator in Tumor Cells and Modulator of Platinum Sensitivity. *Journal of proteome research*, 15(1), 280–290. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00793>

Nickel, N. P., Galura, G. M., Zuckerman, M. J., Hakim, M. N., Alkhateeb, H., Mukherjee, D., Austin, E. D., & Heresi, G. A. (2021). Liver abnormalities in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*, 11(4), 20458940211054304. <https://doi.org/10.1177/20458940211054304>

Nisimoto, Y., Diebold, B. A., Cosentino-Gomes, D., & Lambeth, J. D. (2014). Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry*, 53(31), 5111–5120. <https://doi.org/10.1021/bi500331y>

Niță, A. R., Knock, G. A., & Heads, R. J. (2021). Signalling mechanisms in the cardiovascular protective effects of estrogen: With a focus on rapid/membrane signalling. *Current research in physiology*, 4, 103–118. <https://doi.org/10.1016/j.crphys.2021.03.003>

O'Connor, L., Gilmour, J., & Bonifer, C. (2016). The Role of the Ubiquitously Expressed Transcription Factor Sp1 in Tissue-specific Transcriptional Regulation and in Disease. *The Yale journal of biology and medicine*, 89(4), 513–525.

Oo, P. S., Yamaguchi, Y., Sawaguchi, A., Tin Htwe Kyaw, M., Chojookhuu, N., Noor Ali, M., Srisowanna, N., Hino, S. I., & Hishikawa, Y. (2018). Estrogen Regulates Mitochondrial Morphology through Phosphorylation of Dynamin-related Protein 1 in MCF7 Human Breast Cancer Cells. *Acta histochemica et cytochemica*, 51(1), 21–31. <https://doi.org/10.1267/ahc.17034>

Ortega, O., Rodriguez, I., Hinostroza, J., Laso, N., Callejas, R., Gallar, P., Mon, C., Herrero, J. C., Ortiz, M., Oliet, A., & Vigil, A. (2011). Serum alkaline phosphatase levels and left ventricular diastolic dysfunction in patients with advanced chronic kidney disease. *Nephron extra*, 1(1), 283–291. <https://doi.org/10.1159/000335303>

Ou, Y., Wang, S. J., Jiang, L., Zheng, B., & Gu, W. (2015). p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation. *The Journal of biological chemistry*, 290(1), 457–466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616359>

Pajarillo, E., Johnson, J., Jr, Kim, J., Karki, P., Son, D. S., Aschner, M., & Lee, E. (2018). 17 $\beta$ -estradiol and tamoxifen protect mice from manganese-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 65, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.11.008>

Palma, F., Agostini, D., Mason, P., Dachà, M., Piccoli, G., Biagiarelli, B., Fiorani, M., & Stocchi, V. (1996). Purification and characterization of the carboxyl-domain of human hexokinase type III expressed as fusion protein. *Molecular and cellular biochemistry*, 155(1), 23–29. <https://doi.org/10.1007/BF00714329>

Pan, J., Wang, R., Pei, Y., Wang, D., Wu, N., Ji, Y., Tang, Q., Liu, L., Cheng, K., Liu, Q., Sun, J., Gong, M., Zheng, X., Li, J., Zhang, C., & Yuan, Y. (2023). Sulforaphane alleviated vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension via inhibiting inflammation and oxidative stress. *The Journal of nutritional biochemistry*, 111, 109182. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109182>

Parada-Bustamante, A., Orihuela, P. A., Molina, C., Cardenas, H., Reuquen, P., Valencia, C., and Rincón, R. (2013). Hydroxyestradiols and methoxyestradiols as endogenous factors associated to physiological and physiopathological conditions. In 'Estradiol: synthesis, health effects and drug interaction'. (Eds R. Palmieri and S. Grimaudo.) pp. 121–143. (Nova Science Publishers, Inc: NY.)

Parra, V., Bravo-Sagua, R., Norambuena-Soto, I., Hernández-Fuentes, C. P., Gómez-Contreras, A. G., Verdejo, H. E., ... Castro, P. F. (2017). Inhibition of mitochondrial fission prevents hypoxia-induced metabolic shift and cellular proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(11), 2891–2903. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.018>

Paulin, R., Meloche, J., Jacob, M. H., Bissierier, M., Courboulin, A., & Bonnet, S. (2011). Dehydroepiandrosterone inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(5), H1798–H1809. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00654.2011>

Perros, F., Sentenac, P., Boulate, D., Manaud, G., Kotsimbos, T., Lecerf, F., Lamrani, L., Fadel, E., Mercier, O., Londono-Vallejo, A., Humbert, M., & Eddahibi, S. (2019). Smooth Muscle Phenotype in Idiopathic Pulmonary Hypertension: Hyper-Proliferative but not Cancerous. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3575. <https://doi.org/10.3390/ijms20143575>

Piao, L., Fang, Y. H., Parikh, K., Ryan, J. J., Toth, P. T., & Archer, S. L. (2013). Cardiac glutaminolysis: a maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 91(10), 1185–1197. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1064-7>

Prins KW, Thenappan T, Weir EK, Kalra R, Pritzker M, Archer SL. (2019). Repurposing Medications for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: What's Old Is New Again. *J Am Heart Assoc.* Jan 8;8(1): e011343. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011343>. PMID: 30590974; PMCID: PMC6405714.

Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 7(12), 715–726. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>

Pullamsetti, S. S., Mamazhakypov, A., Weissmann, N., Seeger, W., & Savai, R. (2020). Hypoxia-inducible factor signaling in pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation*, 130(11), 5638–5651. <https://doi.org/10.1172/JCI137558>

Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox biology*, 1(1), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.005>

Robb, E. L., Hall, A. R., Prime, T. A., Eaton, S., Szibor, M., Viscomi, C., James, A. M., & Murphy, M. P. (2018). Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I. *The Journal of biological chemistry*, 293(25), 9869–9879. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003647>

Robey, R. W., To, K. K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., & Bates, S. E. (2009). ABCG2: a perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 61(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.003>

Ronda, A. C., Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2013). 17 $\beta$ -estradiol protects mitochondrial functions through extracellular-signal-regulated kinase in C2C12 muscle cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 32(4), 1011–1023. <https://doi.org/10.1159/000354502>

Rosenkranz, S., Howard, L. S., Gomberg-Maitland, M., & Hoepfer, M. M. (2020). Systemic Consequences of Pulmonary Hypertension and Right-Sided Heart Failure. *Circulation*, 141(8), 678–693. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022362>

Roux, P. P., & Topisirovic, I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Molecular and cellular biology*, 38(12), e00070-18. <https://doi.org/10.1128/MCB.00070-18>

Ruopp, N. F., & Cockrill, B. A. (2022). Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: A Review. *JAMA*, 327(14), 1379–1391. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.4402>

Ryan J, Dasgupta A, Huston J, Chen KH, Archer SL. (2015). Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)* 93: 229–242. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1263-5>

Ryan, R. M., Kortt, N. C., Sirivanta, T., & Vandenberg, R. J. (2010). The position of an arginine residue influences substrate affinity and K<sup>+</sup> coupling in the human glutamate transporter, EAAT1. *Journal of neurochemistry*, 114(2), 565–575. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06796.x>

Samanta, D., Park, Y., Andrabi, S. A., Shelton, L. M., Gilkes, D. M., & Semenza, G. L. (2016). PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer research*, 76(15), 4430–4442. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0530>

Samanta, D., Park, Y., Andrabi, S. A., Shelton, L. M., Gilkes, D. M., & Semenza, G. L. (2016). PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer research*, 76(15), 4430–4442. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0530>

Sastre-Serra, J., Nadal-Serrano, M., Pons, D. G., Roca, P., & Oliver, J. (2012). Mitochondrial dynamics is affected by 17 $\beta$ -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(11), 1901–1905. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.012>

Saygin, D., Tabib, T., Bittar, H., Valenzi, E., Sembrat, J., Chan, S. Y., Rojas, M., & Lafyatis, R. (2020). Transcriptional profiling of lung cell populations in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*, 10(1), ????. <https://doi.org/10.1177/2045894020908782>

- Scarpulla R. C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of cellular biochemistry*, 97(4), 673–683. <https://doi.org/10.1002/jcb.20743>
- Schanton, M., Maymó, J., Pérez-Pérez, A., Gambino, Y., Maskin, B., Dueñas, J. L., Sánchez-Margalet, V., & Varone, C. (2017). Sp1 transcription factor is a modulator of estradiol leptin induction in placental cells. *Placenta*, 57, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.005>
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. Nov;13(11):2498-504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- Sharma, G., Hu, C., Staquicini, D. I., Brigman, J. L., Liu, M., Mauvais-Jarvis, F., Pasqualini, R., Arap, W., Arterburn, J. B., Hathaway, H. J., & Prossnitz, E. R. (2020). Preclinical efficacy of the GPER-selective agonist G-1 in mouse models of obesity and diabetes. *Science translational medicine*, 12(528), eaau5956. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5956>
- Sharma, G., Hu, C., Staquicini, D. I., Brigman, J. L., Liu, M., Mauvais-Jarvis, F., Pasqualini, R., Arap, W., Arterburn, J. B., Hathaway, H. J., & Prossnitz, E. R. (2020). Preclinical efficacy of the GPER-selective agonist G-1 in mouse models of obesity and diabetes. *Science translational medicine*, 12(528), eaau5956. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5956>
- Siegel, D., Bolton, E. M., Burr, J. A., Liebler, D. C., & Ross, D. (1997). The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Molecular pharmacology*, 52(2), 300–305. <https://doi.org/10.1124/mol.52.2.300>
- Simmen, F. A., Alhallak, I., & Simmen, R. C. M. (2020). Malic enzyme 1 (ME1) in the biology of cancer: it is not just intermediary metabolism. *Journal of molecular endocrinology*, 65(4), R77–R90. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0176>
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Williams, P. G., & Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*, 53(1), 1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>

- Simpkins, J. W., Yang, S. H., Sarkar, S. N., & Pearce, V. (2008). Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications. *Molecular and cellular endocrinology*, 290(1-2), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.013>
- Simpson, E. R., Misso, M., Hewitt, K. N., Hill, R. A., Boon, W. C., Jones, M. E., Kovacic, A., Zhou, J., & Clyne, C. D. (2005). Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocrine reviews*, 26(3), 322–330. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0020>
- Siques, P., Pena, E., Brito, J., & El Alam, S. (2021). Oxidative Stress, Kinase Activation, and Inflammatory Pathways Involved in Effects on Smooth Muscle Cells During Pulmonary Artery Hypertension Under Hypobaric Hypoxia Exposure. *Frontiers in physiology*, 12, 690341. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.690341>
- Sørensen, K. D., Abildgaard, M. O., Haldrup, C., Ulhøi, B. P., Kristensen, H., Strand, S., Parker, C., Høyer, S., Borre, M., & Ørntoft, T. F. (2013). Prognostic significance of aberrantly silenced ANPEP expression in prostate cancer. *British journal of cancer*, 108(2), 420–428. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.549>
- Spillier, Q., & Frédérick, R. (2021). Phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) inhibitors: a comprehensive review 2015-2020. *Expert opinion on therapeutic patents*, 31(7), 597–608. <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1890028>
- Stearman, R. S., Bui, Q. M., Speyer, G., Handen, A., Cornelius, A. R., Graham, B. B., Kim, S., Mickler, E. A., Tuder, R. M., Chan, S. Y., & Geraci, M. W. (2019). Systems Analysis of the Human Pulmonary Arterial Hypertension Lung Transcriptome. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 60(6), 637–649. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0368OC>
- Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1–A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Suliman, H. B., & Nozik-Grayck, E. (2019). Mitochondrial Dysfunction: Metabolic Drivers of Pulmonary Hypertension. *Antioxidants & redox signaling*, 31(12), 843–857. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7705>
- Sun, L., Song, L., Wan, Q., Wu, G., Li, X., Wang, Y., Wang, J., Liu, Z., Zhong, X., He, X., Shen, S., Pan, X., Li, A., Wang, Y., Gao, P., Tang, H., & Zhang, H. (2015). cMyc-mediated

activation of serine biosynthesis pathway is critical for cancer progression under nutrient deprivation conditions. *Cell research*, 25(4), 429–444. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.33>

Sun, Y., Sangam, S., Guo, Q., Wang, J., Tang, H., Black, S. M., & Desai, A. A. (2021). Sex Differences, Estrogen Metabolism and Signaling in the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8, 719058. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.719058>

Sun, Z., & Xu, Y. (2020). Nuclear Receptor Coactivators (NCOAs) and Corepressors (NCORs) in the Brain. *Endocrinology*, 161(8), bqaa083. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa083>

Suzuki, M., Suzuki, H., Sugimoto, Y., & Sugiyama, Y. (2003). ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *The Journal of biological chemistry*, 278(25), 22644–22649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212399200>

Svaguša, T., Martinić, M., Martinić, M., Kovačević, L., Šepac, A., Miličić, D., Bulum, J., Starčević, B., Sirotković-Skerlev, M., Seiwerth, F., Kulić, A., & Sedlić, F. (2020). Mitochondrial unfolded protein response, mitophagy and other mitochondrial quality control mechanisms in heart disease and aged heart. *Croatian medical journal*, 61(2), 126–138. <https://doi.org/10.3325/cmj.2020.61.126>

Tajan, M., Hock, A. K., Blagih, J., Robertson, N. A., Labuschagne, C. F., Kruiswijk, F., Humpton, T. J., Adams, P. D., & Vousden, K. H. (2018). A Role for p53 in the Adaptation to Glutamine Starvation through the Expression of SLC1A3. *Cell metabolism*, 28(5), 721–736.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.005>

Takeo, C., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2009). Identification of *Igf2*, *Igfbp2* and *Enpp2* as estrogen-responsive genes in rat hippocampus. *Endocrine journal*, 56(1), 113–120. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k08e-220>

Tamura, T., & Stadtman, T. C. (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1006–1011. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1006>

- Tang, H., Babicheva, A., McDermott, K. M., Gu, Y., Ayon, R. J., Song, S., Wang, Z., Gupta, A., Zhou, T., Sun, X., Dash, S., Wang, Z., Balistreri, A., Zheng, Q., Cordery, A. G., Desai, A. A., Rischard, F., Khalpey, Z., Wang, J., Black, S. M., ... Yuan, J. X. (2018). Endothelial HIF-2 $\alpha$  contributes to severe pulmonary hypertension due to endothelial-to-mesenchymal transition. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 314(2), L256–L275. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00096.2017>
- Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546(7659), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>
- Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546(7659), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management. *BMJ (Online)*, 360(fig 1). <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
- Thoré, P., Girerd, B., Jaïs, X., Savale, L., Ghigna, M. R., Eyries, M., Levy, M., Ovaert, C., Servettaz, A., Guillaumot, A., Dauphin, C., Chabanne, C., Boiffard, E., Cottin, V., Perros, F., Simonneau, G., Sitbon, O., Soubrier, F., Bonnet, D., Remy-Jardin, M., ... Montani, D. (2020). Phenotype and outcome of pulmonary arterial hypertension patients carrying a TBX4 mutation. *The European respiratory journal*, 55(5), 1902340. <https://doi.org/10.1183/13993003.02340-2019>
- Tobal, R., Potjewijd, J., van Empel, V. P. M., Ysermans, R., Schurgers, L. J., Reutelingsperger, C. P., Damoiseaux, J. G. M. C., & van Paassen, P. (2021). Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension: The Potential Involvement of Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in medicine*, 8, 806899. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.806899>
- Tofovic, S. (2011). Estrogens and development of pulmonary hypertension - Interaction of estradiol metabolism and pulmonary vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56(6), 696–708. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181f9ea8d.Estrogens>

- Tofovic, S. P., & Jackson, E. K. (2019). Estradiol Metabolism: Crossroads in Pulmonary Arterial Hypertension. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 116. <https://doi.org/10.3390/ijms21010116>
- Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529–539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>
- Umar, S., Rabinovitch, M., & Eghbali, M. (2012). Estrogen paradox in pulmonary hypertension: current controversies and future perspectives. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 186(2), 125–131. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0058PP>
- Underwood, E., Redell, J. B., Zhao, J., Moore, A. N., & Dash, P. K. (2020). A method for assessing tissue respiration in anatomically defined brain regions. *Scientific reports*, 10(1), 13179. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69867-2>
- van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Christodoulou, E., Goding, J. W., Takakusa, H., Kikuchi, K., Perrakis, A., Nagano, T., & Moolenaar, W. H. (2005). Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *The Journal of biological chemistry*, 280(22), 21155–21161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413183200>
- Venters, B. J., & Pugh, B. F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44(2-3), 117–141. <https://doi.org/10.1080/10409230902858785>
- Ventetuolo, C. E., Baird, G. L., Barr, R. G., Bluemke, D. A., Fritz, J. S., Hill, N. S., Klinger, J. R., Lima, J. A., Ouyang, P., Palevsky, H. I., Palmisciano, A. J., Krishnan, I., Pinder, D., Preston, I. R., Roberts, K. E., & Kawut, S. M. (2016). Higher Estradiol and Lower Dehydroepiandrosterone-Sulfate Levels Are Associated with Pulmonary Arterial Hypertension in Men. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 193(10), 1168–1175. <https://doi.org/10.1164/rccm.201509-1785OC>
- Walsh, C. A., Qin, L., Tien, J. C., Young, L. S., & Xu, J. (2012). The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *International journal of biological sciences*, 8(4), 470–485. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4125>

Wang, A. P., Yang, F., Tian, Y., Su, J. H., Gu, Q., Chen, W., Gong, S. X., Ma, X. F., Qin, X. P., & Jiang, Z. S. (2021). Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Senescence Promotes the Proliferation of PASMCs by Paracrine IL-6 in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Frontiers in physiology*, 12, 656139. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.656139>

Wang, A., & Valdez-Jasso, D. (2021). Cellular mechanosignaling in pulmonary arterial hypertension. *Biophysical reviews*, 13(5), 747–756. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00828-3>

Wang, C. C., Ying, L., Barnes, E. A., Adams, E. S., Kim, F. Y., Engel, K. W., Alvira, C. M., & Cornfield, D. N. (2018). Pulmonary artery smooth muscle cell HIF-1 $\alpha$  regulates endothelin expression via microRNA-543. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 315(3), L422–L431. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00475.2017>

Wang, Y., Zhao, Y. X., Zhang, X. W., Jiang, Y. Z., Ma, W., Zhang, L., & Dong, W. (2022). USF1 Transcriptionally Regulates UGT1A3 and Promotes Lung Adenocarcinoma Progression by Regulating Neurotrophin Signaling Pathway. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 758968. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.758968>

Waypa, G. B., Guzy, R., Mungai, P. T., Mack, M. M., Marks, J. D., Roe, M. W., & Schumacker, P. T. (2006). Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation research*, 99(9), 970–978. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000247068.75808.3f>

White, K., Johansen, A. K., Nilsen, M., Ciuculan, L., Wallace, E., Paton, L., ... MacLean, M. R. (2012). Activity of the estrogen- metabolizing enzyme cytochrome P450 1B1 influences the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 126(9), 1087–1098. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.062927>

Wilks, A., Black, S. M., Miller, W. L., & Ortiz de Montellano, P. R. (1995). Expression and characterization of truncated human heme oxygenase (hHO-1) and a fusion protein of hHO-1 with human cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, 34(13), 4421–4427. <https://doi.org/10.1021/bi00013a034>

Wu, W. H., Yuan, P., Zhang, S. J., Jiang, X., Wu, C., Li, Y., Liu, S. F., Liu, Q. Q., Li, J. H., Pudasaini, B., Hu, Q. H., Dupuis, J., & Jing, Z. C. (2018). Impact of Pituitary-Gonadal Axis

Hormones on Pulmonary Arterial Hypertension in Men. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979), 72(1), 151–158. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10963>

Xing, D., Nozell, S., Chen, Y. F., Hage, F., & Oparil, S. (2009). Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(3), 289–295. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.182279>

Xu, W., Janocha, A. J., & Erzurum, S. C. (2021). Metabolism in Pulmonary Hypertension. *Annual review of physiology*, 83, 551–576. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031620-123956>

Yang, S. H., Sarkar, S. N., Liu, R., Perez, E. J., Wang, X., Wen, Y., Yan, L. J., & Simpkins, J. W. (2009). Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor. *The Journal of biological chemistry*, 284(14), 9540–9548. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808246200>

Yang, W., Ma, J., Zhou, W., Li, Z., Zhou, X., Cao, B., Zhang, Y., Liu, J., Yang, Z., Zhang, H., Zhao, Q., Hong, L., & Fan, D. (2018). Identification of hub genes and outcome in colon cancer based on bioinformatics analysis. *Cancer management and research*, 11, 323–338. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S173240>

Young, M. J., Chen, Y. C., Wang, S. A., Chang, H. P., Yang, W. B., Lee, C. C., Liu, C. Y., Tseng, Y. L., Wang, Y. C., Sun, H. S., Chang, W. C., & Hung, J. J. (2022). Estradiol-mediated inhibition of Sp1 decreases miR-3194-5p expression to enhance CD44 expression during lung cancer progression. *Journal of biomedical science*, 29(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00787-1>

Yu, Q., & Chan, S. Y. (2017). Mitochondrial and Metabolic Drivers of Pulmonary Vascular Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*, 967, 373–383. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_24)

Yuan, Y., & Xu, J. (2007). Loss-of-function deletion of the steroid receptor coactivator-1 gene in mice reduces estrogen effect on the vascular injury response. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(7), 1521–1527. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.144477>

Zhang, B., Pan, C., Feng, C., Yan, C., Yu, Y., Chen, Z., Guo, C., & Wang, X. (2022). Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox report* :

communications in free radical research, 27(1), 45–52.  
<https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2046423>

Zhang, W. H., Qiu, M. H., Wang, X. J., Sun, K., Zheng, Y., & Jing, Z. C. (2014). Up-regulation of hexokinase1 in the right ventricle of monocrotaline induced pulmonary hypertension. *Respiratory research*, 15(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0119-9>

Zhang, Y., Zhao, X., Deng, L., Li, X., Wang, G., Li, Y., & Chen, M. (2019). High expression of FABP4 and FABP6 in patients with colorectal cancer. *World journal of surgical oncology*, 17(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12957-019-1714-5>

Zhao, J., Imbrie, G. A., Baur, W. E., Iyer, L. K., Aronovitz, M. J., Kershaw, T. B., Haselmann, G. M., Lu, Q., & Karas, R. H. (2013). Estrogen receptor-mediated regulation of microRNA inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(2), 257–265. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300200>

Zhao, Z. W., Fan, X. X., Yang, L. L., Song, J. J., Fang, S. J., Tu, J. F., Chen, M. J., Zheng, L. Y., Wu, F. Z., Zhang, D. K., Ying, X. H., & Ji, J. S. (2019). The identification of a common different gene expression signature in patients with colorectal cancer. *Mathematical biosciences and engineering : MBE*, 16(4), 2942–2958. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019145>

Zheng, S., Chen, X., Hong, S., Long, L., Xu, Y., Simoncini, T., & Fu, X. (2015). 17 $\beta$ -Estradiol inhibits vascular smooth muscle cell migration via up-regulation of striatin protein. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 31(8), 618–624. <https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1021325>

Zhou, C., Huang, H., Wang, Y., Sendinc, E., & Shi, Y. (2022). Selective regulation of tuft cell-like small cell lung cancer by novel transcriptional co-activators C11orf53 and COLCA2. *Cell discovery*, 8(1), 112. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00470-7>

Zhou, G., Cummings, R., Li, Y., Mitra, S., Wilkinson, H. A., Elbrecht, A., Hermes, J. D., Schaeffer, J. M., Smith, R. G., & Moller, D. E. (1998). Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 12(10), 1594–1604. <https://doi.org/10.1210/mend.12.10.0176>

Zhu, J., Fu, M., Gao, J., Dai, G., Guan, Q., & Du, C. (2022). Upregulation of Thioredoxin Reductase 1 Expression by Flavan-3-Ols Protects Human Kidney Proximal Tubular Cells from Hypoxia-Induced Cell Death. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(7), 1399. <https://doi.org/10.3390/antiox11071399>

Zogg C. K. (2014). Phosphoglycerate dehydrogenase: potential therapeutic target and putative metabolic oncogene. *Journal of oncology*, 2014, 524101. <https://doi.org/10.1155/2014/524101>

Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>