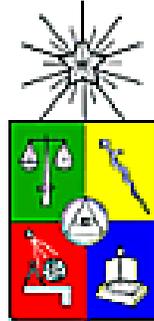


UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**Remodelado vascular en un modelo experimental de
insuficiencia cardiaca con fracción de
eyección preservada**

Fernanda Andrea Sanhueza Olivares

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Directores de Tesis

**Prof. Dr. Sergio Lavandero González
Prof. Dr. Mario Chiong Lay**

Una firma manuscrita en tinta azul que parece corresponder al nombre de uno de los directores de tesis, Mario Chiong Lay.

2023

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, presentada por la candidata:

FERNANDA ANDREA SANHUEZA OLIVARES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctora en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día de de 2023.

**Prof. Sergio Lavandero González
Prof. Mario Chiong Lay**

**Directores de Tesis
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Facultad de Medicina,
Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. Emilio Herrera

PROF. DR. Rodrigo Iturriaga

PROF. DRA. Gina Sánchez
Presidente Comisión de Examen

AGRADECIMIENTOS

Queridos amigos, familia y colegas,

Es difícil encontrar palabras adecuadas para expresar las diversas emociones que surgen en un momento como este, y para expresar mi gratitud hacia todas las personas que me han acompañado en este largo camino llamado Doctorado. Han sido cinco años de mucho esfuerzo, dedicación y perseverancia, penas y alegrías, y nunca habría llegado hasta aquí sin el apoyo de tantas personas especiales en mi vida. Muchas gracias.

Quiero comenzar agradeciendo a mi abuela, Amalia, quien ya no nos acompaña, pero me dejó un legado de fortaleza, resiliencia y perseverancia. De su mano dura y curtida surgieron los más hermosos gestos de amor y siempre la llevaré en mi corazón.

A mis dos mejores amigas: mi mamá, Daniela, mi eterna constante, y mi amiga Valentina. Gracias por ser mis mejores porristas, por darme ánimos día a día y siempre creer en mí. A mi hermana, Beatriz y mi hermano Benjamín, por aguantar mis locuras y por dar los mejores abrazos del mundo. A mi papá, Benito, por siempre estar presente y estar dispuesto a lo imposible por nosotros y nuestros sueños. A mi madrina, Claudia y a mi tía Andrea, quienes han estado presente en cada momento de mi vida y me han entregado constante amor y sabiduría.

A mi nueva familia: Melissa y Sandra, quienes vivieron conmigo todo este proceso y fueron un apoyo incondicional día a día. Muchas gracias. A Iván y a Paulina, siempre entregando cariño, alegría y ánimo para seguir adelante. A mi familia Sanhueza, quienes siempre me han acompañado.

A mis directores de Tesis, el Dr. Mario Chiong y el Dr. Sergio Lavandero, quienes me guiaron en este largo camino, respondieron mis infinitas preguntas y estuvieron presentes en las buenas y en las no tan buenas. Siempre serán mis Maestros.

A mis colegas y amigos del Laboratorio, particularmente al Equipo UMA: Alejandra, Felipe, Xime, Valeria, Francisco, David y en especial a Francisca. Gracias por tantas

horas de apoyo, abrazos y alegrías. A todo el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares y al Laboratorio de Metabolismo y Remodelado Vascular. Imposible mencionarlos a todos. La ciencia se construye en conjunto, y el logro de uno es el logro de todos. A Don Fidel, a la Señora Gindra y a Sebastián, asistentes de investigación y apoyo técnico del Laboratorio, siempre dispuestos a ayudar en todo y a compartir una sonrisa y un abrazo a libre demanda. A la Cecy, secretaria del Doctorado, por estar siempre al pie del cañón y apostando por nosotros. Infinitas gracias.

A mis nuevas y no tan nuevas amigas, quienes son una fuente inagotable de risas y amor, algunas de ellas desde hace más de 15 años: Baba, Cata, Andrea, Cami, Yeri, Javi, Paulina, Caro. A Claudio, Mauri, Cris, Diego, Miguel, Néstor, Pepe, Antonio, José Pablo, Werner y Germán. Gracias por tantos años de amistad.

A mi compañero de vida, mi mejor amigo, mi confidente, mi marido y el amor de mi vida, Ignacio. Nada de esto habría sido posible sin tu constante apoyo y cariño. Gracias por estar ahí en los buenos y en los malos momentos, por ayudarme a superar cada obstáculo y por celebrar conmigo cada logro.

Desde el fondo de mi corazón, muchas gracias.

Fernanda.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en los Laboratorios de Metabolismo y Remodelado Vascular y Transducción de Señales Moleculares del Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Esta tesis contó con el financiamiento de Beca Doctorado Nacional ANID 21181619, y los proyectos FONDECYT 1220392 (MC). 1200490 (SL) y FONDAP 15130011 (SL–MC).

PUBLICACIONES ASOCIADAS A LA TESIS

1. **Sanhueza-Olivares F**, Muñoz-Rodríguez C, Muñoz-Córdova F, Troncoso M, Guerrero-Moncayo A, Pino-De la Fuente F, Ortega-Muñoz A, Gabrielli L, Ocaranza MP, Chiong M, Lavandero S. Estandarización de un modelo pre-clínico para el estudio de insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada (HFpEF) en ratones macho y hembra. *Revista Chilena de Cardiología*, manuscrito en preparación.
2. **Sanhueza-Olivares F**, Troncoso MF, Pino-de la Fuente F, Martinez-Bilbao J, Riquelme JA, Norambuena-Soto I, Villa M, Lavandero S, Castro PF, Chiong M. A potential role of autophagy-mediated vascular senescence in the pathophysiology of HFpEF. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:1057349. doi: 10.3389/fendo.2022.1057349.
3. Villar-Fincheira P, Paredes AJ, Hernández-Díaz T, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, **Sanhueza-Olivares F**, Contreras-Briceño F, Mandiola J, Bruneau N, García L, Ocaranza MP, Troncoso R, Gabrielli L, Chiong M. Soluble interleukin-6 receptor regulates interleukin-6-dependent vascular remodeling in long-distance runners. *Front Physiol*. 2021 Oct 11;12:722528. doi: 10.3389/fphys.2021.722528.
4. Troncoso MF, Ortiz-Quintero J, Garrido-Moreno V, **Sanhueza-Olivares F**, Guerrero-Moncayo A, Chiong M, Castro PF, García L, Gabrielli L, Corbalán R, Garrido-Olivares L, Lavandero S. VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *BBA Mol Basis Dis*. 2021; 1867:166170. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166170.
5. Villar-Fincheira P, **Sanhueza-Olivares F**, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Hernandez-Vargas F, Troncoso R, Gabrielli L, Chiong M. Role of interleukin-6 in vascular health and disease. *Front Mol Biosci*. 2021;8:641734. doi: 10.3389/fmolb.2021.641734.
6. Norambuena-Soto I, Ocaranza MP, Cancino-Arenas N, **Sanhueza-Olivares F**, Villar-Fincheira P, Leiva-Navarrete S, Mancilla-Medina C, Moya J, Novoa U, Jalil JE, Castro PF, Lavandero S, Chiong M. Angiotensin-(1-9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol*. 2020;180:114190. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114190.

PRESENTACIONES A CONGRESOS ASOCIADAS A LA TESIS

1. **Sanhueza-Olivares F**, Troncoso M, Muñoz-Córdova F, Cancino-Arenas, N, Pino-De la Fuente F, Lavandero S, Chiong M. Histomorphometric analysis of major arteries wall in a mice model of heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). XXXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, 22-25 de noviembre de 2022, La Serena, Chile, Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas.
2. **Sanhueza-Olivares F**, Muñoz-Córdova F, Cancino-Arenas N, Troncoso M, Lavandero S, Chiong M, *Advanced Center for Chronic Diseases (ACCDiS), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile*. XXIX Congreso Sudamericano de Cardiología / LVII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Santiago, 2021.
3. **Sanhueza-Olivares F**, Cancino-Arenas N, Muñoz-Córdova F, Troncoso MF, Norambuena-Soto I, Chiong M, Lavandero S. FoxO1 and contractile protein expression in arteries of mice with heart failure with preserved ejection fraction. XLIV Annual Meeting Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology. October 26th-28th, 2021 (virtual).
4. **Sanhueza-Olivares F**, Garrido V, Muñoz-Cordova F, Cancino-Arenas N, Norambuena-Soto I, Troncoso M, Lavandero S, Chiong M. L-NAME-induced hypertension is associated with a decrease in aortic contractile proteins. XLII Annual Meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society. October 8 to 11, 2019. Hotel Gavina Sens, Iquique.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades cardiovasculares e insuficiencia cardiaca.....	1
1.2. Fisiopatología de HFpEF.....	2
1.3. Función vascular en HFpEF.....	5
1.3.1. Vasos sanguíneos, VSMC y vasculopatías.....	5
1.3.2. Disfunción macrovascular.....	6
1.3.3. Disfunción microvascular.....	7
1.4. Modelos de estudio de HFpEF.....	10
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	11
2.1. Hipótesis de trabajo.....	11
2.2. Objetivo general.....	11
2.3. Objetivos específicos.....	11
3. METODOLOGÍA.....	12
3.1. Animales de experimentación.....	12
3.1.1. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.....	14
3.1.2. Prueba de tolerancia al ejercicio.....	14
3.1.3. Determinación de la presión arterial.....	14
3.1.4. Evaluación de la función cardiaca.....	15
3.1.5. Eutanasia y extracción de tejidos.....	16
3.2. Análisis histológico.....	16
3.2.1. Tinción con hematoxilina-eosina (HE).....	17
3.2.2. Tinción con Sirius Red.....	18
3.3. Cultivo celular.....	18
3.4. Determinación de niveles de proteínas por Western blot.....	19
3.4.1. Obtención de homogenizados de proteínas en VSMC.....	19
3.4.2. Obtención de homogenizados de proteínas de arteria aorta.....	20
3.4.3. Electroforesis en gel y electrotransferencia de proteínas.....	20
3.4.4. Western blot.....	20
3.5. Determinaciones de la expresión génica por RT-qPCR.....	21
3.5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	21
3.5.2. Estandarización de partidores.....	22
3.5.3. RT-qPCR.....	22
3.6. Ensayo de MTT.....	23
3.7. Ensayo de exclusión de azul de tripán.....	23
3.8. Determinación de la incorporación de PI por citometría de flujo.....	23
3.9. Proliferación celular por inmunocitoquímica de Ki67.....	24
3.10. Análisis estadístico y tamaño muestral.....	24
4. RESULTADOS.....	26

4.1.	Establecimiento del modelo murino de HFpEF.....	26
4.1.1.	Criterios de exclusión para la selección de animales que se utilizarán en análisis posteriores.....	26
4.1.2.	Ingesta de agua y alimento.....	30
4.1.3.	Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial e intolerancia al ejercicio.....	32
4.1.4.	Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan disfunción diastólica, manteniendo preservada la función sistólica ..	33
4.1.5.	Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan hipertrofia y fibrosis cardiaca.....	36
4.1.6.	Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan infiltrado inflamatorio en el parénquima pulmonar, sin presencia de edema ni alteraciones en el tamaño del pulmón.....	39
4.2.	Remodelado vascular de arterias mayores en ratones tratados con HFD + L-NAME.....	41
4.2.1.	Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas presentan remodelado vascular de las arterias aorta, carótida y femoral.....	41
4.2.2.	Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas desarrollan fibrosis de la arteria aorta.....	45
4.2.3.	Expresión génica de proteínas contráctiles en arterias de ratones tratados con HFD + L-NAME.....	48
4.2.4.	Niveles de proteínas contráctiles en arterias aorta de ratones tratados con HFD + L-NAME.....	51
4.2.5.	Estudios de correlación entre los datos obtenidos.....	53
4.3.	Efecto del tratamiento con palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de VSMC.....	56
4.3.1.	Estandarización de las concentraciones de palmitato y L-NAME en VSMC.....	56
4.3.2.	Niveles de proteínas contráctiles y COL1A1 en VSMC tratadas con palmitato y L-NAME.....	59
4.3.3.	Proliferación celular en VSMC tratadas con palmitato y L-NAME.....	61
5.	DISCUSIÓN.....	63
5.1.	Implementación del modelo murino de HFpEF.....	63
5.2.	Remodelado vascular.....	67
5.2.1.	Análisis histomorfométrico.....	67
5.2.2.	Determinación de la fibrosis arterial.....	69
5.2.3.	Expresión de proteínas contráctiles.....	71
5.3.	Estudios de correlación.....	75
5.4.	Efecto del tratamiento con palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de VSMC.....	76
5.3.1.	Estandarización de las concentraciones de palmitato y L-NAME en VSMCs.....	76
5.3.2.	Cambio fenotípico de VSMC frente al tratamiento con palmitato y L-NAME.....	78
6.	CONCLUSIONES.....	80
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comorbilidades asociadas al desarrollo de HFpEF.	4
Figura 2. Principales alteraciones en la función macro y microvascular descritas en HFpEF.	9
Figura 3. Comparación entre los resultados obtenidos de parámetros metabólicos, función diastólica y distancia recorrida entre animales tratados con HFD + L-NAME 0,5 g/L y HFD + L-NAME 1,5 g/L.	13
Figura 4. Consumo de agua, alimento y dosis de L-NAME en los animales utilizados.	31
Figura 5. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial e intolerancia al ejercicio.	34
Figura 6. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan disfunción diastólica, manteniendo preservada la función sistólica.	35
Figura 7. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan hipertrofia y fibrosis cardiaca.	37
Figura 8. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan infiltrado inflamatorio en el parénquima pulmonar, sin presencia de edema ni alteraciones en el tamaño del pulmón.	40
Figura 9. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas presentan remodelado vascular de las arterias aorta y carótida.	43
Figura 10. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas presentan un aumento en el grosor de la capa media de la arteria femoral.	44
Figura 11. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas desarrollan fibrosis en la arteria aorta.	46
Figura 12. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas no desarrollan fibrosis en las arterias carótida y femoral.	47
Figura 13. Estandarización de los partidores utilizados para la determinación de Acta2, Tagln y β -actina por RT-qPCR.	48
Figura 14. Expresión génica de las proteínas contráctiles α SMA y SM22 de las arterias aorta, carótida y femoral de ratones tratados con HFD y L-NAME.	50
Figura 15. Niveles relativos de las proteínas contráctiles α SMA, SM22 y calponina en arterias aorta de ratones tratados con HFD + LNAME.	52
Figura 16. Estudios de correlación de los datos obtenidos de ratones tratados con HFD y L-NAME: correlación entre la PAS y parámetros de función, estructura cardiaca y tolerancia al ejercicio.	54
Figura 17. Estudios de correlación de los datos obtenidos de ratones tratados con HFD y L-NAME: correlación entre el grosor de la pared arterial y función cardiaca y entre la fibrosis arterial y cardiaca.	55
Figura 18. Determinación de la viabilidad celular de células musculares lisas vasculares A7r5 frente al tratamiento con palmitato y/o L-NAME a distintas concentraciones.	58

Figura 19. Niveles relativos de las proteínas contráctiles α SMA, SM22 y calponina y de los niveles de COL1A1 de células A7r5 tratadas con un palmitato y L-NAME durante 48 h.....	60
Figura 20. Determinación de los niveles de proliferación en células A7r5 tratadas con palmitato y/o L-NAME durante 48 h.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de reacción de retrotranscripción.....	21
Tabla 2. Preparación de la mezcla de reacción para el análisis por qPCR.	22
Tabla 3. Valores obtenidos al evaluar los parámetros fisiológicos y de función cardíaca en los ratones control (criterios de exclusión).....	28
Tabla 4. Valores obtenidos al evaluar los parámetros fisiológicos y de función cardíaca en los ratones tratados con HFD y L-NAME (criterios de exclusión).	29
Tabla 5. Secuencias, concentración y eficiencia de los partidores utilizados en RT-qPCR.....	48

ABREVIATURAS

α SMA	: Actina de músculo liso α
ABC	: Área bajo la curva
ANOVA	: Análisis de varianza
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNc	: Ácido desoxirribonucleico complementario
Ang II	: Angiotensina II
Ao	: Aorta
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNm	: Ácido ribonucleico mensajero
ATP	: Adenosín trifosfato
BSA	: Albúmina de suero de bovino
Car	: Carótida
CRP	: Proteína C reactiva
CT	: Número de ciclos
COL1A1	: Cadena α 1 del colágeno tipo 1
Dist. rec.	: Distancia recorrida
DMEM	: Medio Dulbecco Eagle modificado
DMSO	: Dimetil sulfóxido
D.S.	: Desviación estándar
E/A	: Relación entre la velocidad máxima del flujo sanguíneo en la relajación ventricular en la diástole temprana y en la diástole tardía producida por la contracción auricular
E/e'	: Relación entre la velocidad máxima del flujo sanguíneo en la relajación ventricular en la diástole temprana y la velocidad de movimiento del anillo mitral en la diástole temprana.
ECV	: Enfermedades cardiovasculares
EDTA	: Etiléndiaminotetraacetato
EEL	: Lámina elástica externa
FAVI	: Fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo
FBS	: Suero fetal bovino
FEVI	: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
Fib	: Fibrosis
FMD	: Dilatación mediada por flujo
FR	: Fuera de rango
g	: Gramo
GC	: Guanilato ciclasa
Gm	: Grosor de la media
GMPc	: Guanosín monofosfato cíclico
h	: Hora
HFD	: Dieta alta en grasa
HFpEF	: Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada
HFrEF	: Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida
HTA	: Hipertensión arterial
Hz	: Hertz

IC	: Insuficiencia cardíaca
IEL	: Lámina elástica interna
IgG	: Inmunoglobulina G
IL-6	: Interleukina 6
IMT	: Grosor de la región media-íntima
iNOS	: Óxido nítrico sintasa inducible
Kcal	: Kilocalorías
Kg	: Kilógramo
L-NAME	: N-γ-nitro-L-arginina metil éster
L/P	: Razón del lumen/grosor de la pared
LVIDd	: Diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole
LVIDs	: Diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole
m	: Metro
mA	: Miliamperes
MC	: Masa del corazón
MEC	: Matriz extracelular
min	: Minuto
M/L	: Grosor de la media/diámetro del lumen
MLV	: Musculatura lisa vascular
mm	: Milímetro
NO	: Óxido nítrico
NOS	: Óxido nítrico sintasa
PA	: Presión arterial
PAD	: Presión arterial diastólica
PAM	: Presión arterial media
PAS	: presión arterial sistólica
PBS	: Amortiguador fosfato salino
PI	: Yoduro de propidio
PKG	: Proteína kinasa G
PSR	: Picrosirius Red
p/v	: Peso/volumen
RNS	: Especies reactivas del nitrógeno
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
RT-qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SM22	: Proteína de músculo liso 22
SEM	: Error estándar medio
TBS	: Amortiguador Tris salino
TTG	: Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
TNFα	: Factor de necrosis tumoral α
VCAM-1	: Molécula de adhesión vascular 1
VSMC	: Células musculares lisas vasculares
v/v	: Volumen/volumen

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en Chile y el mundo. Una de las más prevalentes es la insuficiencia cardiaca, en la que el corazón no es capaz de suplir las demandas energéticas de los tejidos. La insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada (HFpEF) constituye una forma de insuficiencia cardiaca caracterizada por una disfunción en la diástole cardiaca, y tiene una alta prevalencia en la población. Se encuentra asociada una gran cantidad de comorbilidades, como lo son la obesidad y la hipertensión arterial. Dentro de los componentes de la fisiopatología de la HFpEF se ha destacado la disfunción vascular. Pacientes con HFpEF presentan alteraciones en la función vascular, determinada por imagenología no invasiva. En el presente trabajo se implementó un modelo murino de HFpEF recientemente descrito, basado en una alimentación con dieta alta en grasas (rica en palmitato) y administración simultánea de N- γ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inhibidor de las óxido nítrico sintasas. Estos ratones desarrollan un fenotipo cardiometabólico de HFpEF, caracterizado por obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, intolerancia al ejercicio y disfunción diastólica con función sistólica preservada. En estos animales se evaluó el remodelado vascular asociado con el desarrollo de esta patología. La hipótesis propuesta fue: *“Ratones tratados con una dieta rica en palmitato y L-NAME desarrollan HFpEF cardiometabólico y remodelado vascular de las arterias aorta, carótida y femoral, asociado a un cambio fenotípico de células musculares lisas vasculares”*. Para responder esta hipótesis, se plantearon 3 objetivos específicos: 1) Determinar parámetros cardiometabólicos en ratones tratados con una dieta rica en palmitato y L-NAME durante 15 semanas para implementar un modelo murino de HFpEF. 2) Evaluar el remodelado vascular y el grado de fibrosis en las arterias aorta, carótida y femoral de ratones HFpEF. 3) Determinar *in vitro* los efectos del tratamiento con palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de las células musculares lisas vasculares. Ratones C57BL6 de 11-12 semanas se trataron con dieta alta en grasa y L-NAME durante 15 semanas. Los animales presentaron alteraciones cardiometabólicas consistentes con un fenotipo moderado de HFpEF. En conjunto, los resultados muestran, por primera vez, que se produce un remodelado vascular

en estas arterias, observándose un incremento del grosor de la pared vascular y disminución de su relación con el lumen, fibrosis de la aorta y cambios en la expresión génica de proteínas contráctiles. Para los estudios *in vitro*, células musculares lisas vasculares se trataron con palmitato y L-NAME. Los resultados mostraron que este tratamiento generó alteraciones fenotípicas en estas células, caracterizadas por una disminución en las proteínas contráctiles y de los niveles de colágeno, sin alteraciones en la proliferación celular. Colectivamente los resultados de esta tesis dan cuenta de alteraciones vasculares que se producen en HFpEF, aportando al entendimiento de los mecanismos que subyacen esta patología para el desarrollo futuro de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento.

ABSTRACT

Vascular remodeling in an experimental model of heart failure with preserved ejection fraction

Cardiovascular diseases are the main cause of death in Chile and the world. One of the most prevalent is heart failure, in which the heart is unable to meet the energy demands of the tissues. Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a form of heart failure characterized by diastolic dysfunction, and it has a high prevalence in the population. Several comorbidities are associated, including obesity and arterial hypertension. Among the components of the pathophysiology of HFpEF, vascular dysfunction has been highlighted. Patients with HFpEF present alterations in vascular function, assessed by non-invasive imaging. In the present work, a recently described mouse model of HFpEF was implemented, based on a diet containing high fat (mainly palmitate) and the simultaneous administration of N-γ-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor. These mice develop a cardiometabolic HFpEF phenotype, characterized by obesity, glucose intolerance, hypertension, exercise intolerance, preserved systolic function and diastolic dysfunction. Vascular remodeling associated with the development of the pathology was evaluated in these mice. The proposed hypothesis was: “Mice treated with a diet rich in palmitate and L-NAME develop cardiometabolic HFpEF and vascular remodeling of the aorta, carotid and femoral arteries, associated with a phenotypic change in vascular smooth muscle cells”. To test this hypothesis, three specific aims were established: 1) To determine cardiometabolic parameters in mice treated with a diet rich in palmitate and L-NAME for 15 weeks to implement a murine model of HFpEF. 2) To evaluate the vascular remodeling and the degree of fibrosis in the aorta, carotid and femoral arteries of HFpEF mice. 3) To determine *in vitro* the effects of treatment with palmitate and L-NAME on the vascular smooth muscle cell phenotype. To this end, 11-12 weeks old C57BL6 mice were treated with high-fat diet and L-NAME for 15 weeks. The animals presented cardiometabolic alterations consistent with a moderate HFpEF phenotype. The results showed for the first time that vascular remodeling occurs in these arteries, in which the thickness of the artery

wall was increased and its relationship to the lumen decreased, with fibrosis of the aortic artery and alterations in contractile proteins gene expression. For *in vitro* studies, vascular smooth muscle cells were treated with palmitate and L-NAME. The results showed that this treatment generated phenotypic alterations in these cells, characterized by a decrease in contractile proteins and collagen levels, without alterations in cell proliferation. In aggregate, the results obtained in this thesis account for vascular alterations that occur in HFpEF, contributing to the understanding of the mechanisms underlying this pathology for the future development of new therapeutic strategies for its treatment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades cardiovasculares e insuficiencia cardiaca

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son aquellas patologías que afectan al corazón y los vasos sanguíneos del organismo. Incluyen a las enfermedades cerebrovasculares, cardiomiopatías congénitas, vasculopatías periféricas e hipertensión arterial. Constituyen la primera causa de muerte tanto a nivel mundial, siendo responsables de 17,9 millones de defunciones al año (31%)¹, como a nivel nacional, causando un 27,1% de las muertes reportadas en el año 2016². Dentro de las principales ECV se encuentra la insuficiencia cardiaca (IC), la cual se define como la incapacidad del corazón para suplir las demandas energéticas de los tejidos³. Su principal causa son las enfermedades isquémicas, en la que la perfusión del miocardio se ve disminuida, ya sea en forma crónica o aguda³. Dentro de los principales factores de riesgo se encuentran la edad avanzada, historia familiar previa de ECV, enfermedad coronaria, hipertensión arterial, diabetes mellitus y obesidad, los que durante los últimos años muestran una prevalencia en continuo aumento, conllevando a un incremento en la incidencia de la IC⁴. La IC se clasifica en IC con disfunción sistólica o diastólica, cuya principal diferencia clínica está dada por la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) del paciente⁵. La FEVI determina el porcentaje de sangre expulsada desde el ventrículo, siendo ésta reducida en la IC sistólica (FEVI < 40%, del inglés, *heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF) y preservada en la IC diastólica (FEVI > 50%, del inglés, *heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF)⁵.

La IC con disfunción sistólica se caracteriza por una falla en la contractilidad ventricular, lo que reduce la fracción de eyección, un remodelado excéntrico del miocardio (tejido muscular del corazón), seguido por una dilatación ventricular y una sobrecarga de volumen sanguíneo³. En cambio, la IC con disfunción diastólica se caracteriza por una falla en la relajación y el llenado ventricular, sin una disminución de la fracción de eyección, un aumento en la rigidez de la pared ventricular que causa un aumento en la presión de llenado, acompañado de un remodelado concéntrico (hipertrofia ventricular), lo que produce una sobrecarga de presión³. Se

estima que aproximadamente 26 millones de personas sufren de IC en el mundo, y que aproximadamente el 50-60% de los casos corresponden a HFpEF, cifra que está incrementando en forma progresiva⁶. Estas cifras suponen un importante problema para la salud pública, ya que en la actualidad se conocen escasas intervenciones farmacológicas que reduzcan de manera convincente la morbilidad y mortalidad de la HFpEF^{5,7}, a diferencia de lo que ocurre en la HFrEF. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que el uso de empagliflozina, un inhibidor del cotransportador de sodio glucosa (SGLT2i), es el primer tratamiento farmacológico que reduce significativamente el riesgo de muerte por eventos cardiovasculares y de hospitalización por IC en pacientes con HFpEF⁸.

1.2. Fisiopatología de HFpEF

La HFpEF se considera un síndrome clínico más que una enfermedad discreta, por lo que consta de múltiples mecanismos fisiopatológicos, siendo la disfunción diastólica el principal mecanismo. Esta se define como la incapacidad del ventrículo izquierdo de aceptar un volumen adecuado de sangre a presiones diastólicas normales. Se encuentra en la mayoría de los casos asociada a hipertensión arterial (HTA) y se caracteriza por una relajación lenta, rigidez ventricular y elevadas presiones de llenado^{6,9}. No obstante, si bien esta condición es necesaria para el desarrollo de HFpEF, estudios indican que no sería suficiente por sí sola⁶. Recientemente, la literatura ha descrito que dentro de los pacientes con HFpEF existen distintos fenotipos, dependiendo de las comorbilidades asociadas, historia clínica y los signos y síntomas clínicos que manifiestan (concepto llamado “fenogrupos”)¹⁰. En este contexto, dos grupos se destacan como los más prevalentes: el fenotipo denominado “HFpEF cardiometabólico” y el denominado “HFpEF hipertensivo de edad avanzada”¹¹. En el primero, los pacientes presentan obesidad visceral, dislipidemia, diabetes tipo II e HTA, mientras que, en el segundo, se caracterizan por presentar edad avanzada, HTA, enfermedad crónica renal y fibrilación auricular^{10,11}. En los últimos años se ha destacado la inflamación microvascular sistémica crónica como uno de los principales mecanismos

fisiopatológicos de la HFpEF, y se ha recalcado la importancia de las distintas comorbilidades que inducen esta respuesta: principalmente la edad, la obesidad y la HTA^{12,13} (Figura 1). Diversos estudios han descrito que pacientes con HFpEF tienen niveles elevados de marcadores inflamatorios como el receptor de interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la proteína C reactiva (CRP), VCAM1 e interleukina 6 (IL-6)^{12,14}. Por otra parte, se ha descrito que las citoquinas proinflamatorias inducen producción endotelial de especies reactivas del oxígeno (ROS), las que reaccionan con el óxido nítrico (NO) formando especies reactivas del nitrógeno (RNS), principalmente peroxinitrito¹⁵. Estas especies inducen estrés nitrosativo (daño celular producido por nitrosilación de proteínas producto del aumento en RNS y ROS) y como consecuencia disminuye la biodisponibilidad del NO en el endotelio^{12,16}. En conjunto, estos radicales alteran la homeostasis de la vía guanilato ciclasa (GC)/guanosín monofosfato cíclico (GMPc)/proteína kinasa G (PKG) en los cardiomiocitos^{17,18}, la cual en condiciones fisiológicas ejerce acciones cardioprotectoras, regulando la contractilidad, hipertrofia y remodelado de estas células¹⁹. Un tercer componente en la fisiopatología de la HFpEF que ha adquirido un importante protagonismo en las últimas revisiones bibliográficas es la disfunción vascular^{20,21}, cuyos principales hallazgos a la fecha se detallan en la siguiente sección.

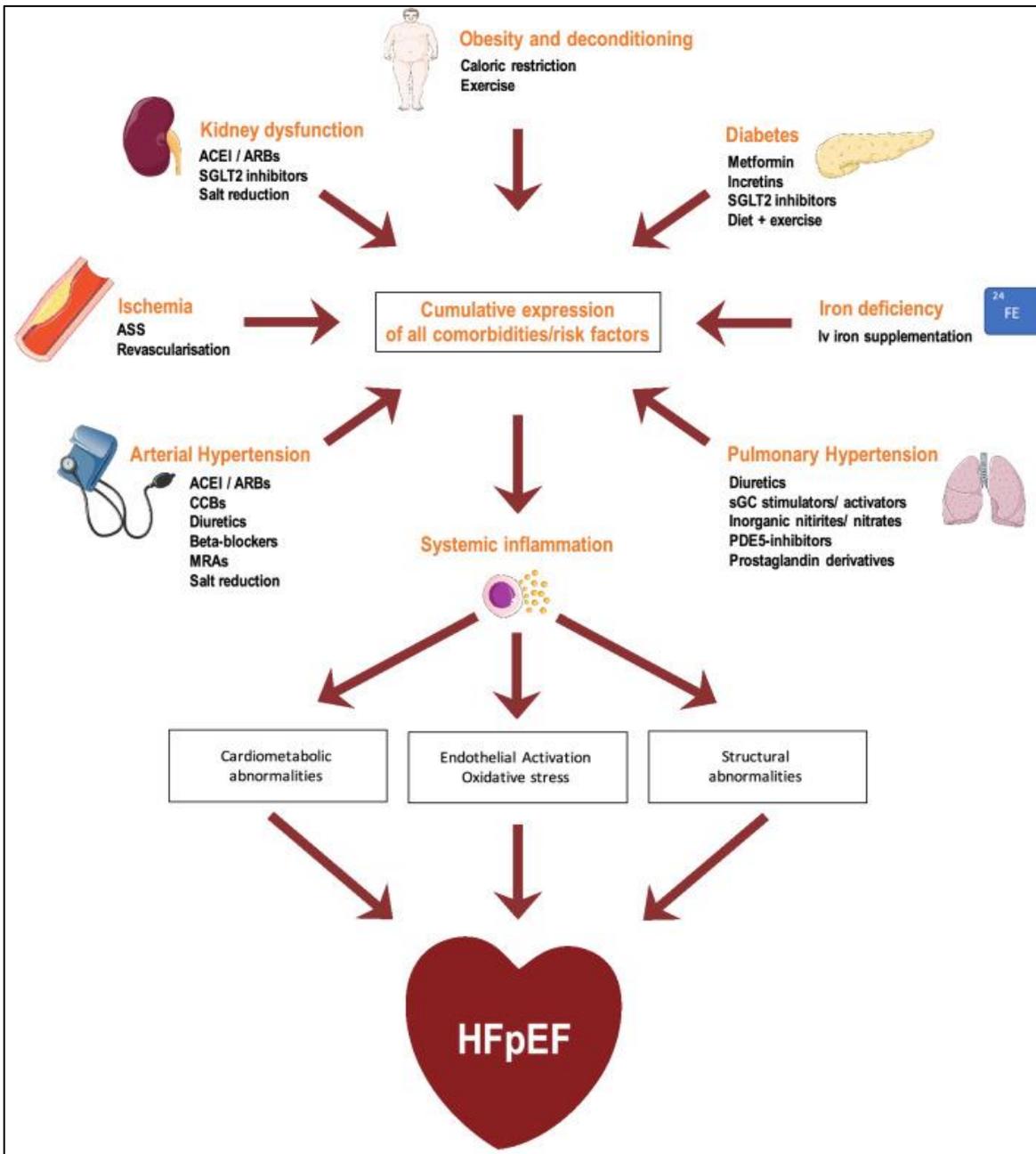


Figura 1. Comorbilidades asociadas al desarrollo de HFpEF.

Imagen extraída de Wintrich et al., (2020)¹³.

1.3. Función vascular en HFpEF

1.3.1. Vasos sanguíneos, VSMC y vasculopatías

Los vasos sanguíneos se encargan del transporte de sangre al organismo para proveer de oxígeno y nutrientes a los distintos tejidos. En general, se dividen en venas y arterias, las cuales a su vez se dividen en arterias elásticas o de conducción (por ejemplo, la aorta y la arteria carótida común) y arterias musculares o de distribución (por ejemplo, la arteria femoral y las arterias coronarias). Ambos tipos de arterias no solo difieren en su estructura, siendo la principal diferencia la relación elastina/músculo liso mayor en las arterias de conducción, sino que también difieren en los mecanismos de regulación de la contractilidad del vaso, el contenido de óxido nítrico y las alteraciones que sufren durante procesos fisiopatológicos²². La respuesta de los vasos a agentes vasodilatadores tanto dependientes como independientes del endotelio varía en función de su localización en el organismo²³. En general, las arterias están formados por 3 capas concéntricas, denominadas la adventicia, la media y la íntima, siendo esta última la más interna. La capa media está compuesta principalmente por células musculares lisas, denominadas células de la musculatura lisa vascular (del inglés, VSMC), cuya función más importante es la mantención del tono vascular, otorgando resistencia periférica al flujo sanguíneo gracias a su capacidad contráctil²⁴.

Las VSMC presentan un fenotipo variable, según las condiciones fisiopatológicas del organismo y su estadio de desarrollo. Presentan un fenotipo de tipo sintético durante la vasculogénesis, caracterizado por un alto grado de proliferación y migración celular, acompañado de una elevada tasa de síntesis de componentes de la matriz extracelular (MEC)²⁵. En organismos ya desarrollados, presentan un fenotipo de tipo contráctil, caracterizado por niveles elevados de proteínas contráctiles, como calponina, proteína de músculo liso 22 (SM22) y actina de músculo liso α (α SMA), principalmente²⁶. Presentan además bajos niveles de proteínas de la MEC (vimentina, osteopontina y colágeno, entre otras), y bajo grado de proliferación y migración celular²⁶. Sin embargo, frente a procesos patológicos como aterosclerosis o lesiones vasculares, al igual que durante el envejecimiento,

las VSMC adoptan un fenotipo sintético-proliferativo, que trae como consecuencia un aumento en la rigidez de la pared arterial, pérdida de contractilidad y disminución del lumen del vaso, pudiendo formarse lo que se conoce como “neoíntima”²⁷. Durante la HTA, principal responsable de la hipertrofia cardiaca concéntrica y por tanto condición altamente prevalente en pacientes con HFpEF, las VSMC adoptan un fenotipo hipertrófico e hipercontráctil, caracterizado por un notorio aumento en la síntesis de proteínas contráctiles y un aumento en el tono miogénico²⁴. Resultados de nuestro Laboratorio muestran que angiotensina II (Ang II), péptido vasoconstrictor y uno de los principales inductores de HTA, induce hipertrofia en VSMC²⁸. Sin embargo, la disfunción vascular en HFpEF es aún mayor que la observada en la HTA. Si bien el papel de la musculatura lisa vascular en distintas ECV se encuentra ampliamente descrito en la literatura, su contribución particular en la HFpEF ha sido muy poco estudiada. Esta limitación se debe principalmente a que no se ha desarrollado un modelo de VSMC *in vitro* para el estudio de HFpEF, y a que no existían, hasta hace recientemente, modelos animales que emulen fielmente el fenotipo observado en pacientes HFpEF, principalmente debido a la alta complejidad que supone imitar las características clínicas de la HFpEF²⁹.

1.3.2. Disfunción macrovascular

Dentro de los factores de riesgo que han sido identificados como relevantes para el desarrollo de IC se encuentra el incremento de la rigidez y del grosor de la pared de las arterias, particularmente de la media³⁰. Diversos estudios que han evaluado la función vascular de grandes vasos en pacientes con HFpEF ([Figura 2](#)), y se ha encontrado que presentan una menor distensibilidad de la aorta³¹, menor respuesta vasodilatadora frente a estímulos como la nitroglicerina³² y el ejercicio^{33,34}, un aumento en la vasoconstricción en reposo y menor sensibilidad al efecto vasodilatador del NO²⁰. Además, estos pacientes presentan un incremento en la rigidez de la arteria aorta^{20,35-37}. Interesantemente, un estudio mostró que la disfunción vascular está incrementada al comparar pacientes con HFpEF con pacientes que solo presentan HTA, por lo que la disfunción observada en pacientes

HFpEF sería un problema más allá que tan solo producto de la HTA³⁸. En el año 2012, se observó que los pacientes con HFpEF respondían mejor a tratamientos con vasodilatadores que pacientes con HFrEF, recalcando la importancia del componente vascular en la HFpEF³⁹. Entre los mecanismos que relacionan el incremento de la rigidez arterial con disfunciones del miocardio destacan un menor suministro de oxígeno, menor distensibilidad arterial y disminución de la presión diastólica, lo que compromete el flujo a través de las arterias coronarias⁴⁰. Se ha encontrado además una asociación en la morfología y función de las arterias carótidas y HFpEF⁴¹⁻⁴³. Fernandes y cols., utilizando resonancia magnética en el estudio MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), encontraron una relación entre la distensibilidad de la carótida y la mejora en la función diastólica ventricular⁴⁰. En la misma línea, las arterias carótidas de pacientes HFpEF presentaron un mayor grosor de la región media-íntima de la arteria (del inglés, IMT), y una mayor razón IMT/lumen en comparación con los controles⁴¹. Interesantemente, el control de la presión arterial disminuyó el IMT de las carótidas mas no detuvo su progresión en pacientes hipertensos⁴⁴. Además, existe una asociación significativa entre el IMT de la carótida y la hospitalización por IC⁴⁵. En otro estudio, no obstante, no se encontraron diferencias en el grosor íntima-media al comparar pacientes HFpEF con pacientes HFrEF⁴³. También ha sido reportada una reducción en la dilatación mediada por flujo (del inglés, FMD) de la arteria braquial en pacientes HFpEF, no solo al compararlos con el control sino con pacientes hipertensos⁴⁶. En contraposición, Hundley y cols, no reportaron diferencias significativas en la FMD de pacientes HFpEF en comparación con pacientes sanos⁴⁷. En conjunto, los hallazgos dan cuenta de una disfunción macrovascular en HFpEF.

1.3.3. Disfunción microvascular

La microcirculación a través de arteriolas, capilares y vénulas permite cumplir la demanda energética de los tejidos a través de la regulación del tono vascular y la angiogénesis, principalmente^{48,49}. La disfunción microvascular se define como una falla en la regulación del flujo sanguíneo en respuesta las

demandas energéticas⁵⁰ y su ocurrencia ha sido ampliamente descrita en enfermedades crónicas como la diabetes, la hipertensión arterial, la obesidad y la IC (Figura 2⁵¹). En la literatura se propone que la combinación de múltiples comorbilidades produce inflamación sistémica crónica de bajo grado la cual conlleva a una disfunción del miocardio producida, en parte, por la inflamación microvascular de las arterias coronarias^{12,13}. En concordancia, marcadores inflamatorios como IL-6, CRP y TNF α se asocian más fuertemente en pacientes con HFpEF que con HFrEF⁵². En VSMC, la vía GC/GMPc/PKG disminuye los niveles de calcio y por lo tanto la relajación de la célula⁵³. Si las alteraciones de esta vía reportadas en cardiomiocitos durante HFpEF ocurren en la vasculatura es una interrogante aún pendiente en la literatura. Sin embargo, pacientes con HFpEF presentan una falla en la reactividad microvascular evaluada por endoPAT, una prueba no invasiva de disfunción endotelial⁵⁴ y rarefacción capilar en el músculo esquelético⁵⁵. Además, se ha descrito en tejido miocárdico una disminución en la función microvascular, un incremento en la rarefacción coronaria y una disminución en la hiperemia máxima en pacientes HFpEF comparados con controles de la misma edad⁵⁴⁻⁵⁷. Otra aproximación utilizada para evaluar la función microvascular es el estudio de las arteriolas de la retina, las cuales pueden ser evaluadas utilizando cámaras ópticas no invasivas⁴¹. La razón pared/lumen de las arteriolas de la retina se encuentra significativamente aumentada en pacientes HFpEF, consistente con una correlación entre alteraciones de la arteriola de la retina e IC⁵⁸. Interesantemente, el aumento de la razón pared/lumen también fue significativo al compararlo con pacientes hipertensos que no padecían HFpEF⁴¹, reafirmando la propuesta de que las alteraciones vasculares observadas en HFpEF no son debidas únicamente a procesos hipertensivos. Por otra parte, la microvasculatura del pliegue de la uña usando videocapilaroscopia en pacientes con HFpEF, y se ha reportado alteraciones significativas en la morfología, arquitectura y densidad capilar en pacientes HFpEF, comparados no solo con el control sino con pacientes con HFrEF (33).

Resulta relevante destacar que los estudios mencionados en los puntos 2.3.2 y 2.3.3 utilizaron equipos de imagenología no invasiva y que no se han

realizado, a la fecha, estudios vasculares histológicos ni analizado el papel de la musculatura lisa vascular en HFpEF. Se ha mostrado además que durante el envejecimiento y la HTA, dos de las comorbilidades más prevalentes en HFpEF, la sobre activación de la musculatura lisa vascular (MLV) contribuye a aproximadamente un 50% de la rigidez arterial⁵⁹ y que existe un incremento en la expresión de miosina no muscular en la MLV, lo que aumenta el tono vascular, respectivamente⁶⁰. Por lo tanto, comorbilidades asociadas a la HFpEF estarían potenciado el estado hipercontráctil de la musculatura vascular, pero el mecanismo por el cual esto ocurre no se encuentra dilucidado con exactitud. El mensaje final es claro: la disfunción vascular cumple un papel relevante en la patogénesis de HFpEF. Si es que esto constituye una causa u ocurre como consecuencia de la patología deberá ser estudiado en el futuro.

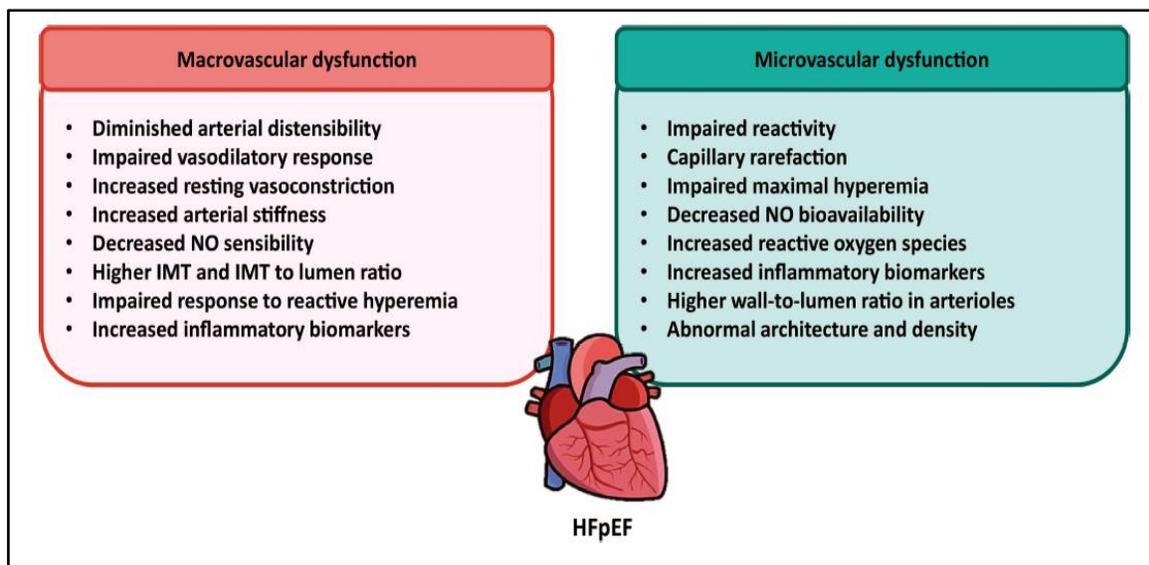


Figura 2. Principales alteraciones en la función macro y microvascular descritas en HFpEF. Imagen de Sanhueza-Olivares, et al., 2022⁵¹.

1.4. Modelos de estudio de HFpEF

En el año 2019, el Laboratorio del Dr. Joseph Hill (Texas, Dallas, EE. UU.) en colaboración con nuestro grupo de investigación, publicó un estudio en la revista Nature en el cual desarrollaron un modelo preclínico murino de HFpEF¹⁷. Ratones C57BL/6 se alimentaron con una dieta alta en grasa (en la que el 60% de la dieta se obtiene a partir de ácidos grasos y donde el principal ácido graso saturado es el ácido palmítico) y se les administró en el agua de bebida L-nitro-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor general de las óxido nítrico sintasas (NOS) que induce HTA, a una concentración de 0,5 g/L, emulando de este modo obesidad e HTA, respectivamente. En este modelo se logró reproducir las principales características fenotípicas de la HFpEF, entre las que destacan una fracción de eyección preservada, un aumento en la masa del pulmón y del corazón, una marcada disminución de la tolerancia al ejercicio y disfunción diastólica, validándose el modelo animal como modelo de HFpEF¹⁷. En dicho estudio, se postula que el tratamiento con HFD y L-NAME induce una sobre activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que produce estrés nitrosativo por acumulación de especies reactivas del nitrógeno⁶¹, principalmente peroxinitrito, producto de la reacción entre especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico⁶², produciendo daño celular, lo que lleva a las alteraciones en la función cardiaca observadas.

Durante esta tesis doctoral, se implementó el modelo de HFpEF desarrollado por Hill y cols., y se evaluó el remodelado vascular (alteraciones morfológicas) del tejido arterial. Se escogió trabajar con las arterias aorta, carótida y femoral, para abarcar los dos tipos principales de arterias que existen en el organismo: arterias de conducción (elásticas), como lo son la aorta y la carótida, y arterias de distribución (musculares), como la arteria femoral.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

2.1. Hipótesis de trabajo

“Ratones tratados con una dieta rica en palmitato y L-NAME desarrollan HFpEF cardiometabólico y remodelado vascular de las arterias aorta, carótida y femoral, asociado a un cambio fenotípico de células musculares lisas vasculares”

2.2. Objetivo general

Implementar un modelo murino de HFpEF a través del tratamiento de ratones con una dieta rica en palmitato y L-NAME durante 15 semanas y estudiar el efecto del palmitato y el L-NAME sobre el remodelado vascular *in vivo* y sobre el fenotipo de células musculares lisas vasculares *in vitro*.

2.3. Objetivos específicos

- a) Determinar parámetros cardiometabólicos en ratones tratados con una dieta rica en palmitato y L-NAME durante 15 semanas para implementar un modelo murino de HFpEF.
- b) Evaluar el remodelado vascular y el grado de fibrosis en las arterias aorta, carótida y femoral de ratones HFpEF.
- c) Determinar *in vitro* los efectos del tratamiento con palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de las células musculares lisas vasculares.

3. METODOLOGÍA

3.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones C57BL/6N de 11 - 12 semanas de edad, los cuales se alimentaron durante 15 semanas con una dieta alta en grasas (del inglés, *high fat diet*, HFD) (D12492, Research Diets, Inc. EE.UU), donde el 60% de las calorías ingeridas provienen de las grasas y cuyo principal ácido graso saturado es el ácido palmítico, o una dieta control (Teklad, 2916, donde el 12% de las calorías provienen de las grasas, Envigo, EE.UU) y agua de bebida suplementada con L-NAME 1,5 g/L (HB1352, HelloBio, EE.UU), ajustada a pH 7,4, manteniendo agua sin suplementar como control. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura (ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad, a 22°C). Una vez a la semana, se determinó el estado general de cada animal, su masa corporal (g) y la ingesta de alimento (g) y agua (mL). El protocolo utilizado cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Chile (Certificado N°: 20412 – CYQ – UCH).

Las primeras determinaciones se realizaron con L-NAME 0,5 g/L, pero los animales no desarrollaron disfunción diastólica ([Figura 3E](#)), por lo que se incrementó la dosis de L-NAME administrada a los animales a 1,5 g/L. Los resultados presentados en este trabajo corresponden exclusivamente a aquellos obtenidos utilizando 1,5 g/L de L-NAME.

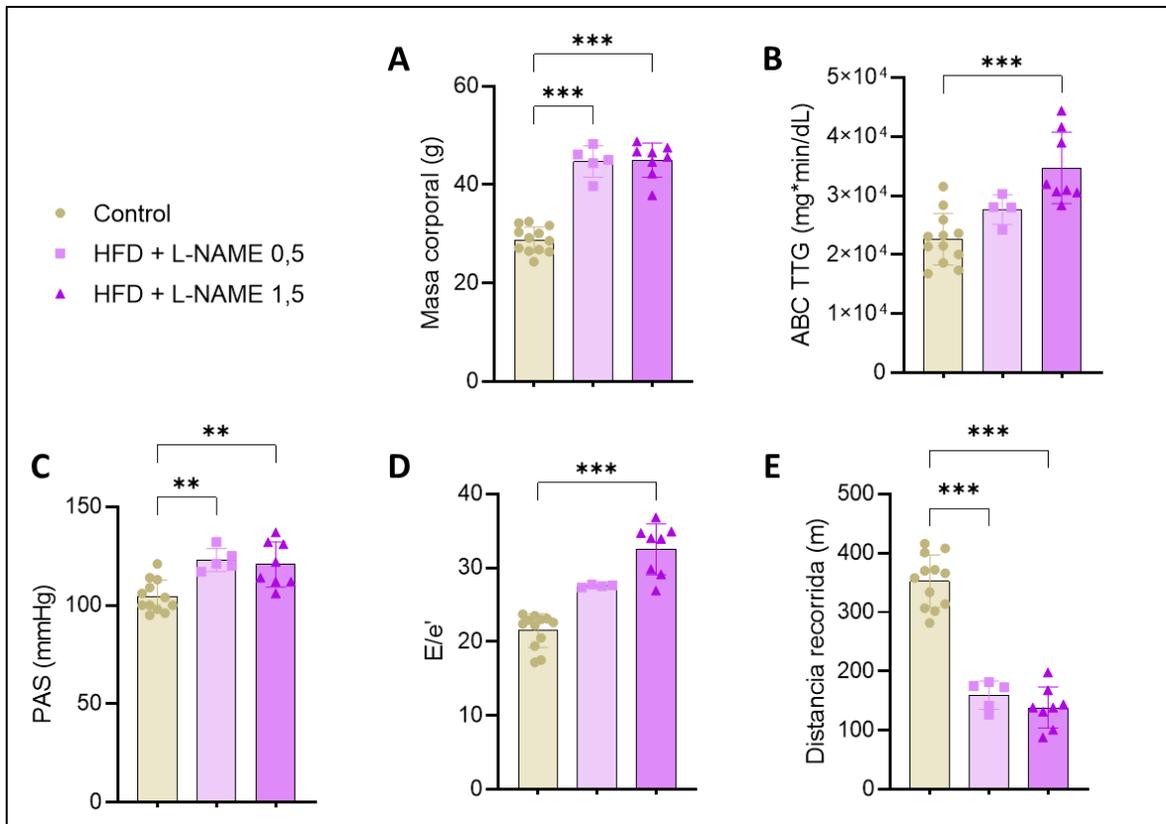


Figura 3. Comparación entre los resultados obtenidos de parámetros metabólicos, función diastólica y distancia recorrida entre animales tratados con HFD + L-NAME 0,5 g/L y HFD + L-NAME 1,5 g/L. A, masa corporal (g) de los animales. B, área bajo la curva (ABC) de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TTG). C, presión arterial sistólica (mmHg). D, razón E/e' determinada por ecocardiografía en Doppler pulsado y Doppler tisular, vista de cuatro cámaras, en animales anestesiados con isoflurano 2%. E, distancia recorrida (m) frente a un ensayo de agotamiento máximo cuesta arriba. A-E, Se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Una vez transcurridas las 15 semanas de tratamiento, se determinaron los siguientes parámetros:

3.1.1. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

Previo a la realización del experimento, los ratones se mantuvieron en ayuno durante 6 h. Luego, se administró glucosa intraperitoneal a una concentración de 1 g/Kg de peso del animal. Se determinó los niveles de glucosa en muestras de sangre obtenidas de la cola antes de la inyección (0 min) y a los 15, 30, 60, 90 y 120 min luego de la inyección de glucosa. Se utilizó para la determinación de la glicemia un hemoglucotest (Free Style Optium, Abbott) y tiras reactivas para la determinación de glucosa (Free Style, Abbott).

3.1.2. Prueba de tolerancia al ejercicio

Los animales se aclimataron durante 4 días, 5 min diarios en una trotadora para roedores (Ugo Basile), con una inclinación de 20° y a velocidades crecientes (4-14 m/min). Se utilizaron estímulos eléctricos de 1.5 mA y 3 Hz. El día de la prueba, realizada entre las 16 y las 18 pm, se registró la distancia recorrida hasta agotamiento máximo del animal, determinada cuando éste se mantiene durante al menos 5 s entre la rejilla que genera los estímulos eléctricos y la primera porción de la cinta trotadora.

3.1.3. Determinación de la presión arterial

Las presiones arteriales sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM) se evaluaron a través de un método de registro no invasivo en animal consiente (NIBP, CODA®, Kent Scientific), utilizando el método del manguito en la cola del animal ("*Tail cuff*"), utilizando el restrictor tamaño S proporcionado por el equipo. Para ello, los animales se mantuvieron en cajas individuales a temperatura controlada (37°C), y se esperó a que las mediciones se estabilizaran antes del registro. Los animales se entrenaron durante 4 días antes de las mediciones para aclimatarlos a las condiciones experimentales. Se reporta el promedio de 3 días consecutivos de al

menos 12 determinaciones de presión arterial cada día, realizadas entre las 6 y las 9 am.

3.1.4. Evaluación de la función cardiaca

Se determinó por ecocardiografía, utilizando el ecógrafo ViVid i (General Electric), con un transductor iRL-RS de 5-13 mHz, de una profundidad de campo de 6 cm y un campo de visión de 25 mm.

- a) Función sistólica: La determinación de la función sistólica se realizó en animales conscientes, registrando imágenes del eje corto del corazón en modo M. Se registró del diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole (LVIDs, mm), y en diástole (LVIDd, mm), valores utilizados para calcular la FEVI (Ecuación 1) y la FAVI (Ecuación 2)⁶³. Las mismas imágenes se utilizaron para determinar el grosor de la pared anterior y la pared posterior del ventrículo izquierdo.

$$FEVI = \frac{(LVIDd^3 - LVIDs^3)}{LVIDd^3} * 100$$

Ecuación 1: cálculo FEVI.

$$FAVI = \frac{(LVIDd - LVIDs)}{LVIDd} * 100$$

Ecuación 2: cálculo FAVI.

- b) Función diastólica: La determinación de la función diastólica se realizó en animales anestesiados con isoflurano al 5% para inducir la anestesia y luego mantenido al 2%. Se realizó un Doppler pulsado en la vista apical de cuatro cámaras para determinar la velocidad máxima del flujo a través de la válvula mitral durante la diástole temprana (onda E) y la velocidad máxima del flujo a través de la válvula mitral causada por la contracción auricular (onda A). Utilizando la misma vista, se realizaron Doppler tisulares para determinar el rango de movimiento del tejido miocárdico (onda e'). La función diastólica se evaluó a través de las razones E/A, que representa la relación entre la velocidad máxima del flujo sanguíneo en la relajación ventricular en la diástole temprana y en la diástole tardía producida por la contracción

auricular y E/e' , que permite estimar la presión de llenado del ventrículo, comparando el movimiento del tejido miocárdico con el flujo de llenado durante la relajación ventricular.

Las determinación ecocardiográficas fueron realizadas por Alejandra Guerrero Moncay

3.1.5. Eutanasia y extracción de tejidos

Una vez finalizados los tratamientos y realizadas las determinaciones correspondientes, los animales los animales se sometieron a eutanasia utilizando isoflurano 5% (Lunan Better Pharmaceuticals) para inducir anestesia hasta inconsciencia. Se extrajeron el corazón, el pulmón y las arterias aorta, carótida y femoral para su posterior análisis. Antes de su almacenamiento, se determinó la masa (mg) del corazón y el pulmón. Adicionalmente, se almacenó la tibia, la cual posteriormente se calentó a ebullición durante 60 min, se limpió y se determinó su longitud utilizando un pie de metro. Para los análisis histológicos, se almacenaron los tejidos en formalina para luego ser procesados. Para los análisis por Western blot y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), se almacenaron las arterias en tubos sumergidos en nitrógeno líquido y luego a -80°C hasta su uso.

3.2. Análisis histológico

Se realizaron análisis morfométricos y morfológicos en el corazón, el pulmón, la primera porción de la aorta ascendente, la porción central de la arteria carótida común y la región inguinal de la arteria femoral. Una vez obtenidos, los tejidos se fijaron utilizando formalina tamponada 10% v/v en amortiguador fosfato a pH 7.4 a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se lavaron durante 1h en agua corriendo para remover el exceso de fijador y se deshidrataron en una escala ascendente de etanoles (70° , 95° y 100°), para su posterior inclusión en parafina a 60°C . Se utilizó xilol como medio intermediario entre los agentes

deshidratantes y la parafina. Se formaron bloques de parafina en un centro de inclusión, manteniendo la temperatura entre 55-60°C. Utilizando un micrótopo, se realizaron cortes de 4 µm de espesor, los que se estiraron en un baño de flotación y adhirieron a portaobjetos para posterior realización de las tinciones correspondientes.

3.2.1. Tinción con hematoxilina-eosina (HE)

Los cortes de tejidos obtenidos se desparafinaron en xilol durante 5 min, y luego se sumergieron en etanol absoluto y se hidrataron con agua destilada. Se tiñeron las muestras con hematoxilina de Harris, se lavaron, se diferenciaron en etanol ácido y se lavaron con agua corriente. Posteriormente, se azularon en bicarbonato de sodio 1%, lavaron y tiñeron con eosina 0,25%. Finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron en portaobjetos con resina sintética. Utilizando el programa *ImageJ*TM, en los cortes de pulmón se determinó el porcentaje de edema, identificado como una zona color rosado pálido en el parénquima alveolar, que corresponde a la presencia de líquido rico en proteínas. Adicionalmente, se determinó el área de infiltrado inflamatorio celular, que corresponde a focos de acumulación de leucocitos en el parénquima alveolar y en el espacio peribronquial y perivascular. Se analizaron 20 imágenes por pulmón, las cuales se capturaron en ciego por un tercero. En las arterias, se determinó en forma manual el área del corte transversal del lumen y de la capa media de las distintas arterias, utilizando como referencia la lámina elástica interna (IEL) y la lámina elástica externa (EEL). El área de la capa media se calculó por la diferencia entre el área abarcada por el IEL y el área abarcada por el EEL. El grosor de la capa media se determinó utilizando el diámetro externo del EEL y el diámetro interno de IEL. Para el reporte de los resultados, se determinó la razón área lumen calculado(c)/área de la media, el grosor de la media y la razón M/L (grosor de la media/diámetro del lumen). Se analizó una imagen por arteria que abarcara la totalidad del corte transversal (arteria completa).

3.2.2. Tinción con Sirius Red

La tinción de Sirius Red o Picrosirius Red (PSR), permite identificar estructuras helicoidales del colágeno fibrilar, independiente del tipo de fibra o de su origen. Los cortes obtenidos en parafina se desparafinaron en xilol durante 5 min, y luego se sumergieron en etanol absoluto y se hidrataron con agua destilada. Se contrastaron los núcleos con hematoxilina férrica y se tiñeron con PSR 0,1% durante 60 min. Se diferenciaron los tejidos con una solución de ácido acético 0,1%, se deshidrataron y se montaron con resina sintética. Utilizando el programa *ImageJ™*, se determinó el porcentaje del área de la capa media de las arterias correspondiente a fibras de colágeno (zona color rojo/rosado). Se analizaron el número de imágenes necesarias para cubrir la arteria en su totalidad: una imagen con aumento 40x en las arterias femorales, una o dos imágenes 40x en las arterias carótidas y 8-12 imágenes 40x en las arterias aorta. En el caso de que sea más de una imagen, se promediaron los resultados obtenidos. En el caso del corazón, se tomaron imágenes representativas del miocardio del ventrículo izquierdo con un aumento 40x y se analizaron de la misma manera.

NOTA: El procesamiento de las muestras histológicas, montaje y las tinciones correspondientes se realizaron en la Unidad de Histología ACCDiS, servicio a cargo de David Silva, Tecnólogo Médico.

3.3. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular A7r5, de VSMC extraídas de aorta de rata embrionaria (CRL-144, ATCC, USA). Las células se cultivaron en medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). El medio contenía además una mezcla de 3 antibióticos: penicilina, estreptomina y fosfomicina B. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humedecida con 5% de CO₂ en el aire. Al alcanzar un 80% de confluencia, las células se expandieron utilizando una solución de tripsina (0,3%) en una solución amortiguadora de fosfato con EDTA 0,025% libre de Ca²⁺ - Mg²⁺ para soltarlas de

la placa y se depositaron en placas estériles con medio de cultivo fresco para su posterior crecimiento. Se utilizaron las células entre los pasajes 4 y 10 para los experimentos descritos a continuación.

Una vez alcanzada la confluencia deseada (60 – 90% según el experimento a realizar), las células se lavaron con una solución de amortiguador fosfato salino (PBS 1X: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4) y se redujo el contenido de suero del medio de cultivo de un 10% FBS a un 2% FBS durante 24 h. Antes de su uso, los medios de cultivo se ambientaron a 37°C en un baño termostático. Las células se estimularon con L-NAME 1-10 mM (HelloBio, HB1352) y/o palmitato-BSA para obtener una concentración de palmitato libre de 1-5 nM (Cayman Chemical, 29558) durante 48 h, manteniendo un grupo de células sin tratamiento a modo de control.

3.4. Determinación de niveles de proteínas por Western blot

3.4.1. Obtención de homogenizados de proteínas en VSMC

Células A7r5 se cultivaron en placas de 60 mm hasta alcanzar una confluencia del 80%, se privaron de suero durante 24 h y se realizaron los tratamientos como se explicó en 5.3. Las células se lisaron con 100 µL de medio de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; Tritón X-100 1% v/v), suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasas (Roche). Los lisados obtenidos se transfirieron a tubos de 1,5 mL, se sonicaron durante 5 min y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó a partir de éstos la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford (BioRad protein Assay, BioRad). Se calentaron las muestras a 100°C para la desnaturación de las proteínas durante 5 min en amortiguador de geles de poliacrilamida (PAGE) con dodecil sulfato de sodio (SDS) 4X (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicerol 32% v/v; 2-mercaptoetanol 20% v/v; SDS 9,2% p/v; azul de bromofenol 0,02% p/v). Se almacenaron las muestras a -20°C hasta su procesamiento.

3.4.2. Obtención de homogenizados de proteínas de arteria aorta

Para los análisis de Western blot, se utilizó la porción superior de la aorta abdominal. Éstas se homogenizaron en 100 μ L de amortiguador de lisis de tejidos T-PER™ (Thermo, Scientific), utilizando un sistema de pistilo motorizado y se procesaron de manera análoga a las células, como se indica en el punto 5.4.1.

3.4.3. Electroforesis en gel y electrotransferencia de proteínas

Las muestras se resolvieron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de 8-15% cargando 5 μ g de proteínas de cada muestra. El procedimiento se realizó utilizando cámaras de electroforesis (BioRad) sumergidas en amortiguador de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM; SDS 0,1% p/v) a un voltaje de 80 V durante 30 min y luego a 100 V hasta el final de la corrida. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa, utilizando un sistema de transferencia rápida semiseca (Bio-Rad) a 1,3A y 25V durante 7 min.

3.4.4. Western blot

Luego de la electrotransferencia, las membranas se incubaron con solución de bloqueo (leche descremada 5% p/v en TBS 1X [Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2 mM], Tween-20 0,1%]) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron durante toda la noche con agitación suave a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a analizar: SM22 (Abcam, ab14106), calponina (Abcam, ab46794), α SMA (Abcam, ab5694), Ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8396), la cadena α 1 del colágeno tipo 1 (COL1A1) (Cell Signaling, 84336), utilizando β -tubulina (Cell Signaling) y proteínas totales teñidas con rojo de Ponceau como control de carga. Las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min cada vez con TBS-T (TBS Tween-20 0,1%) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (Rabbit anti-mouse IgG, 402335-2ML y Goat

anti-rabbit IgG 401393-2ML, Calbiochem®), a una dilución de 1:5.000 en solución de bloqueo. Las membranas se lavaron nuevamente con TBS-T durante 5 min a temperatura ambiente, tres veces. Para la detección de los resultados, las membranas se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL. Para revelar y digitalizar las imágenes se utilizó el equipo LICOR®, y las imágenes se procesaron mediante el programa *ImageJ*™.

3.5. Determinaciones de la expresión génica por RT-qPCR

3.5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para la extracción de ARN se utilizó la mitad inferior de la aorta abdominal. Se homogenizaron las aortas en 200 µL de Trizol™, utilizando un sistema de pistilo motorizado, y se almacenaron a -80°C. En el caso de las células, una vez finalizados los estímulos se lavaron dos veces con PBS estéril y se homogenizaron en 1 mL de Trizol, resuspendiendo varias veces utilizando una micropipeta y se almacenaron a -80 °C. Al momento de la extracción, se siguieron las instrucciones del fabricante del reactivo. Se cuantificó el ARN obtenido utilizando el equipo Nanodrop™ 2000 (ThermoScientific) y se realizó la reacción de PCR utilizando el reactivo comercial iScript™ *Supermix* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. De acuerdo con el rendimiento de la extracción de ARN, se prepararon 1000 o 400 ng de ADNc. En la Tabla 1 se especifica el protocolo de la reacción de retrotranscripción utilizado.

Tabla 1. Protocolo de reacción de retrotranscripción.

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Priming	25	5
Transcripción reversa	46	20
Inactivación retrotranscriptasa	95	1

3.5.2. Estandarización de partidores

Se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de partido, utilizando una muestra control. Se realizaron diluciones seriadas de cada partidador, a partir de una concentración de 200 nM, diluyendo la muestra 5 veces por cada punto, con un total de 4 puntos. Para llevar a cabo la reacción, se utilizó el reactivo PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del proveedor. Como control negativo, se utilizó la misma mezcla de reacción, utilizando agua en vez de muestra. El equipo de qPCR utilizado fue StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Se consideraron como válidos aquellos partidores en los que luego de la realización de la curva en triplicado, el valor del CT (ciclo en el cual se sobrepasa el nivel umbral de fluorescencia) entre cada réplica no fuese mayor a 0,5 y la diferencia entre cada punto de la curva fuese de alrededor de 2.5 unidades de CT. La preparación de la mezcla de reacción se especifica en la Tabla 2. La reacción de PCR incluyó además la realización de curvas de desaturación.

Tabla 2. Preparación de la mezcla de reacción para el análisis por qPCR.

Master Mix	Partidores 200 nM	H ₂ O PCR	Muestra ADN	Volumen final
5 µL	1 µL	3 µL	1 µL	10 µL

3.5.3. RT-qPCR

La reacción de PCR se realizó tal como se describió en la sección 4.3.1.2., utilizando los partidores a una concentración final de 500 - 1000 nM, dependiendo del partidador utilizado. Se determinaron los niveles de *Acta2* y *Tagln*, normalizados por los niveles de *β-actina*. Las determinaciones se realizaron en triplicado. Se analizó además un control negativo utilizando agua en vez de muestra. Los datos se analizaron utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ y el software StepOnePlus™ v2.3.

3.6. Ensayo de MTT

Células A7r5 se sembraron en placas de 12 pocillos, aprox. 25.000 células por pocillo. Una vez realizados los estímulos correspondientes, se lavaron las células con PBS y se incubaron durante 4 h con medio sin suero y MTT 1 mg/mL. Se retiró el medio y se añadieron 200 µL de DMSO en cada pocillo, hasta disolverse por completo los cristales de formazán. Se traspasó, en duplicado, a una placa de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 560 nm en un lector de placas automatizado. Se reporta el promedio de ambas determinaciones, luego de sustraer el valor del blanco. Como control positivo de la pérdida de viabilidad celular se incubaron las células con peróxido de hidrógeno al 0,92% durante 30 min.

3.7. Ensayo de exclusión de azul de tripán

Se determinó la viabilidad celular utilizando un contador de células automático (TC20™, BioRad) que discrimina entre células viables e inviables dependiendo de la incorporación de azul de Tripán a la célula. Se sembraron células A7r5 a una confluencia del 80% y se realizaron los estímulos correspondientes. Una vez finalizados, se lavaron las células con PBS a 37°C y se incubaron con tripsina-EDTA 0,05% durante 5 min a 37°C para soltar las células. Se tomó una porción de las células y se mezclaron con azul de Tripán 0,4 % en una proporción 1:1 y se procedió al conteo automatizado en el equipo. Se reportó el promedio de dos conteos por condición del porcentaje de células viables.

3.8. Determinación de la incorporación de PI por citometría de flujo

Células A7r5 se sembraron a confluencia en placas de 12 pocillos. Una vez realizados los estímulos correspondientes, las células se incubaron con yoduro de propidio (PI) 1 µg/mL en oscuridad durante 15 min. Se incubaron las células con peróxido de hidrógeno 0,92% durante 30 min como control positivo de muerte celular. Las células se lavaron con PBS estéril, se soltaron de la placa incubando

con tripsina-EDTA 0,05% durante 5 min a 37°C y se traspasaron a tubos de citometría de flujo. La incorporación de PI fue analizada utilizando el equipo de citometría de flujo FACScan TM (Becton Dickinson) y el software BD FACSCanto™ (BD Biosciences). Previo a los análisis, se realizaron corridas de prueba para seleccionar la población de células que serían incluidas en el análisis de los datos.

3.9. Proliferación celular por inmunocitoquímica de Ki67

Células A7r5 se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de 25 mm. Luego de realizar los estímulos correspondientes, las células se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% por 15 minutos. Se bloquearon las células fijadas con BSA 1% durante 1 h y se incubaron con un anticuerpo anti-Ki67 (Cell Signaling, #9129S) durante la noche en una cámara húmeda a 4°C. Posteriormente, se lavó el anticuerpo con PBS frío y se incubaron las muestras con anticuerpo secundario Alexa 488 (#A11034). Se montaron las células en un portaobjetos utilizando ProLong™ Gold (ThermoFisher Scientific), medio de montaje suplementado con DAPI para la tinción simultánea de los núcleos. Para el análisis, se capturaron imágenes utilizando un microscopio de fluorescencia ZOE (BioRad). La fluorescencia se cuantificó mediante el programa *ImageJ*™, analizando 5 imágenes por condición, por cada réplica experimental.

3.10. Análisis estadístico y tamaño muestral

- a) Tamaño muestral: Para el cálculo del número de animales a utilizar en los objetivos específicos 1 y 2, se utilizó la ecuación 3 para los distintos experimentos⁶⁴. Al ser más alta la probabilidad de errores tipo 1 y 2 en animales, se utilizó para el cálculo un poder del 90% ($Z_{1-\beta}$). El valor de Z_α utilizado fue de 1,96 (error alfa de un 5% con efecto hacia ambos lados). El número de animales mínimo más alto requerido fue para el experimento de tolerancia al ejercicio, para el cual se requerían 8 ratones. Considerando la

variabilidad de los ensayos posteriores a realizar y el tamaño reducido de los tejidos para realizar los ensayos descritos, asociado a un porcentaje de falla en su extracción de aproximadamente un 10-20% según tejido, se consideraron 12 animales por condición.

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{1-\beta})^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

Ecuación 3: Cálculo del número de ratones necesarios para los experimentos, donde Z_{α} es el error α , $Z_{1-\beta}$ es el poder del experimento y Δ corresponde al efecto tamaño.

- b) Análisis estadístico: Todos los datos obtenidos se analizaron de la misma manera: se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (si $n > 5$). Si el número de réplicas era menor a 5, la población se asumía como no paramétrica. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar 3 o más grupos experimentales, y t-Student de dos colas o Mann Whitney de dos colas, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar dos grupos experimentales. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.
- c) Estudios de correlación: Se utilizó el programa GraphPad Prism™ para calcular los coeficientes de correlación de Pearson (r) y el valor de p de dichas correlaciones de los distintos datos obtenidos. Se agruparon los datos y se realizó una matriz de correlación, a partir de la cual se extrajeron los datos más relevantes.

4. RESULTADOS

4.1. Establecimiento del modelo murino de HFpEF

A continuación, se describen los resultados obtenidos al analizar distintos parámetros metabólicos (masa corporal, tolerancia a la glucosa, presión arterial), tolerancia al ejercicio, función cardíaca sistólica y diastólica, macroestructura del corazón y edema pulmonar, luego de someter a los animales a un tratamiento con HFD y L-NAME a una concentración 1,5 g/L durante 15 semanas.

Para facilitar el análisis de los resultados, se nombrará a los grupos experimentales de la siguiente manera:

- Grupo control: Animales alimentados con dieta control y agua no suplementada.
- Grupo HFD: Animales alimentados con HFD y agua no suplementada.
- Grupo L-NAME: Animales alimentados con dieta control y agua suplementada con L-NAME 1,5 g/L.
- Grupo HFpEF: Animales alimentados con HFD y agua suplementada con L-NAME 1,5 g/L.

4.1.1. Criterios de exclusión para la selección de animales que se utilizarán en análisis posteriores

La obtención de un modelo HFpEF en animales supone un importante desafío debido a que es necesario que el ratón cumpla con la presencia de una serie de alteraciones en su fisiología. Se establecieron por lo tanto criterios de exclusión para establecer aquellos animales que se incluyeron en los distintos análisis realizados ([Tablas 3 y 4](#)):

- **Determinación óptima de la presión arterial (PA) y la función cardíaca:**
Tanto la determinación de la PA por el método del manguito de la cola (*“Tail cuff”*) como la evaluación de la función cardíaca por ecocardiografía son

técnicas recientemente optimizadas en nuestro laboratorio, por lo que los grupos de animales utilizados durante el proceso de estandarización no se incluyeron en este estudio (datos no mostrados).

- **Panel completo de experimentos:** Se estableció que el animal contara con el panel completo de los análisis realizados *in vivo*, independiente de los valores obtenidos en ellos. Debido a este criterio, se excluyeron 3 animales (Tablas 3 y 4).
- **Criterios de inclusión:** El aumento de la masa corporal, la intolerancia al ejercicio, la mantención de la función sistólica y la disminución de la función diastólica se establecieron como requisitos de inclusión para la selección de los animales. Para ello, se realizó un análisis de los animales control que contaran con el panel completo de análisis *in vivo* y se obtuvo el promedio y la desviación estándar. Se realizó un análisis de datos atípicos en los grupos control (método de ROUT, utilizando un Q de 5%) y se eliminó un animal producto de un valor elevado de E/e' respecto del promedio de los controles (Tabla 3). Del grupo HFpEF, se excluyeron aquellos animales que no aumentaron su masa corporal y la razón E/e' en al menos dos desviaciones estándar respecto del promedio de los controles, aquellos que no disminuyeron la distancia recorrida en al menos dos desviaciones estándar respecto del promedio de los controles y aquellos que presentaron una FEVI menor al 60% (Tabla 4). Debido a este criterio, se excluyeron 3 animales.

Tabla 3. Valores obtenidos al evaluar los parámetros fisiológicos y de función cardiaca en los ratones control (criterios de exclusión).

Utilizando el programa GraphPad Prism™, se determinó el promedio y la desviación estándar de cada uno de los parámetros observados. Se indican en rojo aquellos animales excluidos ya sea por falta de datos o por no cumplir con el criterio mínimo requerido, destacado en amarillo (> 2D.S. por sobre o por bajo el valor de la media obtenida en los controles). En verde claro se indican los criterios cumplidos y en rojo claro aquellos no cumplidos. FR: Fuera del rango de frecuencia cardíaca óptimo para las determinaciones ecocardiográficas.

ID animal	Peso	Glucosa AUC	PAS	Controles				
				Treadmill	FEVI	E/A	E/e'	HW/TL
89	26,8	1068	100	282	82	1,47	23,5	8,3
91	30,4	1150	95	314	60	1,39	20,5	8,5
102	27,1	1218	104	370	64	1,43	17,5	7,7
103	26,5	1163	96	408	55	1,44	19,4	7,4
104	26,9	1292	90	315	68	1,40	FR	6,8
153	31,7	981	109	307	93	1,41	23,7	7,3
154	28,6	823	100	416	90	1,44	22,9	8,9
155	32,2	867	100	372	88	1,59	17,2	8,8
164	32,5	1067	121	302	88	1,30	22,2	8
165	29,2	959	113	334	91	1,51	22,4	7,5
500	30,1	1587	114	401	92	1,36	23,0	7,4
501	26,4	1432	98	358	92	1,44	22,6	6,4
502	24,4	1200	106	366	89	1,36	23,1	5,9
545	25,5	1150	96	401	87	1,54	27,8	7,3
546	26,2	1123	98	361	95	Sin datos	Sin datos	8,1

	Exclusión por falta de datos
	Exclusión por elevado E/e' (outlier)

Tabla 4. Valores obtenidos al evaluar los parámetros fisiológicos y de función cardiaca en los ratones tratados con HFD y L-NAME (criterios de exclusión).

Utilizando el programa GraphPad Prism™, se determinó el promedio y la desviación estándar de cada uno de los parámetros observados. Se indican en rojo aquellos animales excluidos ya sea por falta de datos o por no cumplir con el criterio mínimo requerido, destacado en amarillo (> 2 D.S. por sobre o por bajo el valor de la media obtenida en los controles). En verde claro se indican los criterios cumplidos y en rojo claro aquellos no cumplidos. FR: Fuera del rango de frecuencia cardíaca óptimo para las determinaciones ecocardiográficas. Sin datos: Datos no obtenidos por dificultades técnicas.

	Animal excluido
	Criterio no cumplido
	Criterio cumplido
	Criterio mínimo

	Prom	DS	> 2 DS	< 2 DS
Masa corp.	28,8	2,62	34,1	23,6
Gluc. AUC	22649	4392	31433	13865
PAS	105	8,1	121	88
Treadmill	353	44,5	442	264
E/A	1,43	0,075	1,58	1,28
E/e'	21,5	2,30	26,1	16,9
HW/TL	7,7	0,91	9,5	5,9
FEVI	> 60			

Animales HFpEF								
ID	Peso	Glucosa AUC	PAS	Treadmill	FEVI	E/A	E/e'	HW/TL
156	47,5	30570	132	139	82	1,74	34,7	9,7
157	45,6	44400	114	198	87	1,37	33,9	11,2
158	46,5	28410	122	168	91	1,44	26,9	8,8
162	37,7	21480	140	326	88	1,44	27,4	10,4
163	38,0	21188	130	274	90	1,73	27,3	9,8
495	42,3	38978	131	132	79	1,55	34,9	7,8
496	48,8	41640	106	88	79	1,26	29,8	8,9
498	37,9	30975	137	144	93	1,67	36,8	7,2
542	44,6	30713	112	101	89	1,46	29,1	9
543	46,7	31965	112	139	88	1,35	34,0	8,3
544	37,6	22350	115	158	Sin datos	1,57	30,3	6,8
547	27,2	22725	140	177	91	1,17	31,7	7,4

Los resultados que se muestran a continuación se analizaron utilizando aquellos animales que cumplieron con todos los criterios de inclusión establecidos.

4.1.2. Ingesta de agua y alimento

En la [Figura 4A](#) se observa que los animales tratados con HFD, ya sea en el grupo HFD o en el grupo HFpEF, consumieron significativamente menos alimento que el grupo control. Sin embargo, la ingesta calórica de los animales fue mayor en el caso de aquellos tratados con una dieta alta en grasa ([Figura 4B](#)). Respecto del consumo de agua diaria, se observó una disminución significativa en la cantidad de agua consumida en los grupos HFD y HFpEF. En el caso del grupo L-NAME, se observó una disminución similar, pero que no fue estadísticamente significativa ([Figura 4C](#)). Además, se observan los valores promedio para los parámetros mencionados, además de la masa corporal y de la dosis de L-NAME administrada, la cual fue distinta en el caso del grupo L-NAME en comparación con el grupo HFpEF, debido a la diferencia promedio en la masa del animal (104 vs 168 mg/Kg/día) ([Figura 4D](#)).

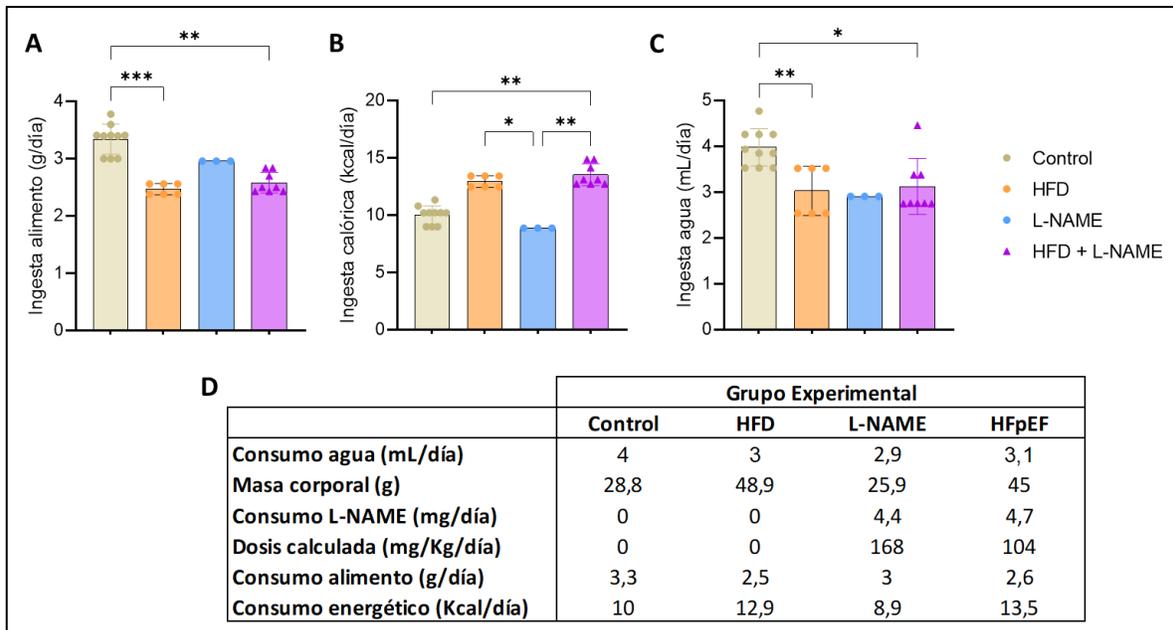


Figura 4. Consumo de agua, alimento y dosis de L-NAME en los animales utilizados. A, Ingesta diaria de alimento (g/día). B, ingesta calórica diaria (Kcal/día). C, ingesta diaria de agua (mL/día). D, valores promedio del consumo de agua (mL/día), la masa corporal (g), el consumo de L-NAME diario (mg/día), la dosis calculada de L-NAME (mg/Kg/día), consumo diario de alimento (g/día) e ingesta calórica (Kcal/día) de los distintos grupos experimentales utilizados. A-C, Se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar 3 o más grupos experimentales. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.3. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial e intolerancia al ejercicio

a) Obesidad: Los animales de los grupos HFD y HFpEF, presentaron un incremento significativo de la masa corporal ([Figuras 5A-B](#)), diferencia que se observó a partir de la semana 5 aproximadamente. No se observaron diferencias significativas al comparar el grupo L-NAME con el grupo control, ni entre los grupos HFD y HFpEF ([Figura 5B](#)). El grupo L-NAME fue significativamente distinto respecto de los grupos HFD y HFpEF ([Figura 5B](#)). Los incrementos de la masa corporal observados se acompañaron de un incremento tanto de la grasa visceral como de la grasa abdominal del animal (datos no mostrados).

b) Intolerancia a la glucosa: Los animales del grupo HFpEF presentaron un aumento significativo en la concentración de glucosa basal ([Figura 5C](#)). No se encontraron diferencias significativas en este parámetro al comparar los grupos HFD y L-NAME respecto del control. Adicionalmente, al someter los animales a una curva de tolerancia a la glucosa, se obtuvo un incremento significativo en el área bajo la curva (ABC) del grupo HFpEF respecto del control y respecto del grupo L-NAME ([Figura 5D](#)). En los grupos HFD y L-NAME no se encontraron diferencias significativas respecto del control ([Figura 5D](#)). Sin embargo, realizando un análisis exclusivamente entre los grupos control y HFD, se observó un aumento significativo en el ABC de este último (datos no mostrados).

c) Incremento de la presión arterial: Se observó un aumento significativo tanto de la PAS como de la PAD en el grupo HFpEF respecto del control ([Figuras 5E-F](#)), diferencia que además fue significativa respecto del grupo HFD en el caso de la PAS ([Figura 5E](#)). No se observaron diferencias significativas respecto del control en los grupos HFD y L-NAME, si bien la media de este último es comparable a aquella en el grupo HFpEF ([Figura 5E](#)). Las mismas diferencias observadas en la PAS se observaron al evaluar la PAM (datos no mostrados).

Los valores de PAS y PAD alcanzados producto del tratamiento fueron, en promedio, de 120 mmHg y de 90,5 mmHg, respectivamente.

d) Intolerancia al ejercicio: Al someter a los animales a un ensayo de tolerancia al ejercicio cuesta arriba, se observó una disminución significativa en la distancia recorrida en ambos grupos HFD y HFpEF respecto del control ([Figura 5G](#)). No se observaron diferencias significativas entre el grupo L-NAME y el grupo control. Tampoco se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida al comparar el grupo HFD con el grupo HFpEF ([Figura 5G](#)).

4.1.4. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan disfunción diastólica, manteniendo preservada la función sistólica

a) Función sistólica preservada: La función sistólica se evaluó a través de la fracción de eyección y la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FEVI y FAVI, respectivamente). No se observaron diferencias significativas ni en la FEVI ([Figuras 6A y 6D](#)), ni en la FAVI (datos no mostrados) entre ninguno de los grupos tratados.

b) Disfunción diastólica: La función diastólica se evaluó a través de las razones E/A y E/e' determinadas por ecocardiografía en animales anestesiados. No se encontraron diferencias significativas en la razón E/A entre los distintos grupos tratados (datos no mostrados). En cuanto a la razón E/e', se observó un aumento significativo en el grupo HFpEF en comparación con el control, sin presentar diferencias significativas respecto de los grupos HFD y L-NAME ([Figuras 6B-C, E](#)). No se observaron diferencias en los grupos HFD y L-NAME respecto del control ([Figuras 6B-C, E](#)).

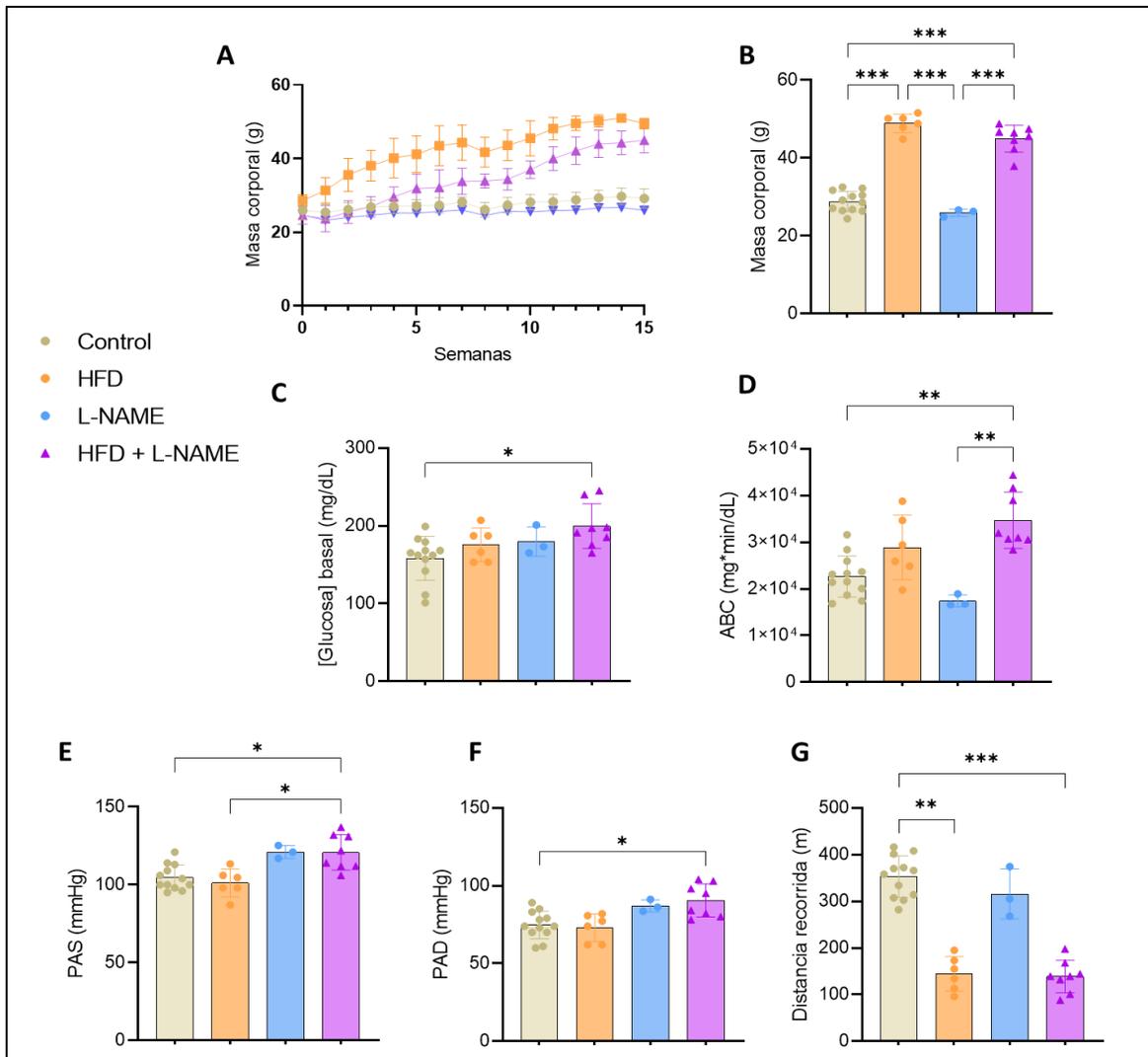


Figura 5. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial e intolerancia al ejercicio.

A, curva temporal de la masa corporal (g) de los animales durante las 15 semanas de tratamiento. **B**, masa corporal (g) de los animales a las 15 semanas de tratamiento. **C**, distancia recorrida (m) frente a un ensayo de agotamiento máximo cuesta arriba. **D**, glucosa en ayunas (mg/dL). **E**, área bajo la curva (ABC) de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TTG). **F**, presión arterial sistólica (mmHg). **G**, presión arterial diastólica (mmHg). **B-G**, se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

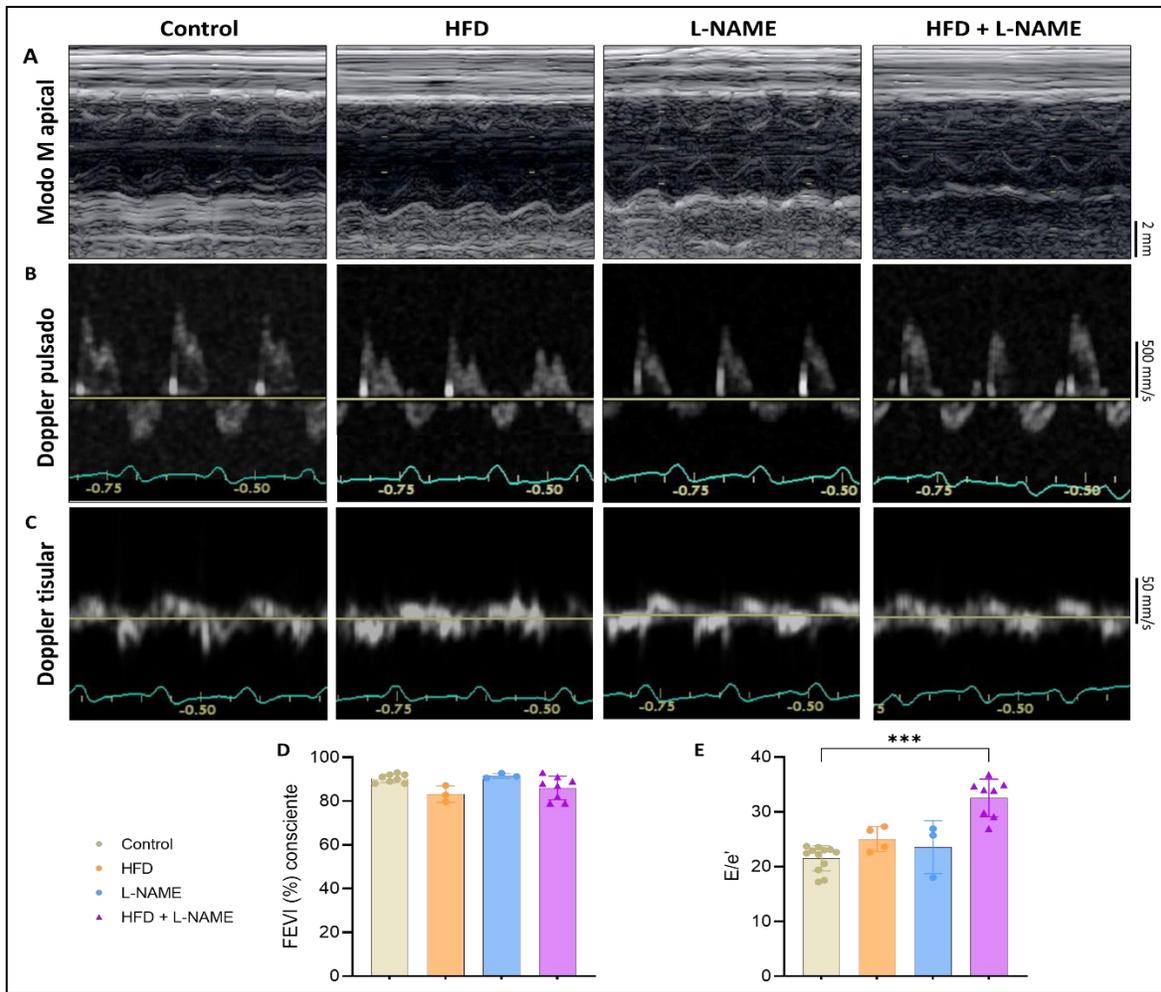


Figura 6. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas desarrollan disfunción diastólica, manteniendo preservada la función sistólica.

A, imágenes representativas de los análisis ecocardiográficos para función cardíaca sistólica de los grupos control, HFD, L-NAME y HFD + L-NAME (de izquierda a derecha), realizados en el modo M del eje corto apical del corazón en animales conscientes. **B** y **C**, imágenes representativas de la evaluación de la función cardíaca diastólica en los grupos control, HFD, L-NAME y HFD + L-NAME (de izquierda a derecha), determinada por ecocardiografía en Doppler pulsado (**B**) y Doppler tisular (**C**) en animales anestesiados con isoflurano 2%. **D**, razón E/e'. **E**, FEV1. **D, E**, Se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. *** $p < 0,001$.

4.1.5. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan hipertrofia y fibrosis cardiaca

La hipertrofia cardiaca se estudió evaluando la masa del corazón y el grosor de las paredes ventriculares, determinado por ecocardiografía en animales conscientes. Si bien se observa un aumento de la masa del corazón, normalizada por el largo de la tibia, respecto del control, ésta no fue significativa al realizar comparaciones múltiples a través de análisis por ANOVA. Sin embargo, esta diferencia si es significativa al comparar los grupos control y HFpEF a través de un T-Student (Figura 7F). No se observaron diferencias significativas en el tamaño del corazón de los grupos HFD y L-NAME respecto del control (Figura 7F). En cuanto al análisis ecocardiográfico, en el grupo HFpEF se observó un incremento significativo en el grosor tanto de la pared posterior (Figuras 7A-B) como de la pared anterior (Figuras 7A y 7C) del ventrículo izquierdo, respecto del grupo control y del grupo HFD. Estas diferencias no se observaron en el grupo HFD ni en el grupo L-NAME al compararlos con el control (Figuras 7A-C). Estas diferencias se mantuvieron al normalizar el grosor de las paredes por el largo de la tibia del animal (Figuras 7D-E). Finalmente, se observó un incremento significativo en la fibrosis cardiaca del grupo HFpEF respecto del control, representada por un aumento significativo del área positiva para PSR (Figuras 7G-H). No se analizó el grado de fibrosis de los grupos HFD y L-NAME.

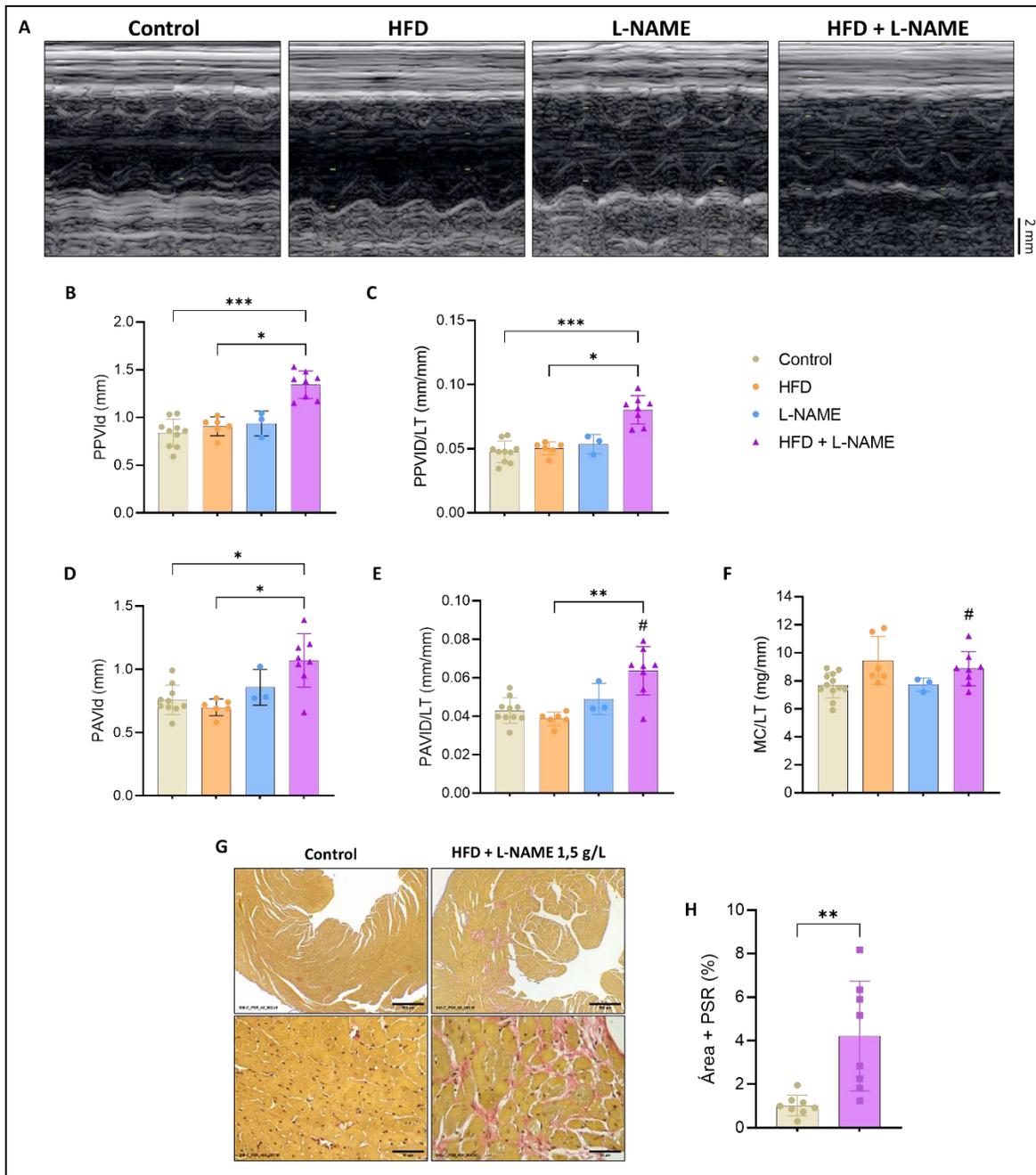


Figura 7. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan hipertrofia y fibrosis cardiaca.

A, Imágenes representativas de los análisis ecocardiográficos del grosor de las paredes posterior y anterior del ventrículo izquierdo de los grupos control, HFD, L-NAME y HFD + L-NAME (de izquierda a derecha), realizados en el modo M del eje corto apical del corazón en animales conscientes. **B**, grosor de la pared posterior (mm). **C**, grosor de la pared posterior normalizada por el largo de la tibia. **D**, grosor de la pared anterior (mm). **E**, grosor de la pared anterior

normalizada por el largo de la tibia. **F**, masa del corazón normalizada por el largo de la tibia. **G**, imágenes representativas de la determinación de la fibrosis cardíaca en cortes de corazón teñidos con PSR de animales control (izquierda) y HFD + L-NAME (derecha). Arriba: Imágenes con aumento 4x y barras de escala de 500 μm . Abajo: Imágenes con aumento 40x y barras de escala de 50 μm . **H**, cuantificación del área positiva para PSR. **B-F** y **H**, se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar 3 o más grupos experimentales, y t-Student de dos colas o Mann Whitney de dos colas, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar dos grupos experimentales. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # $p < 0,05$, t-Student vs control.

4.1.6. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan infiltrado inflamatorio en el parénquima pulmonar, sin presencia de edema ni alteraciones en el tamaño del pulmón

Para determinar la presencia de edema pulmonar, se determinó la masa del pulmón, normalizada por el largo de la tibia, y se evaluaron cortes histológicos teñidos con HE, cuantificado en grado de edema en el espacio alveolar y de infiltrado de células inflamatorias. No se encontraron diferencias significativas en la masa del pulmón de los grupos experimentales estudiados ([Figura 8A](#)). Al analizar los cortes de tejido, no se observó una formación importante de edema en el espacio alveolar ([Figuras 8B y 8D](#)), pero si se evidenció la presencia de infiltrado inflamatorio (focos de acumulación de células blancas) en los pulmones de los animales HFpEF, diferencia que fue estadísticamente significativa respecto del control ([Figuras 8C y 8D](#)).

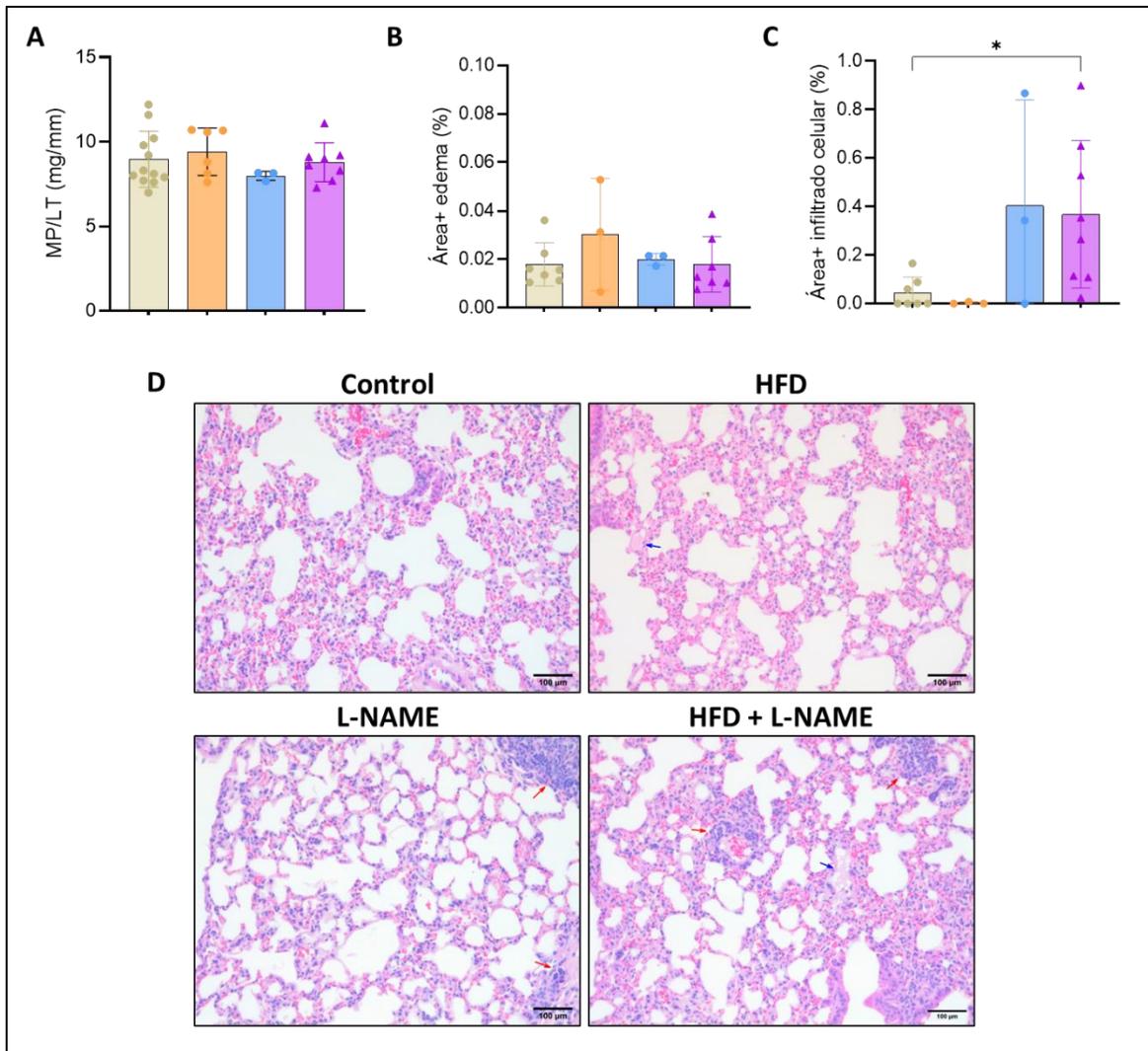


Figura 8. Ratones tratados con HFD y L-NAME durante 15 semanas presentan infiltrado inflamatorio en el parénquima pulmonar, sin presencia de edema ni alteraciones en el tamaño del pulmón.

A, masa del pulmón (mg) normalizada por el largo de la tibia. **B** y **C**, cuantificación del área de edema pulmonar (**B**, flechas azules) y de infiltrado inflamatorio celular (**C**, flechas rojas) en cortes de pulmón teñidos con hematoxilina-eosina para los grupos control (arriba, izquierda), HFD (arriba, derecha), L-NAME (abajo, izquierda) y HFD + L-NAME (abajo, derecha). Imágenes con aumento 40x. Barras de escala de 100 μ m. **A-C**, Se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$.

En conjunto, los datos anteriores evidencian una clara alteración en los parámetros metabólicos, la tolerancia al ejercicio y la función cardíaca de los animales tratados con HFD y L-NAME. Además, se observa hipertrofia y fibrosis cardíaca, en conjunto con un proceso inflamatorio en el tejido pulmonar. Por lo tanto, en este modelo murino de HFpEF se evidencian las principales características clínicas presentes en los pacientes HFpEF, es decir, obesidad, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, intolerancia al ejercicio, remodelado cardíaco (hipertrofia y fibrosis), y disfunción diastólica con función sistólica preservada. Se cumple de esta manera el primer objetivo propuesto en esta tesis, es decir, la implementación de un modelo murino de HFpEF en nuestro laboratorio.

4.2. Remodelado vascular de arterias mayores en ratones tratados con HFD + L-NAME

El remodelado vascular se evaluó determinando el grosor de la pared arterial y su relación con el área luminal, la presencia de fibrosis en la túnica media de la arteria y la expresión de proteínas contráctiles, determinadas a nivel de ARNm y de proteínas. Los resultados obtenidos se indican a continuación.

4.2.1. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas presentan remodelado vascular de las arterias aorta, carótida y femoral

Para el análisis del remodelado vascular se determinó el área y el diámetro del lumen, calculado en base al perímetro del lumen, y el grosor y el área de la capa media, comprendida entre la fibra elástica más externa y la más interna. Se reportan a continuación la razón área lumen calculado(c)/área de la media, el grosor de la media y la razón entre el grosor de la media/diámetro del lumen (M/L).

- a) Arteria aorta: Se observó una disminución significativa de la razón área lumen(c)/área media (Figuras 9A y 9C), así como un aumento significativo del grosor de la media (Figuras 9A y 9D) y de la razón M/L (Figuras 9A y 9E), en el

grupo HFpEF respecto del control. Estas diferencias no se observaron en el grupo HFD (Figuras 9A-E). Sin embargo, en el grupo L-NAME se observaron diferencias similares a aquellas observadas en el grupo HFpEF al analizar las razones área lumen(c)/área media y M/L, en ambos casos significativas respecto del control, pero no respecto del grupo HFpEF (Figuras 9A, 9C y 9E). No se encontraron diferencias en el grosor de la media del grupo L-NAME respecto del resto de los grupos estudiados.

- b) Arteria carótida: Se observó una disminución significativa de la razón área lumen(c)/área media (Figuras 9B y 9F), así como un aumento significativo del grosor de la media (Figuras 9B y 9G) y de la razón M/L (Figuras 9B y 9H), en el grupo HFpEF respecto del control. No se encontraron diferencias significativas en el grupo HFD respecto del control (Figuras 9B y 9F-H). Sin embargo, las diferencias observadas en el grupo HFpEF fueron significativas tanto respecto del control como del grupo HFD (Figuras 9B y 9F-H). En el caso de grupo L-NAME, solo se cuenta con 2 réplicas experimentales, por lo que este grupo fue excluido del análisis estadístico.
- c) Arteria femoral: Se observó un aumento significativo del grosor de la media respecto del control (Figura 10A y 10C). Si bien no se encontraron diferencias significativas en el área del lumen(c)/área media (Figuras 10A-0B) y en la razón M/L (Figuras 10A y 10D) al realizar comparaciones múltiples a través de análisis por ANOVA, estas sí fueron significativas al comparar los grupos control y HFpEF a través de un t--Student (Figuras 7A-B y 7D). No se observaron diferencias significativas respecto del control en los grupos HFD y L-NAME.

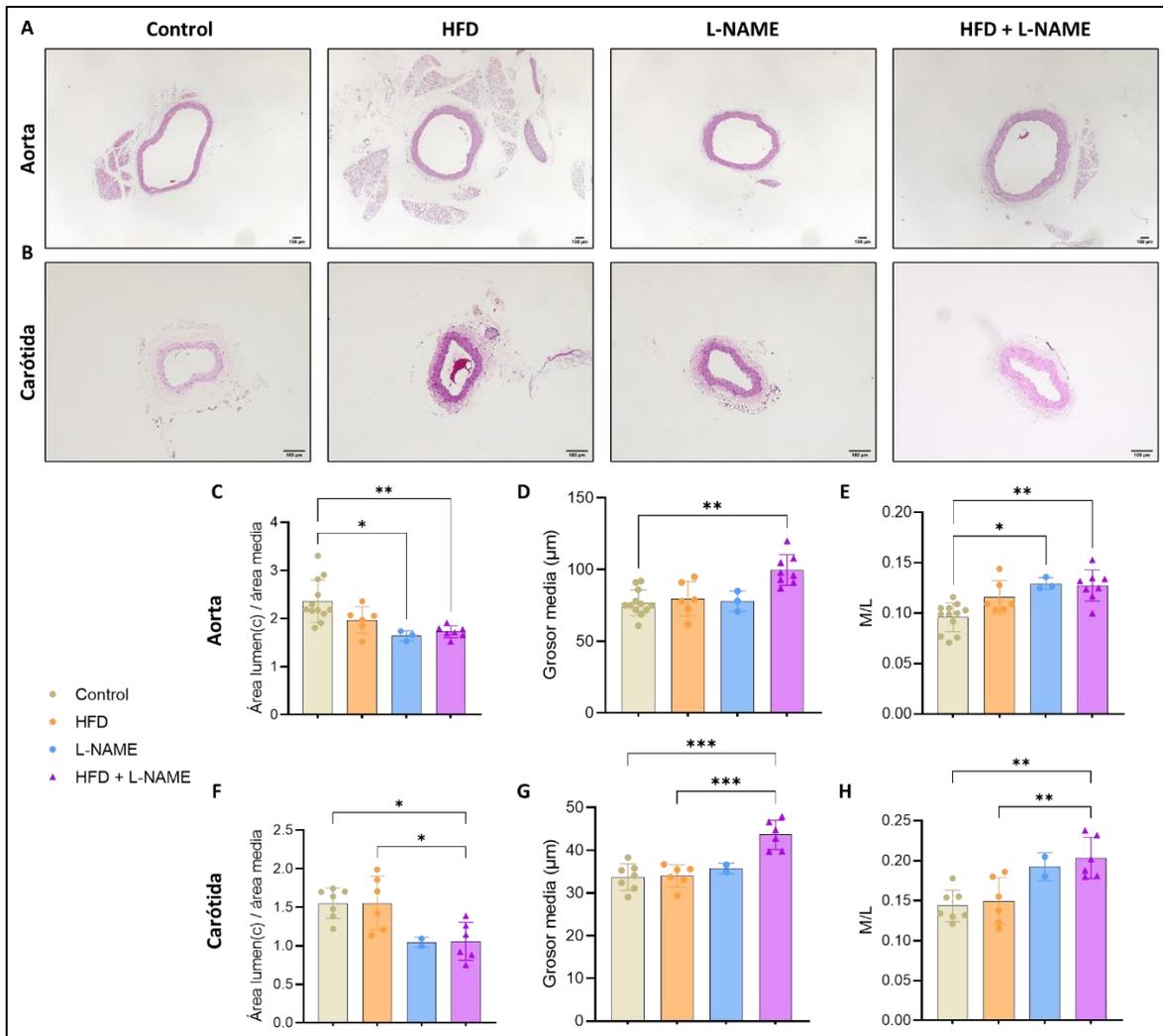


Figura 9. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas presentan remodelado vascular de las arterias aorta y carótida.

A y B, imágenes representativas de los cortes transversales de arterias aorta (**A**) y carótida (**B**), teñidos con hematoxilina-eosina, de los grupos control (izquierda), HFD (al centro, izquierda), L-NAME (al centro, derecha) y HFD + L-NAME (derecha). Imágenes tomadas con aumento 4x. Barras de escala de 100 µm. **C-H**, cuantificación de la razón área lumen calculado/área media (**C, F**), grosor (µm) de la media (**D, G**) y razón M/L (**E, H**), de las arterias aorta (**C-E**) y carótida (**F-H**). **C-H**, Se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

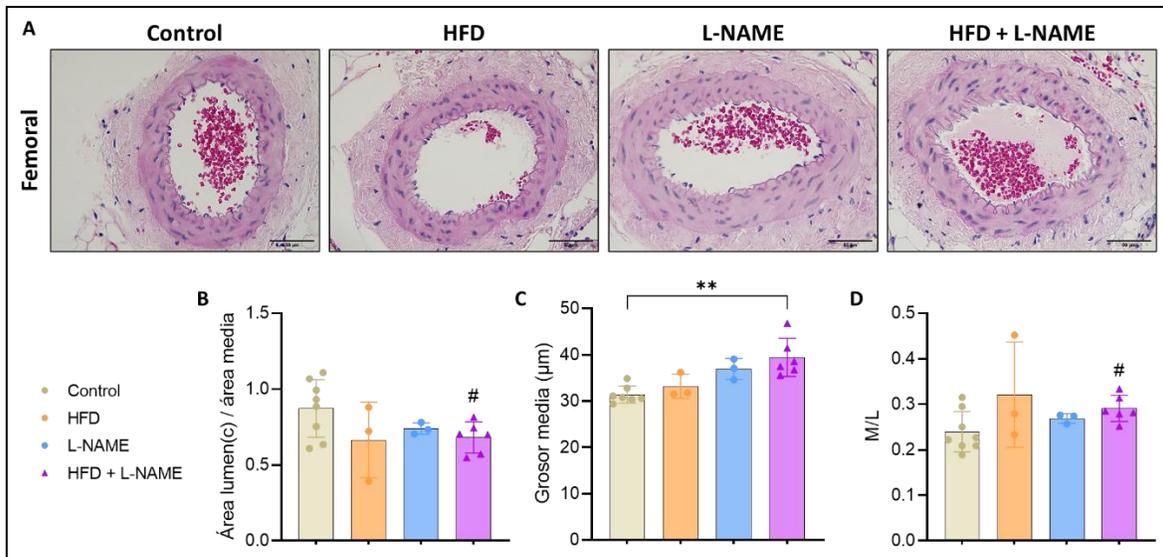


Figura 10. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas presentan un aumento en el grosor de la capa media de la arteria femoral.

A, imágenes representativas de los cortes transversales de arteria femoral, teñidos con hematoxilina-eosina, de los grupos control (izquierda), HFD (al centro, izquierda), L-NAME (al centro, derecha) y HFD + L-NAME (derecha). Imágenes tomadas con aumento 40x. Barras de escala de 50 µm. **B-D**, cuantificación de la razón área lumen calculado/área media (**B**), grosor (µm) de la media (**C**) y razón M/L (**D**), de la arteria femoral. **B-D**, se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. ** $p < 0,01$.

4.2.2. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas desarrollan fibrosis de la arteria aorta

- a) Arteria aorta: Se observó un incremento significativo en el porcentaje de área de la media positivo para PSR en el grupo HFpEF respecto del control ([Figuras 11^a-B](#)). Interesantemente, si bien se detectó un incremento en los grupos HFD y L-NAME respecto del control, estos no fueron significativos, observándose un efecto sinérgico entre ambos grupos. En concordancia con lo anterior, se determinaron los niveles de COL1A1 por Western blot, y se observó un aumento significativo en los niveles de COL1A1 en el grupo HFpEF ([Figuras 11C-D](#)). Los grupos HFD y L-NAME no fueron analizados por esta técnica.
- d) Arteria carótida: Si bien se observa un incremento en el área positiva para PSR de la capa media de las arterias carótidas en el grupo HFpEF respecto del control, estos no fueron estadísticamente significativos ([Figuras 12A y 12C](#)). No se observaron diferencias significativas en el grupo HFD respecto del control ([Figuras 12A y 12C](#)). En el caso de grupo L-NAME, solo se cuenta con 2 réplicas experimentales, por lo que este grupo fue excluido del análisis estadístico.
- e) Arteria femoral: No se observaron diferencias significativas en el área positiva para PSR de la capa media de las arterias femorales en ninguno de los grupos experimentales estudiados ([Figuras 12A y 12D](#)).

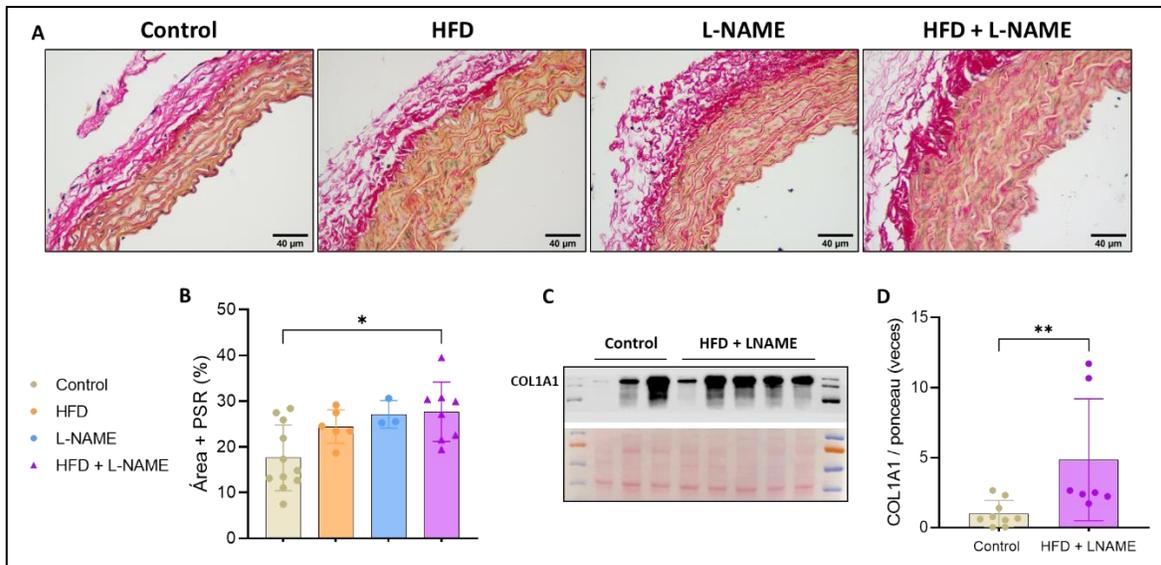


Figura 11. Ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas desarrollan fibrosis en la arteria aorta.

A, imágenes representativas de cortes transversales de arteria aorta, teñidas utilizando la tinción PSR de los grupos control (izquierda), HFD (al centro, izquierda), L-NAME (al centro, derecha) y HFD + L-NAME (derecha). **B**, porcentaje del área de la media positivo para PSR en la arteria aorta. Imágenes tomadas con aumento 40x. Barras de escala de 40 μ m. **D**, imagen representativa de la determinación de los niveles de COL1A1 por Western blot a partir de lisados de proteínas de arterias aorta. **E**, cuantificación densitométrica de los resultados obtenidos por Western blot. **B** y **D**, se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar 3 o más grupos experimentales, y t-Student de dos colas o Mann Whitney de dos colas, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar dos grupos experimentales. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$.

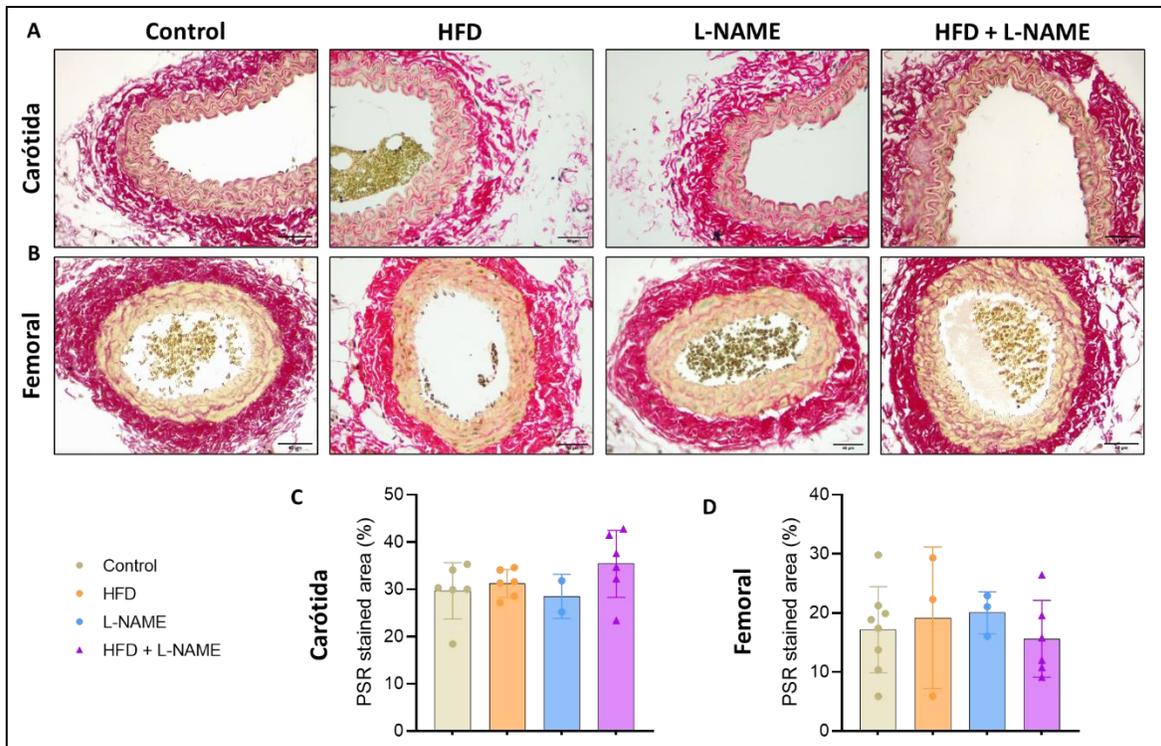


Figura 12. Ratonés tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas no desarrollan fibrosis en las arterias carótida y femoral.

A y B, imágenes representativas de cortes transversales de arterias carótida (**A**) y femoral (**B**), teñidas utilizando la tinción de PSR, de los grupos control (izquierda), HFD (al centro, izquierda), L-NAME (al centro, derecha) y HFD + L-NAME (derecha). Imágenes tomadas con aumento de 40x. Barras de escala de 40 μ m. **C, D.** análisis del porcentaje del área de la media positivo para PSR de las arterias carótida (**C**) y femoral (**D**). **C-D,** se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar 3 o más grupos experimentales. Los valores corresponden al promedio \pm D.S.

4.2.3. Expresión génica de proteínas contráctiles en arterias de ratones tratados con HFD + L-NAME

Para la determinación de la expresión génica, se realizó la estandarización de los partidores para los genes *Acta2* (α SMA), *Tagln* (SM22) y β -actina, a través de la generación de curvas estándar a distintas concentraciones de ADNc templado. En la [Figura 14](#) se observan las diferentes curvas obtenidas y en la [Tabla 3](#) se indican las secuencias de los partidores, las concentraciones finales a las que se utilizaron y la eficiencia obtenida para cada uno de ellos a partir de las curvas estándar.

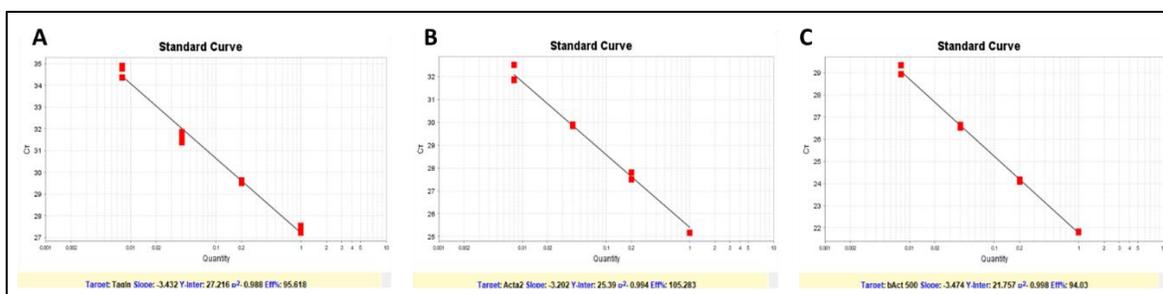


Figura 13. Estandarización de los partidores utilizados para la determinación de *Acta2*, *Tagln* y β -actina por RT-qPCR.

A-C, Se muestran las curvas estándar obtenidas para la determinación de la eficiencia de los partidores utilizados para la evaluar los niveles de expresión génica de las proteínas SM22 (*Tagln*) (**A**), α SMA (*Acta2*) (**B**) y β -actina (**C**). Se realizó una curva de 4 puntos, utilizando diluciones seriadas de 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 a partir de una muestra de 1000 ng de ADNc. El análisis se realizó utilizando el programa StepOne™ de Life Technologies.

Tabla 5. Secuencias, concentración y eficiencia de los partidores utilizados en RT-qPCR.

Utilizando el método de la curva estándar (Figura 14), se realizó la determinación de la eficiencia de los genes *Tagln*, *Acta 2* y β -actina. Se indica la concentración a la cual se realizó la estandarización y la eficiencia (%) obtenida.

Gen (proteína)	Secuencia	Conc. (nM)	Eficiencia obtenida (%)
<i>Tagln</i> (SM22)	Fw 5'-CTATGAAGGTAAGGATATGGC-3' Rv 5'-TCTGTGAAGTCCCTCTTATG-3'	500	95,6
<i>Acta2</i> (α SMA)	Fw 5'-CATCTTTTCATTGGGATGGAG-3' Rv 5'-TTAGCATAGAGATCCTTCCTG-3'	500	105,3
<i>Actb</i> (β Actina)	Fw 5'-GATGTATGAAGGCTTTGGTC-3' Rv 5'-TGTGCACTTTTATTGGTCTC-3'	1000	100,1

- a) Arteria aorta: Se encontró una disminución en los niveles de *Acta2* en el grupo HFpEF respecto del control, la que cual fue significativa únicamente al comparar ambos grupos por t-Student (Figura 14A). Si bien se observó una disminución de los niveles de *Acta2* en los grupos HFD y L-NAME, ésta no fue estadísticamente significativa, observándose nuevamente un efecto sinérgico entre ambos grupos (Figura 14A). En el caso de la expresión de *Tagln*, si bien se observó una disminución en los grupos L-NAME y HFpEF, éstas no fueron significativas respecto del control (Figura 14D). Tampoco se observaron diferencias en los grupos HFD ni L-NAME.
- b) Arteria carótida: Se encontró una disminución en los niveles de *Acta2* como de *Tagln* al comparar el grupo HFpEF con el grupo control por t-Student (Figuras 14B y 14E). Estas diferencias no fueron significativas al realizar análisis de comparaciones múltiples por ANOVA. No se observaron diferencias en ninguno de los genes estudiados en el grupo HFD respecto de los otros grupos (Figuras 14B y 14E). En el caso del grupo L-NAME, solo se cuenta con 2 réplicas experimentales debido a la eliminación de datos atípicos, por lo que este grupo fue excluido del análisis estadístico.
- c) Arteria femoral: En el caso de la arteria femoral, se estudiaron únicamente los grupos control y HFpEF. Se observó un incremento significativo tanto en la expresión de *Acta2* como de *Tagln* al comparar ambos grupos (Figuras 14C y 14F).

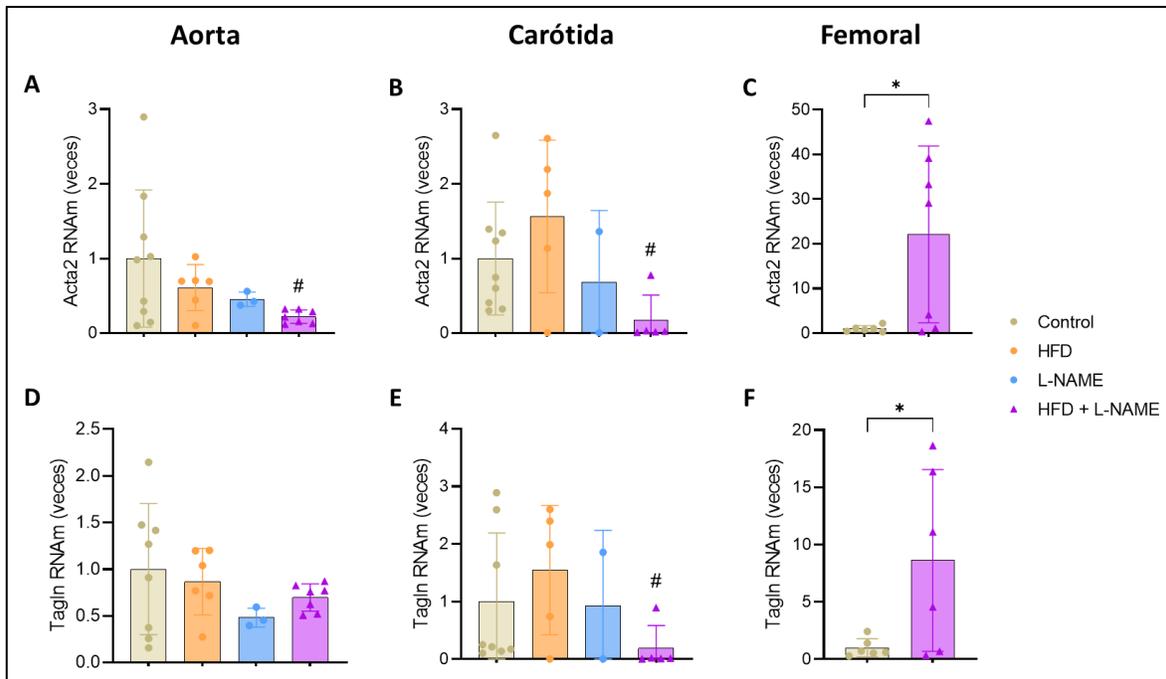


Figura 14. Expresión génica de las proteínas contráctiles α SMA y SM22 de las arterias aorta, carótida y femoral de ratones tratados con HFD y L-NAME.

A-F, Niveles de ARNm relativos de *Acta2* (**A-C**) y *Tagln* (**D-F**) de las arterias aorta (**A, D**), carótida (**D, E**) y femoral (**C, F**), normalizados utilizando β -actina como control endógeno. **A-F,** se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar 3 o más grupos experimentales, y t-Student de dos colas o Mann Whitney de dos colas, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente, al comparar dos grupos experimentales. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$. # $p < 0,05$ t-Student vs control.

4.2.4. Niveles de proteínas contráctiles en arterias aorta de ratones tratados con HFD + L-NAME

Los niveles de proteínas contráctiles se determinaron a través de ensayos de Western blot de lisados de proteínas de la arteria aorta. Se estudiaron en esta oportunidad exclusivamente los grupos control y HFpEF. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna las proteínas contráctiles estudiadas: α SMA ([Figura 16A](#)), SM22 ([Figura 16B](#)) y calponina ([Figura 16C](#)). Los mismos resultados se observaron al normalizar por β -tubulina en vez de las proteínas totales teñidas con rojo de Ponceau (datos no mostrados).

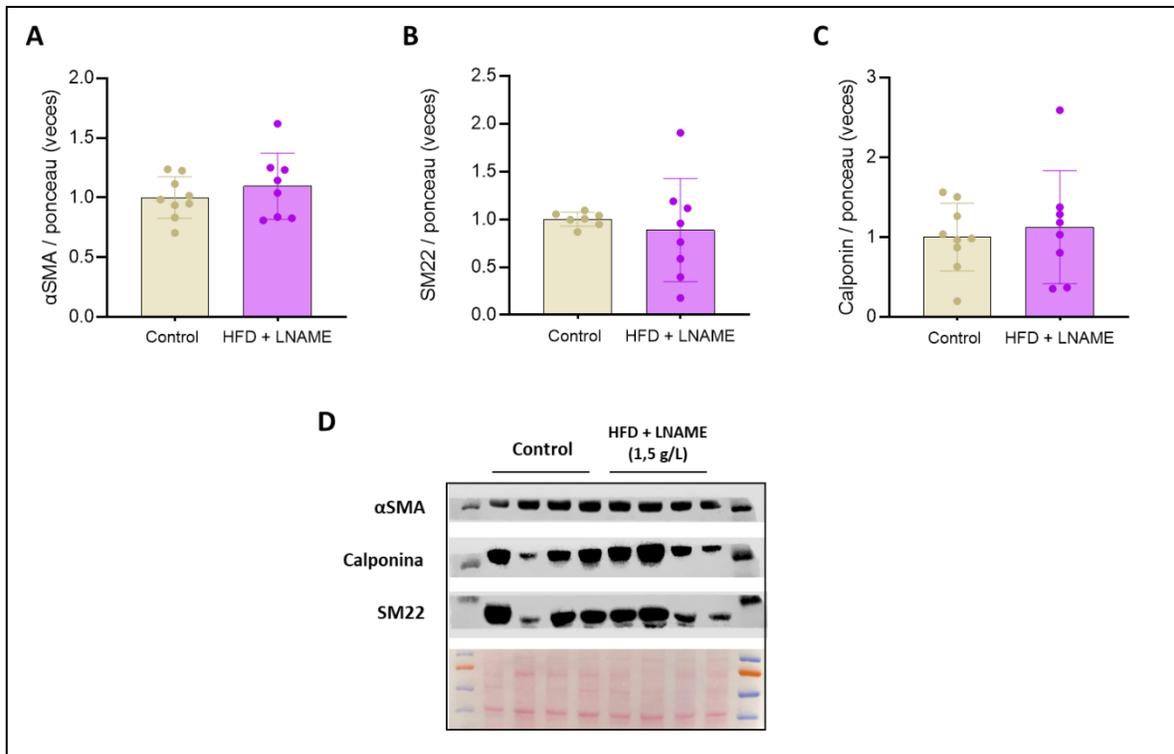


Figura 15. Niveles relativos de las proteínas contráctiles α SMA, SM22 y calponina en arterias aorta de ratones tratados con HFD + L-NAME.

A-C, análisis de la cuantificación densitométrica de los resultados obtenidos para α SMA (**A**), SM22 (**B**) y Calponina (**C**), de lisados de proteínas de arterias aorta sometidos a ensayos de Western blot. Los resultados se analizaron utilizando la tinción de proteínas con rojo de Ponceau como control de carga. **D**, imágenes representativas de los resultados obtenidos. **A-C**, se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando t-Student de dos colas o Mann Whitney de dos colas, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S.

4.2.5. Estudios de correlación entre los datos obtenidos

- a) **En ratones tratados con HFD y L-NAME por 15 semanas se observa una correlación entre la PAS y la función cardíaca diastólica, la tolerancia al ejercicio y la hipertrofia cardíaca:** Se observó una correlación positiva significativa entre la PAS y la razón E/e' ($r=0,7494$; $p < 0,001$, Figuras 16A-C) y una correlación negativa significativa entre la PAS y la tolerancia al ejercicio ($r=-0.6229$; $p = 0,003$, Figuras 16A-B y 16D), que en conjunto dan cuenta de una correlación entre el grado de insuficiencia cardíaca diastólica y la presión arterial. En concordancia con lo anterior, se observó una correlación positiva significativa entre la PAS y el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo ($r=0,5510$; $p = 0,02$, Figuras 16B y 16E). Además, se observó una correlación leve entre el grado de fibrosis cardíaca y la PAS, si bien esta no fue significativa ($r=0,4444$; $p=0,08$, Figuras 16A-B y 16F).
- b) **En ratones tratados con HFD y L-NAME se observa una correlación entre el grosor de la pared arterial y el grado de disfunción diastólica, la distancia recorrida y la fibrosis cardíaca:** Se observó una correlación positiva significativa entre la razón E/e' y el grosor de la pared de las arterias aorta ($r=0,7910$; $p < 0,001$, Figuras 17A-B y 17F), carótida ($r=0,7936$; $p=0,001$, Figuras 17A-B y 17F) y femoral ($r=0,7554$; $p=0,004$, Figuras 17A-B y 17F). En concordancia con lo anterior, se encontró una correlación negativa significativa entre la tolerancia al ejercicio y el grosor de la pared de las aortas ($r=-0,8169$; $p < 0,001$, Figuras 17A, 17C y 17F), carótida ($r=-0,7216$; $p=0,005$, Figuras 17A, 17C y 17F) y femoral ($r=-0,6782$; $p=0,02$, Figuras 17A, 17C y 17F). Por otro lado, se comparó el grado de fibrosis del corazón con el de las arterias estudiadas y se encontró una correlación positiva significativa entre la fibrosis cardíaca y la fibrosis de las arterias aorta ($r=0,5651$; $p=0,003$, Figuras 17D, 17E y 17G) y carótida ($r=0,7284$; $p=0,03$, Figuras 17D, 17E y 17G). Si bien se observó una correlación entre la fibrosis cardíaca y la fibrosis de la arteria femoral, esta no fue estadísticamente significativa ($r=0,5099$; $p=0,16$, Figuras 17D, 17E y 17G).

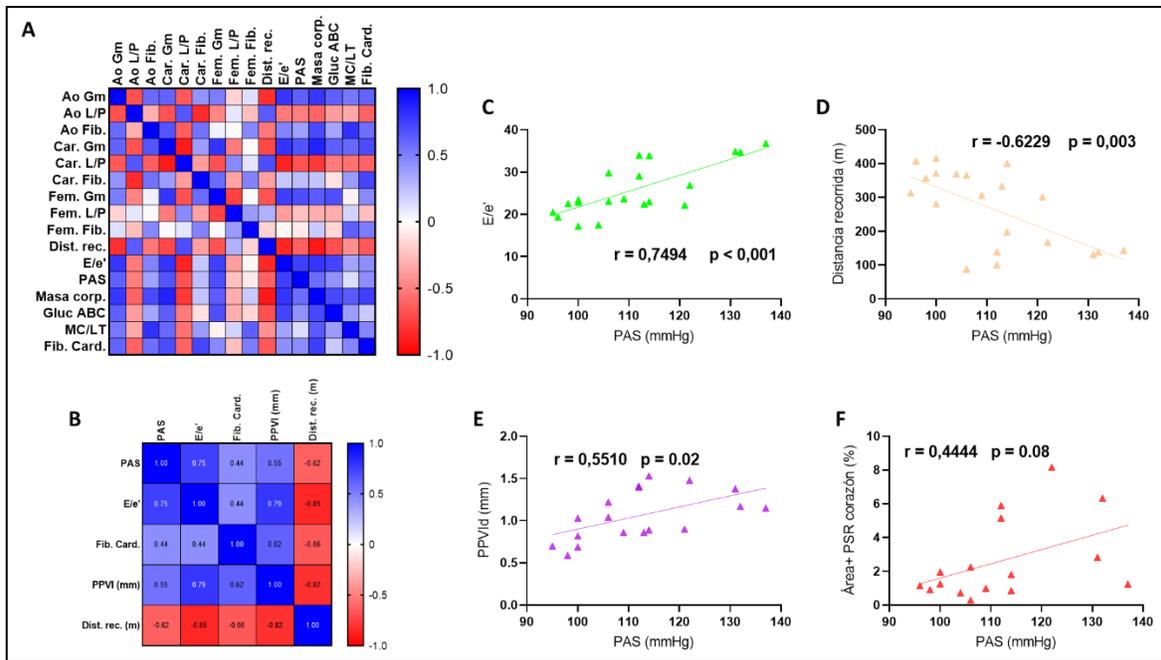


Figura 16. Estudios de correlación de los datos obtenidos de ratones tratados con HFD y L-NAME: correlación entre la PAS y parámetros de función, estructura cardíaca y tolerancia al ejercicio.

A, matriz de correlación obtenida al analizar los datos de grosor de la media (Gm), razón lumen/pared (L/P) y grado de fibrosis (Fib.), de las arterias aorta (Ao), carótida (Car.) y femoral (Fem.), la distancia recorrida (Dist. rec.), la razón E/e', la PAS, la masa corporal (masa corp.), el área bajo la curva de la curva de tolerancia a la glucosa (Gluc. ABC), el tamaño del corazón normalizado por la tibia (MC/LT) y el grado de fibrosis cardíaca (Fib. Card.). La intensidad del color representa la fuerza de correlación entre ambos datos. **B**, matriz de correlación obtenida de (A), donde se compra la PAS con la función y estructura cardíaca. **C**, correlación entre la PAS y la razón E/e'. **D**, correlación entre la PAS y la distancia recorrida. **E**, correlación entre la PAS y el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (mm). **F**, correlación entre la PAS y el grado de fibrosis cardíaca. Se reporta el coeficiente de Pearson (r), obtenido utilizando el programa GraphPad Prism™. La correlación se considera significativa si $p < 0,05$.

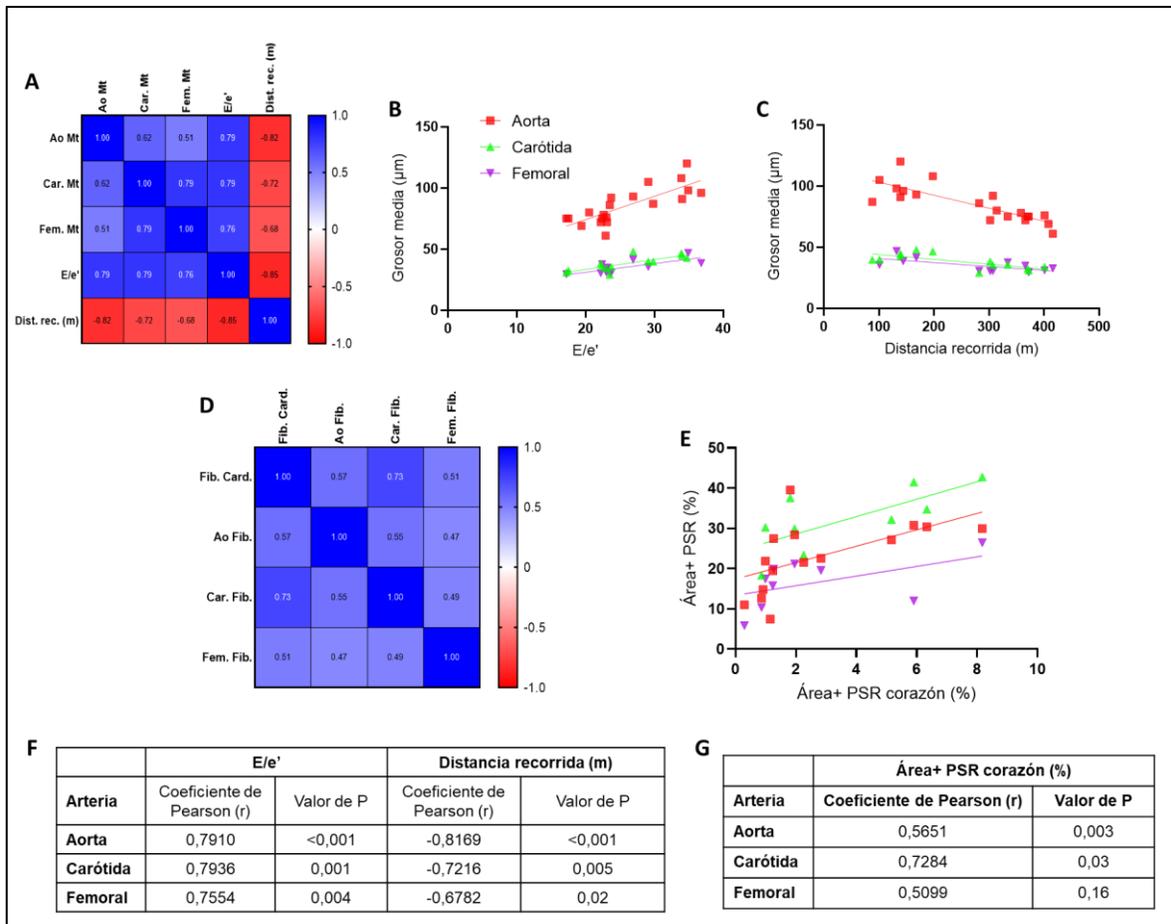


Figura 17. Estudios de correlación de los datos obtenidos de ratones tratados con HFD y L-NAME: correlación entre el grosor de la pared arterial y función cardiaca y entre la fibrosis arterial y cardiaca.

A, matriz de correlación donde se compara la razón E/e' (**B**) y la distancia recorrida (**C**) con el grosor de la media de las arterias aorta (rojo), carótida (verde) y femoral (morado). **D** y **E**, matriz de correlación donde se compara el grado de fibrosis del corazón con el grado de fibrosis de las arterias aorta (rojo), carótida (verde) y femoral (morado). **F**, **G**. Se reporta el coeficiente de Pearson (r), obtenido utilizando el programa GraphPad Prism™, para las correlaciones evaluadas en **B** y **C** (**F**) y en **E** (**G**). La correlación se considera significativa si $p < 0,05$.

Los datos presentados en la sección 4.2 indican por primera vez que se produce remodelado vascular en un modelo preclínico de HFpEF, caracterizado por incremento en el grosor de la pared de las arterias aorta, carótida y femoral y el desarrollo de fibrosis en la arteria aorta. Además, estos datos se correlacionan de manera significativa con la insuficiencia cardiaca diastólica y el grado de fibrosis cardiaca reportada en el punto 4.1. En conjunto, los datos presentados cumplen con lo propuesto en el segundo objetivo de esta tesis, demostrando que se produce remodelado vascular y fibrosis en el modelo murino de HFpEF utilizado.

4.3. Efecto del tratamiento con palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de VSMC

Para determinar el efecto del tratamiento de una combinación de palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de VSMC, en primera instancia se evaluó el efecto de ambos estímulos por separado y en conjunto sobre la viabilidad celular utilizando curvas dosis respuesta. Se determinó la viabilidad celular por ensayos de MTT, exclusión de azul de Tripán e incorporación de PI. Posteriormente, se estudiaron los niveles de proteínas contráctiles, ciclina D1 y COL1A1 por Western blot, y la proliferación celular por ensayos de inmunocitoquímica de Ki67. Los hallazgos encontrados se reportan a continuación.

4.3.1. Estandarización de las concentraciones de palmitato y L-NAME en VSMC

- a) Tratamiento con palmitato: Se observó una disminución significativa de la viabilidad celular frente al tratamiento con palmitato 5 nM tanto en el ensayo de MTT (Figura 18A) como en el ensayo de exclusión de azul de Tripán (Figura 18B). Del mismo modo, se observó una disminución al utilizar una concentración de 3 nM, siendo significativa únicamente en el ensayo de exclusión de azul de Tripán (Figuras 18A-B). En el caso de la incorporación

de yoduro de propidio, se observó un incremento dosis dependiente de en el porcentaje de células PI⁺. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ([Figura 18C](#)).

- b) Tratamiento con L-NAME: En los ensayos de MTT, se observó una marcada disminución en la viabilidad celular con L-NAME 1, 5 y 10 mM, significativa solo en el caso de la concentración de 10 mM ([Figura 18D](#)). No se observaron diferencias significativas en el ensayo de exclusión de azul de Tripán en ninguna de las 3 concentraciones utilizadas ([Figura 18E](#)). Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células PI⁺, aunque si se observó un importante incremento en la concentración de 10 mM ([Figura 18F](#)). Es importante destacar que el tratamiento de 10 mM con L-NAME generó alteraciones morfológicas importantes en las células, evidenciados tanto al microscopio de contraste de fase como en los análisis por citometría de flujo (datos no mostrados).
- c) Tratamiento con palmitato y L-NAME: En base a los resultados obtenidos de los tratamientos individuales, se decidió trabajar con palmitato 1 nM y L-NAME 5 mM. Se observó una disminución significativa en el ensayo de MTT frente al tratamiento simultáneo con palmitato y L-NAME ([Figura 18G](#)). Sin embargo, esto no era concordante con lo observado al microscopio, donde parecía mantenerse la integridad de las células (datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas en el ensayo de exclusión de azul de Tripán al comparar las células tratadas con palmitato y L-NAME en forma simultánea con el control ([Figura 18H](#)). Si se observó una disminución leve pero significativa en la viabilidad celular frente al tratamiento con palmitato ([Figura 18H](#)). Respecto del ensayo de incorporación de PI, se observó un incremento de aproximadamente un 12% en la incorporación de PI al tratar las células con palmitato y L-NAME ([Figura 18I](#)). No se observaron diferencias en este ensayo la tratar las células con palmitato o L-NAME por separado.

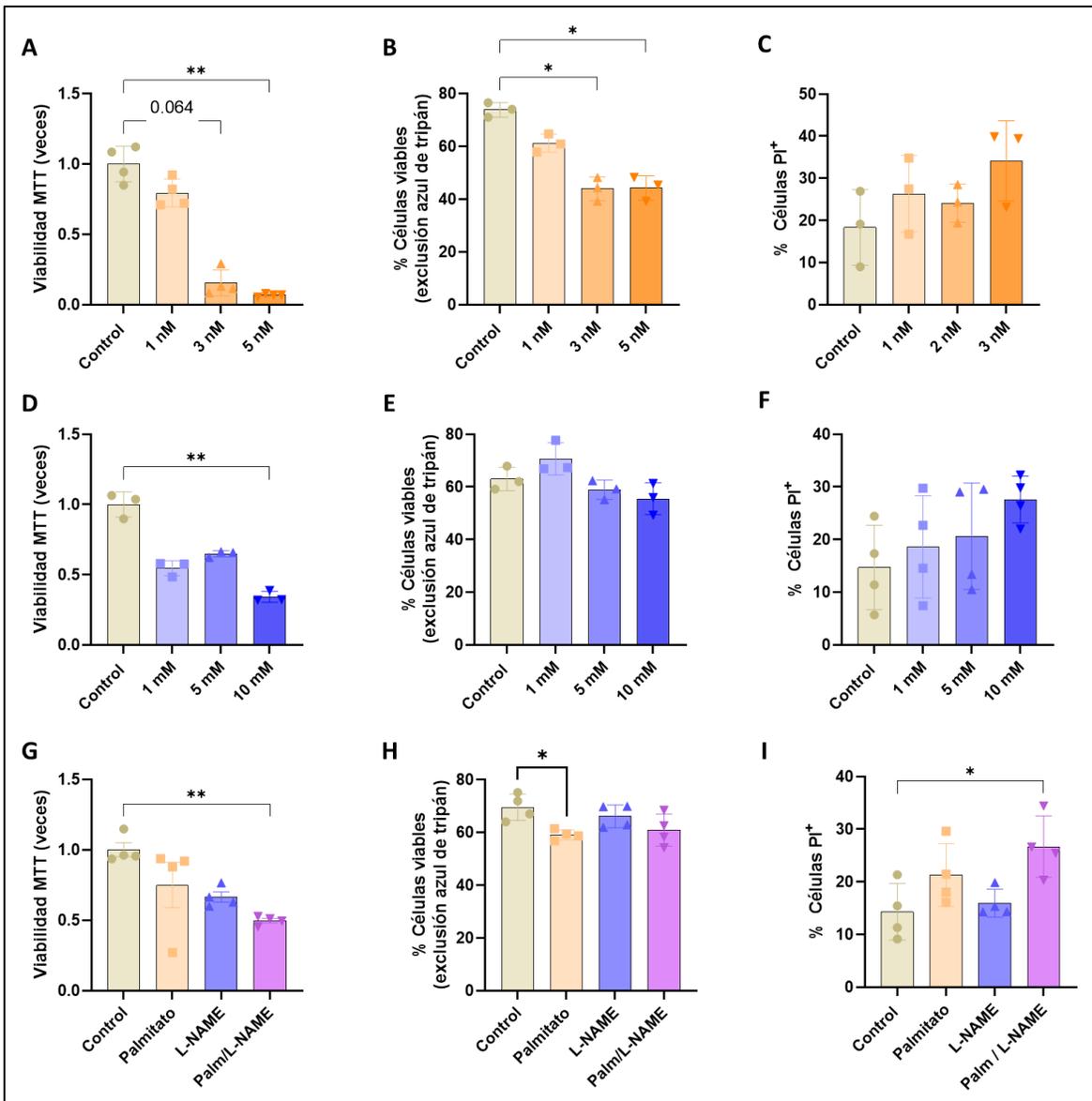


Figura 18. Determinación de la viabilidad celular de células musculares lisas vasculares A7r5 frente al tratamiento con palmitato y/o L-NAME a distintas concentraciones.

Las células se estimularon con concentraciones crecientes de palmitato (1-5 nM) y/o L-NAME (1-10 nM) durante 48 h. **A-I**, Análisis de la viabilidad celular frente al tratamiento con palmitato (**A-C**), L-NAME (**D-F**) o palmitato + L-NAME (**G-I**). **A, D y G**, análisis cuantitativo del ensayo de MTT, reportado como veces de cambio respecto del control. **B, E y H**, análisis del porcentaje de células viables por exclusión de azul de Tripán. **C, F e I**, determinación de la incorporación de yoduro de propidio (PI) por citometría de flujo. Se reporta el % de células PI⁺. **G-I**, tratamientos realizados usando palmitato 1 nM y L-NAME 5 mM. **A-I**, se muestran

resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.2. Niveles de proteínas contráctiles y COL1A1 en VSMC tratadas con palmitato y L-NAME

El tratamiento con palmitato 1 nM y L-NAME 5 mM en forma simultánea generó una disminución en los niveles de las proteínas contráctiles α SMA (Figuras 19A-B) y calponina (Figuras 19A-D). Si bien también se observó una disminución en los niveles de SM22, éstos no fueron estadísticamente significativos (Figuras 19A y 19E). En el tratamiento con L-NAME se observó una disminución significativa en los niveles de calponina (Figuras 19A y 19D), efecto no observado en las otras proteínas contráctiles estudiadas (Figuras 19B y 19E). Adicionalmente, el tratamiento conjunto generó una disminución significativa en los niveles de COL1A1 respecto del control (Figuras 19A y 19C). Una disminución de magnitud similar en los niveles de colágeno se observó al tratar las células con palmitato o con L-NAME por separado (Figuras 19A y 19C).

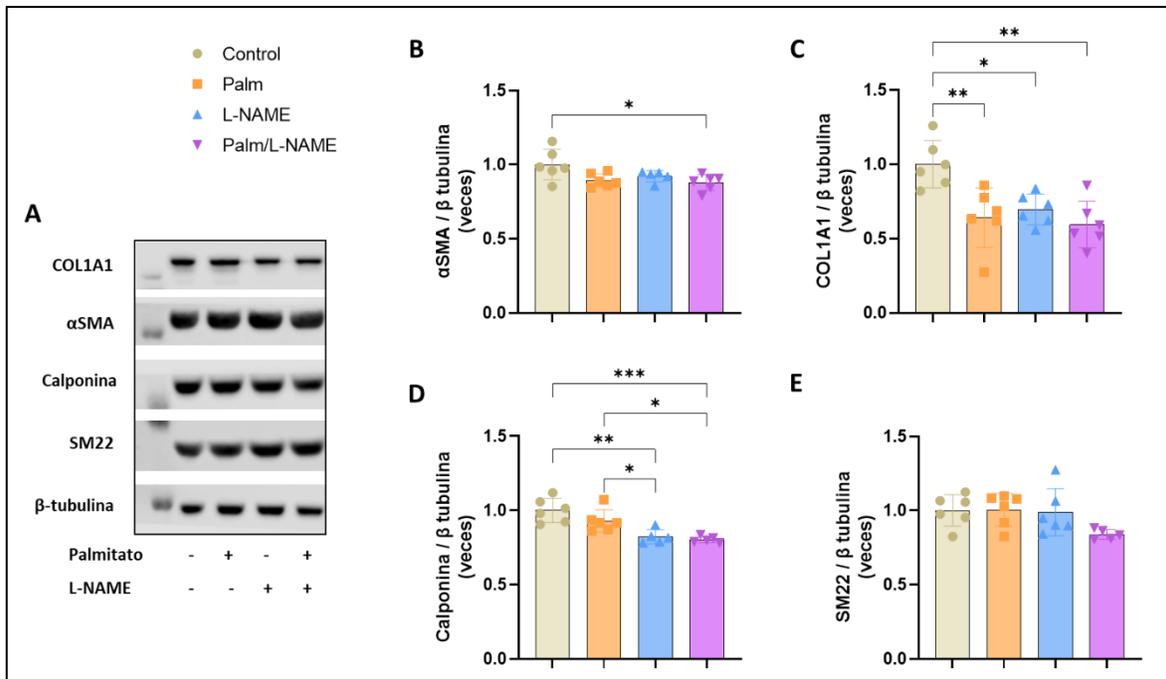


Figura 19. Niveles relativos de las proteínas contráctiles α SMA, SM22 y calponina y de los niveles de COL1A1 de células A7r5 tratadas con un palmitato y L-NAME durante 48 h.

A, imagen representativa de los resultados obtenidos en las células al tratarlas con palmitato 1 μ M, L-NAME 5 mM y palmitato 1 nM + L-NAME 5 mM durante 48 h. **B-E**, análisis de la cuantificación densitométrica de los resultados obtenidos para α SMA (**B**), COL1A1 (**C**), calponina (**D**) y SM22 (**E**), determinados por Western blot utilizando β -tubulina como control de carga para normalizar los valores obtenidos. **B-E**, se muestran resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.3. Proliferación celular en VSMC tratadas con palmitato y L-NAME

Al tratar las células con palmitato, L-NAME, o ambos en conjunto, no se observaron diferencias significativas respecto del control al analizar la cantidad de células Ki67+ (Figuras 20A-B). Tampoco se observaron diferencias entre los distintos grupos. No obstante, sí se observó una disminución significativa de los niveles de ciclina D1, determinados por Western blot, en el tratamiento conjunto con palmitato y L-NAME (Figuras 19C-D). No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales ni al comparar los tratamientos con palmitato o L-NAME por si solos con el control, si bien se observa un aparente efecto sinérgico entre ambos tratamientos.

En su conjunto, los datos descritos en el punto 4.3 permiten concluir que el tratamiento con palmitato y L-NAME induce alteraciones fenotípicas en VSMC, reportado por primera vez en la literatura, cumpliéndose de esta forma con el tercer objetivo propuesto en esta tesis.

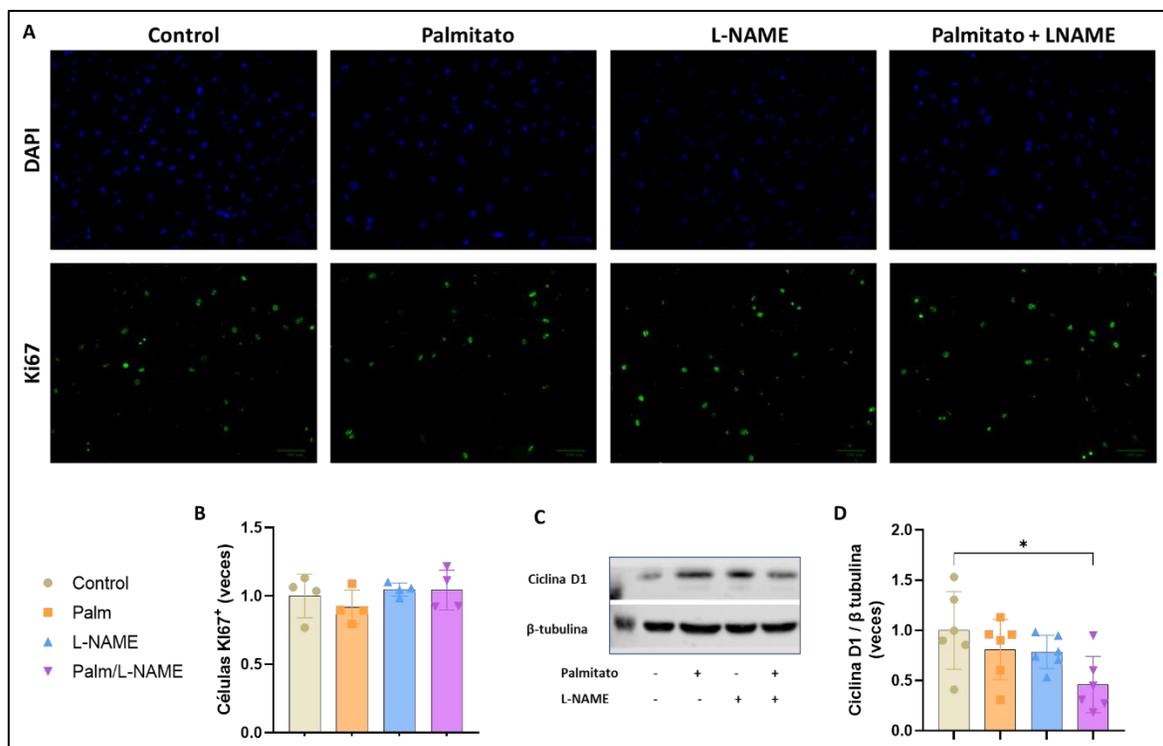


Figura 20. Determinación de los niveles de proliferación en células A7r5 tratadas con palmitato y/o L-NAME durante 48 h.

A, imágenes representativas de los ensayos de inmunocitoquímica realizados. Células incubadas con DAPI (arriba) y con el anticuerpo anti-Ki67 a una dilución 1:300 (abajo), de los grupos control (izquierda), palmitato 1 nM (al centro, izquierda), L-NAME 5 mM (al centro, izquierda) y palmitato 1 nM + L-NAME 5 mM (derecha). **B**, cuantificación el porcentaje de células Ki67⁺ relativas al grupo control. **C**, imagen representativa de la determinación de los niveles de Ciclina D1 por Western blot utilizando β-tubulina como control de carga para normalizar los valores obtenidos. **D**, análisis de la cuantificación densitométrica de los resultados obtenidos para Ciclina D1. **B, C**, se muestran los resultados de al menos 3 réplicas experimentales. Se utilizó el método de ROUT para detectar valores atípicos y la prueba de Shapiro-Wilks para determinar normalidad de la población (con $n > 5$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm D.S. * $p \leq 0,05$.

5. DISCUSIÓN

5.1. Implementación del modelo murino de HFpEF

La correcta implementación de un modelo animal de HFpEF requiere que se cumpla con la presencia de diversas alteraciones en su fisiología, principalmente la presencia de disfunción diastólica, intolerancia al ejercicio e hipertrofia cardiaca, siendo criterios de exclusión la disfunción sistólica y la FEVI reducida^{29,65}. En este trabajo, ratones C57BL/6N de 11-12 semanas de edad se alimentaron durante 15 semanas con una dieta alta en grasa y agua suplementada con L-NAME 1,5 g/L. Para la selección de los animales a incluir en el estudio, se estableció como criterio mínimo de inclusión un aumento de la masa corporal, una disminución de la tolerancia al ejercicio y una disminución de la función diastólica acompañada de una función sistólica preservada (Tablas 3 y 4). Este análisis significó la exclusión de 7 animales en total (3 controles y 4 tratados con HFD y L-NAME).

Para el éxito del tratamiento, resulta fundamental el adecuado consumo del alimento y el fármaco suministrado. De acuerdo con la literatura, los ratones deberían consumir entre 3-5 mL/día de agua y 4-5 g/día de alimento⁶⁶. Al evaluar los controles de ingesta de los animales estudiados, se observó que aquellos que consumen HFD presentan una disminución significativa de la ingesta de alimento de aproximadamente un 20%. Sin embargo, esta baja no se reflejó al comparar la ingesta calórica de los animales, que incrementó aproximadamente en un 30%, debido a que la HFD aporta una mayor cantidad de Kcal/g (5,24 Kcal/g vs 3 Kcal/g de la dieta control) (Figuras 4A-B). El consumo de alimento diario varió entre 2,5-4 g/día, siendo más bajo que lo descrito en guías de manejo de animales⁶⁷. No obstante, diversos estudios dan cuenta de una disminución significativa en el consumo diario de alimento con elevados porcentajes de materia grasa, lo que se explica por la diferencia en su aporte calórico^{68,69}. En el caso del agua, también hubo una disminución significativa de aproximadamente un 20% en el consumo de agua diaria en los 3 grupos experimentales respecto del control (Figura 4C), siendo su variación entre 2,5 y 5 mL/día, nuevamente más bajo que lo descrito en guías de manejo de animales⁶⁷. Sin embargo, existen varios estudios en la literatura que

indican que los ratones disminuyen el consumo de agua cuando se suplementa con algún fármaco o metabolito o si se consume dieta alta en grasa en forma concomitante^{69,70}. En el transcurso de este estudio, los animales no presentaron signos de deshidratación, mantuvieron un estado de salud general óptimo y, en el caso de aquellos tratados con HFD, incrementaron su masa corporal a los valores esperados (Figuras 5A-B). La disminución en el consumo de agua y las diferencias de masa corporal conllevaron a diferencias en la dosis de L-NAME administrada, siendo en promedio de 168 mg/Kg/día en el caso del grupo L-NAME y 104 mg/Kg/día en el grupo HFpEF. Contrario a lo esperado, esta diferencia en la dosis no alteró los valores de presión arterial obtenidos, ya que no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figuras 5E-F).

Al analizar los parámetros cardiometabólicos de los animales tratados con HFD + L-NAME del estudio, se observó un incremento significativo en la masa corporal del animal, la presión arterial, el tamaño del corazón y el grosor de las paredes ventriculares y una disminución significativa en la tolerancia al ejercicio, la tolerancia a la glucosa y la función diastólica, sin diferencias en la función sistólica (Figuras 5-7), consistentes con un fenotipo de HFpEF cardiometabólico¹¹. El estudio de la obesidad y la consecuente intolerancia a la glucosa resultan fundamentales para el desarrollo del modelo propuesto: la obesidad promueve un estado de inflamación crónica de bajo grado⁷¹, uno de los principales mecanismos que se ha propuesto gatillan el desarrollo de HFpEF¹². Por su parte, la resistencia a la insulina que suele estar presente en pacientes con HFpEF, lleva a una disminución en la captación de glucosa en los cardiomiocitos, lo que, en conjunto con la disfunción mitocondrial que se observa producto del estrés lipotóxico, disminuyen los niveles de ATP disponibles para la relajación del tejido miocárdico¹¹.

La evaluación de la tolerancia al ejercicio resulta fundamental al momento de implementar un modelo de HFpEF, ya que permite evidenciar uno de los principales síntomas de insuficiencia cardíaca³. De esta manera, en conjunto con el resto de las alteraciones reportadas, se reafirma que el modelo implementado no es tan solo un modelo de disfunción diastólica, como ha ocurrido en otros modelos

reportados en la literatura⁶⁵, sino que constituye un modelo de HFpEF. Al igual que en el caso de la disfunción diastólica, los valores alcanzados no son tan severos como se describe en el modelo reportado por Schiattarella¹⁷. Sin embargo, son significativos y consistentes con un fenotipo moderado de HFpEF.

En cuanto a la hipertrofia cardíaca, se observó un claro incremento en el grosor de las paredes posterior y anterior del corazón ([Figuras 7A-E](#)). No obstante, las diferencias de masa del corazón respecto de la tibia fueron modestas y solo fueron significativas al comparar exclusivamente el grupo control con el grupo HFpEF ([Figura 7F](#)). Al comparar estos datos con la literatura, se observa que los corazones de los animales control son bastante más grandes que los reportados en otros estudios⁷², mientras que los valores de los animales tratados se condicen con otros reportes, pudiendo ser esta en parte la causa de las diferencias más leves observadas. Sí se observó el desarrollo de fibrosis cardíaca consistente con lo reportado en la literatura¹⁷, lo que explica en parte las alteraciones en la función diastólica observadas en este modelo ([Figura 6](#)).

Por otra parte, no se observó el desarrollo de edema pulmonar al comparar la masa del pulmón normalizada por el largo de la tibia en los distintos grupos experimentales analizados ([Figura 8A](#)). No obstante, la técnica más apropiada para este parámetro consiste en la comparación entre la masa húmeda y seca del pulmón, lo que aún no ha logrado ser implementado en nuestro Laboratorio. Tampoco se observó un aumento importante en la infiltración de líquido en el parénquima alveolar en cortes histológicos de pulmón teñidos con HE (edema), sin embargo, se observó presencia de infiltrado de células inflamatorias en el parénquima alveolar y en el espacio peribronquial y perivascular ([Figura 8](#)). Se describen en la literatura dos tipos de infiltrados inflamatorios en el pulmón: agudo y crónico. El primero se caracteriza por la presencia de células polimorfonucleares, mientras que en el segundo se observan principalmente linfocitos⁷³. Dado el estado de inflamación crónica descrito en HFpEF, lo más probable es que el infiltrado observado en los cortes sea principalmente de linfocitos. Sin embargo, se requiere de un estudio más exhaustivo del tejido pulmonar, por ejemplo, realizando

inmunohistoquímica de marcadores de las distintas poblaciones de células blancas, para confirmar la naturaleza de estos hallazgos.

Los valores de PAS obtenidos producto del tratamiento con L-NAME no superan en promedio los 140 mmHg ([Figura 5](#)), valor de corte para la hipertensión arterial según indica la *American Heart Association* (AHA)⁷⁴. A pesar de esto, las diferencias son significativas respecto del control y suficientes para producir las alteraciones cardiovasculares observadas en este estudio. Por otra parte, los valores de PAD alcanzados son en promedio de 90,5 mmHg, coincidentes con lo previamente reportado con el tratamiento con L-NAME, si bien en este caso se utilizó una concentración más elevada¹⁷. Es importante destacar que los incrementos de presión arterial inducidos por L-NAME son altamente variables en distintos estudios^{17,75,76} y dependen fuertemente de la dosis, tiempo y forma de administración, siendo su uso controversial en la literatura⁷⁷. Una de las causas detrás de estas diferencias descritas, es el incremento compensatorio de la iNOS, contrarrestando la deficiencia de NO que conlleva al incremento de la presión arterial⁷⁸.

Respecto de los análisis ecocardiográficos, la implementación de la determinación de la función sistólica en animales conscientes significó una importante mejora en los análisis realizados, y pudimos observar que el tratamiento conjunto con HFD y L-NAME no generó una disminución en la función sistólica de los animales, según los valores obtenidos de FEVI ([Figura 6D](#)), y FAVI (datos no mostrados). La función diastólica se determinó a través de las razones E/A y E/e'. Si bien no se observaron diferencias significativas en la razón E/A (datos no mostrados), si se observó un aumento significativo en la razón E/e' ([Figura 6E](#)). No obstante, los valores alcanzados no fueron tan elevados como se reporta en otros trabajos que utilizan el mismo modelo experimental¹⁷. De acuerdo con la literatura, la razón E/A se ve afectada no solo por la relajación del miocardio y la rigidez de la pared del ventrículo, sino que también por la presión auricular. Además, puede encontrarse aumentada o disminuida dependiendo del grado de disfunción y presentar valores “pseudo-normales”⁷⁹. Los valores de E/e', por su parte,

incrementan a medida que se vuelve más severa la disfunción diastólica, y por tanto son un parámetro más confiable⁸⁰. Los valores obtenidos dan cuenta de una disfunción diastólica moderada, no restrictiva⁷⁹. Otro de los parámetros más recomendados por la literatura es la determinación del área de la aurícula izquierda⁷⁹, pero por impedimentos técnicos no pudo ser evaluado en este estudio.

En conjunto, los datos obtenidos permiten concluir que se logró implementar en forma exitosa el modelo murino de HFpEF en nuestro Laboratorio, cumpliéndose el primer objetivo de esta tesis. El fenotipo obtenido, no obstante, constituye un fenotipo con un grado de disfunción diastólica modesto, no restrictivo, evidenciado por el aumento moderado de la razón E/e' , la ausencia de un incremento significativo en los valores de E/A y los cambios leves observados en el tamaño macroscópico del corazón y la ausencia de edema pulmonar severo. La presencia de un estadio más temprano de la patología presenta una importante ventaja al momento de evaluar distintas intervenciones para evitar su progresión, en comparación con modelos restrictivos en que la patología se encuentra en estados muy avanzados.

5.2. Remodelado vascular

5.2.1. Análisis histomorfométrico

Los resultados obtenidos muestran, por primera vez, que el tratamiento con HFD y L-NAME produce remodelado vascular en las arterias aorta, carótida y femoral (**Figuras 9 y 10**). En el caso de la aorta, se observó un cambio significativo en los 3 parámetros de remodelado estructural analizados en el grupo HFpEF respecto del control (**Figuras 9C-E**). Un similar resultado se observó en el caso de la arteria carótida, donde los resultados fueron significativos no solo respecto del grupo control, sino también respecto del grupo HFD (**Figuras 9F-H**). En el caso de la arteria femoral, se observó un incremento significativo en el grosor de la pared (**Figura 10C**). Al analizar los parámetros normalizados por el área y diámetro del lumen, solo se observaron diferencias significativas al comparar el grupo HFpEF

con el control por t-Student y no al realizar comparaciones múltiples por ANOVA (Figuras 10B y 10D).

El tratamiento con HFD y agua no suplementada no generó alteraciones significativas en el remodelado vascular de ninguna de las arterias estudiadas (Figuras 9 y 10), lo que se condice con datos previamente reportados, donde no hay diferencias en el grosor de la pared arterial ni en modelos genéticos de obesidad, ni frente a tratamientos prolongados con HFD^{81,82}. En contraposición, un estudio reporta un incremento de la razón media/lumen en arterias mesentéricas de ratones tratados con HFD por 8 semanas⁸³. Sin embargo, la mayoría de la literatura actual apunta a que los efectos de la obesidad sobre la vasculatura son a nivel funcional más que estructural, generando disfunción vascular producto de un aumento en el estrés oxidativo, inflamación y una disminución en la biodisponibilidad de NO⁸⁴.

En el caso de la hipertensión, la literatura describe el desarrollo de un remodelado vascular excéntrico, tanto en arterias de elásticas como en arterias musculares^{85,86}. En este estudio, el tratamiento con L-NAME por sí sólo produjo resultados similares a aquellos observados con el tratamiento HFpEF en la arteria aorta: si bien no se observaron cambios en el grosor de la media (Figura 9D), sí observó una disminución significativa en la razón área lumen(c)/área media y un aumento significativo en la razón M/L (Figuras 9C, 9E). El cálculo de ambas razones permite normalizar los resultados obtenidos por el área y perímetro del lumen de la arteria, respectivamente, evitando que las diferencias observadas sean producto del tamaño total de la arteria o del segmento utilizado para realizar los análisis. Los datos, entonces, podrían indicar que el efecto observado en la arteria aorta se deben al tratamiento con L-NAME, lo que se condice con estudios de la literatura, que reportan un incremento en el área de la pared vascular producto del tratamiento con L-NAME en distintos modelos experimentales^{75,76,87}. Estos hallazgos además se han descrito en otros modelos de HTA, como por ejemplo en el caso del tratamiento con angiotensina II⁸⁸. Es importante destacar que en el caso del tratamiento con L-NAME, solo se contó con 3 réplicas experimentales, por lo que los datos deben ser analizados con cautela. No se observaron diferencias significativas en el

remodelado vascular ni de la arteria carótida ni de la femoral frente al tratamiento con L-NAME, lo que sugiere que la arteria aorta es más sensible al tratamiento con este fármaco en nuestro modelo experimental. No se encontraron estudios en la literatura en los que se evalúe el remodelado vascular de las arterias carótida y femoral frente al tratamiento prolongado con L-NAME.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que el tratamiento HFD y L-NAME induce alteraciones morfológicas en las arterias aorta, carótida y femoral, caracterizadas por un incremento en el grosor de la pared y una alteración en la razón entre la media y el lumen arterial. Estos resultados constituyen el primer reporte de remodelado vascular en un modelo preclínico de HFpEF, efecto parcialmente inducido por L-NAME, pero que se ve acentuado al realizar el tratamiento en conjunto con HFD.

5.2.2. Determinación de la fibrosis arterial

El tratamiento con HFD y L-NAME generó un incremento significativo del contenido de colágeno en la capa media de la arteria aorta ([Figuras 11A-B](#)), el cual fue posteriormente corroborado determinando los niveles de COL1A1 en lisados de arteria aorta por Western blot ([Figuras 11C-D](#)). La pared vascular está compuesta principalmente por colágenos de tipo I y III, y se ha descrito en la literatura que durante el remodelado vascular se produce una alteración en el contenido de las cadenas de colágeno, observándose por ejemplo una disminución en la razón colágeno III/colágeno I, consistente con los datos aquí descritos⁸⁹. Como complemento a futuro de lo anterior, sería interesante evaluar si efectivamente hay una disminución del colágeno tipo III, fibra más flexible que la de tipo I, en conjunto con el incremento del colágeno tipo I observado. Interesantemente, se observó además un incremento no significativo al realizar los tratamientos por separado de HFD y L-NAME, por lo que se estaría produciendo un efecto sinérgico entre ambos tratamientos ([Figura 11](#)). En la literatura se reporta que tanto el tratamiento con HFD^{90,91} y el tratamiento con L-NAME⁷⁵ inducen fibrosis de la pared de la aorta, lo que, si bien no fue observado en este estudio en forma significativa, apoya la teoría de un posible efecto sinérgico entre ambos. Considerando que la fibrosis cardíaca

es uno de los principales marcadores de HFpEF⁹², y que se ha observado en pacientes un incremento de la rigidez arterial, los resultados observados son concordantes con lo que se esperaba obtener al momento de proponer este estudio. Estos datos constituyen el primer hallazgo de fibrosis de la capa media de la arteria aorta en un modelo preclínico de HFpEF.

Si bien en las arterias carótidas se observó un incremento de la fibrosis de la capa media en el grupo HFpEF, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figuras 12A y 12C). En el caso de las arterias femorales, no se encontraron diferencias entre los grupos estudiados (Figuras 12B y 12D). La principal limitación de la determinación de fibrosis por PSR realizada en este trabajo es la variabilidad de los resultados obtenidos, especialmente en las arterias carótida y femoral (Figura 12). Esta limitación puede deberse a que existe variabilidad en los grados de tinción entre un experimento y otro, por lo que se recomienda siempre realizar las tinciones de todas las muestras a analizar a un mismo tiempo para evitar esta posible variación y permitir una mejor comparación de los resultados. Para subsanar este problema, cada uno de los análisis realizados fue comparando la coloración de cada imagen consigo misma, y no a modo general. No se encontraron investigaciones en la literatura que evalúen el grado de fibrosis en la arteria femoral frente al tratamiento con HFD. En el caso de la carótida, solo se encontró un estudio en el que se comparan los niveles de fibrosis en estas arterias frente al tratamiento con HFD, en donde se reportó en forma cualitativa un incremento de los niveles de colágeno, luego de 6 semanas de tratamiento⁹³. Cabe destacar que la mayoría de los estudios en estas arterias son realizados en animales *ApoE*^{-/-} o frente a ligación de la arteria carótida para evaluar distintos tratamientos, y no comparan las condiciones observadas con animales silvestres, lo que dificulta la comparación de los datos aquí obtenidos con los reportados en la literatura.

5.2.3. Expresión de proteínas contráctiles

En este estudio se observó una disminución en la expresión génica de *Acta2* (α SMA) en las arterias aorta y carótida (Figura 14) en el grupo HFpEF respecto del control. Esta disminución fue significativa únicamente al comparar los grupos control y HFpEF por t-Student. Por el contrario, en la arteria femoral se observó un incremento significativo en la expresión génica de *Acta2*. Lo mismo se evidenció en el caso de *Tagln* (Figura 14), si bien en la aorta los cambios no fueron significativos. En la aorta, los niveles de *Acta2* disminuyeron en forma no significativa en ambos tratamientos por separado con HFD y L-NAME, por lo que la disminución significativa observada en el grupo HFpEF lo que apunta a un efecto sinérgico entre ambos tratamientos. En la arteria carótida, el tratamiento con HFD no generó diferencias significativas en ninguno de los genes estudiados. En el caso del tratamiento con L-NAME en la arteria carótida, solo se contó con 2 réplicas experimentales, por lo que esta condición fue excluida del análisis estadístico. Además, en este proyecto se buscó evaluar los niveles de expresión de *Cnn1* (calponina), pero no se logró la estandarización de los partidores respectivos (datos no mostrados). Cabe destacar que los datos obtenidos en los grupos control fueron altamente variables, lo que dificultó el análisis de los resultados obtenidos.

Se observa entonces una disminución en la expresión génica de proteínas contráctiles en las arterias aorta y carótida, arterias elásticas, y un aumento en las proteínas contráctiles en la arteria femoral, arteria de tipo muscular. Estas últimas presentan una proporción mucho mayor de VSMC, mientras que las primeras presentan una mayor proporción de colágeno y elastina²². A modo general, se describe en la literatura que la HTA genera un incremento de los niveles de proteínas contráctiles en VSMC²⁸. En nuestro modelo, solo en las arterias femorales del grupo HFpEF se observó dicho aumento, mientras que en la arteria aorta y carótida se observó el efecto contrario. No obstante, existen reportes en la literatura en las que el tratamiento con HFD o con angiotensina II disminuyen la expresión de proteínas contráctiles como la α SMA y la calponina en la aorta, consistente con nuestros hallazgos⁹⁴⁻⁹⁶. El efecto diferencial entre distintos tipos de arterias abre

una interesante línea de estudio en HFpEF, ya que propone que el comportamiento de la musculatura lisa dependería del tipo de arteria que se esté estudiando.

Se ha descrito que la inducción de la vía de la PKG regula a nivel genético el aumento de la expresión de las proteínas contráctiles en VSMC⁹⁷. Como se mencionó anteriormente, se ha descrito una alteración en esta vía en el desarrollo de HFpEF¹⁸, lo que podría en parte explicar la disminución observada. Futuros experimentos permitirán corroborar si las alteraciones observadas ocurren por este mecanismo. Las diferencias reportadas entre los distintos tipos de arteria resultan particularmente interesantes al analizar los datos obtenidos en el punto 5.2.2, respecto de la fibrosis arterial. La producción de colágeno en la capa media de las arterias se produce principalmente por las VSMC, las cuales, como se menciona en la introducción de este trabajo, son células con un fenotipo altamente plástico²⁵. En general, el grado de diferenciación de las VSMC fluctúa entre dos extremos: un fenotipo sintético proliferativo, en el cual se observa una disminución de las proteínas contráctiles y un incremento en la síntesis de proteínas de la MEC, y un fenotipo contráctil, caracterizado por un incremento en las proteínas contráctiles y una disminución en la síntesis de proteínas de la MEC²⁶. Lo anterior es consistente con los hallazgos aquí observados, en los que hay un aumento en el contenido de colágeno en la aorta en conjunto con una disminución en la expresión de proteínas contráctiles y un incremento en la expresión de proteínas contráctiles en la arteria femoral sin cambios en el contenido de colágeno.

En el caso de los análisis de la aorta por Western blot, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ninguna de las 3 proteínas contráctiles estudiadas ([Figura 15](#)). Se observó una importante variabilidad en estos datos, especialmente en los grupos experimentales tratados con HFD y L-NAME, lo que podría deberse en parte a las dificultades que supuso la homogenización del tejido aórtico para la obtención de lisados de proteínas, ya que no siempre se lograba una homogenización completa y uniforme del tejido. En la literatura, no hay estudios que determinen la expresión génica ni los niveles de estas proteínas en un tratamiento conjunto con HFD y L-NAME. En un futuro, análisis por inmunohistoquímica de los

cortes de arterias obtenidos permitirán dilucidar si efectivamente se mantienen constantes los niveles de proteínas contráctiles en la aorta o si disminuyen como sugieren los estudios de PCR. Además, esto permitirá corroborar los resultados obtenidos en las arterias carótida y femoral, las cuales no se evaluaron por Western blot debido a la escasa cantidad de proteína obtenida de estos tejidos.

En conjunto, los datos discutidos en el punto 7.2 de este trabajo indican que se produce remodelado vascular y fibrosis arterial, con una disminución en la expresión génica de proteínas contráctiles. Estos resultados podrían explicar en parte las alteraciones en la estructura y función arterial determinadas de manera no invasiva en pacientes con HFpEF mencionados en la introducción de este trabajo. Si bien en el punto 7.1 se discute el establecimiento de un fenotipo moderado no restrictivo de disfunción diastólica, es suficiente para que se produzcan alteraciones estructurales significativas en las arterias estudiadas, lo que genera la interrogante de qué sucedería con un modelo más severo de disfunción diastólica restrictiva y corroborando la hipótesis de la importancia de continuar con los estudios de la función vascular en HFpEF. En concordancia con lo anterior, un trabajo publicado en el año 2021 propone el tratamiento de la rigidez arterial como un posible tratamiento para HFpEF⁹⁸. Recientemente, se reportó el uso de empagliflozina como el primer tratamiento efectivo para HFpEF⁸. Estudios previos han mostrado que el tratamiento con este fármaco produce una disminución en la acumulación de lípidos y área de placa aterosclerótica en la aorta, una disminución en marcadores proinflamatorios como VCAM1 y TNF α y una mejora en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio en modelos murinos de diabetes y síndrome metabólico^{99,100}, resultados que apoyan fuertemente nuestra propuesta de la importancia de la vasculatura en el desarrollo y progresión de HFpEF. Actualmente en nuestro laboratorio se están implementando equipos de miografía para el estudio de la función vascular, lo que nos permitirá evaluar la función contráctil y la respuesta vasodilatadora de distintas arterias en el modelo HFpEF implementado en el desarrollo de esta tesis.

Durante los últimos años, se han realizado 3 estudios en los que se evalúa la función vascular en modelos preclínicos de HFpEF. Dupas, et al., en el año 2022, evaluaron la respuesta vascular de las arterias aorta y mesentérica frente al isoproterenol, agonista β -adrenérgico no selectivo, en un modelo de sobreexpresión del receptor β_3 -adrenérgico en ratas Sprague Dawley¹⁰¹. Este estudio mostró una disminución en la respuesta vasodilatadora de ambas arterias a las 45 semanas. Sin embargo, si bien el modelo que utilizan muestra un incremento en el área de la aurícula, un incremento de la presión de fin de diástole (PFD) y una disminución de la tolerancia al ejercicio, no se observan indicadores claros de disfunción diastólica: valores de E/A no concluyentes, sin cambios en la onda E. Tampoco se observa un aumento de la masa del corazón, alteración en el grosor de las paredes del ventrículo izquierdo ni formación de edema pulmonar, por lo que queda en duda si corresponde efectivamente a un modelo de HFpEF. Un segundo artículo, del 2021, describió una disminución en la respuesta vasodilatadora de la arteria carótida, tanto dependiente como independiente del endotelio¹⁰². En este estudio se utilizan ratas hembra ZSF-1 (obesas, espontáneamente hipertensas), las cuales desarrollan hipertrofia y fibrosis cardiaca, un aumento en la razón E/e', en la PFD y en el área de la aurícula, manteniendo una función sistólica preservada, alteraciones consistentes con un robusto modelo de HFpEF. Finalmente, un tercer estudio observó una disminución de la respuesta vasodilatadora dependiente e independiente del endotelio en la arteria aorta, en un modelo de ratas Dahl SS (sensibles a la sal), alimentadas con 8% NaCl durante 28 semanas¹⁰³. En este modelo se observa un incremento del tamaño del corazón, de la PA, y de la PFD, con un aumento muy moderado (de 10 a 20) de la onda E/e', acompañados de una disminución en la FEVI, valores que sin embargo se mantienen sobre 60. En este estudio, se habla de una progresión de HFpEF a HFrEF, lo que actualmente se describe en pacientes como un evento de muy rara ocurrencia, lo que lleva a cuestionar si efectivamente corresponde a un modelo adecuado de HFpEF. Si bien es necesario analizar estos estudios de manera crítica, entendiendo que ningún modelo para una patología tan compleja como los es la HFpEF es perfecto, el mensaje final es claro: se producen alteraciones funcionales de distintas arterias en

modelos preclínicos de HFpEF, consistente con las alteraciones del remodelado vascular reportadas en este estudio.

5.3. Estudios de correlación

Para estos estudios se realizó una matriz de correlación utilizando los datos obtenidos de las determinaciones de parámetros metabólicos, estructura y función cardíaca y remodelado vascular (Figura 16A). Dentro de los resultados obtenidos, se destaca la relación entre la PAS y la insuficiencia cardíaca diastólica, el remodelado vascular y la insuficiencia cardíaca diastólica y la correlación entre la fibrosis cardíaca y la fibrosis arterial (Figuras 16-17). La HTA se considera un importante factor de riesgo para el desarrollo de disfunción diastólica y HFpEF, y es una de las principales comorbilidades asociadas a esta patología¹². En el caso de la correlación de la PAS con la hipertrofia cardíaca, no se encontró una correlación entre la PAS y la masa del corazón normalizada por la tibia ($r=0,1340$; $p=0,57$, datos no mostrados), pero si se encontró una correlación positiva significativa con el grosor de la pared posterior del ventrículo (Figura 16E). Las diferencias entre ambos parámetros de hipertrofia cardíaca se discutieron en el punto 5.1 de este trabajo. La sobrecarga de presión que se produce durante la HTA, relacionada directamente con un incremento en la rigidez de la aorta, lleva al desarrollo de procesos inflamatorios, enfermedad de las arterias coronarias e hipertrofia cardíaca, lo que resulta en el desarrollo de disfunción diastólica del ventrículo izquierdo¹⁰⁴. Las correlaciones encontradas son consistentes con dichos reportes, si bien no habían sido reportadas en un modelo preclínico de HFpEF¹⁰⁴. Por otra parte, las correlaciones significativas encontradas entre el grado de disfunción diastólica, la tolerancia al ejercicio y el grosor de las distintas arterias estudiadas se reportan por primera vez en un modelo experimental de HFpEF, con coeficientes de correlación mayores a 0,75, lo que da cuenta de una fuerte correlación entre los parámetros estudiados (Figuras 17A-C). Finalmente, las correlaciones observadas entre la fibrosis arterial y cardíaca fueron positivas y significativas en el caso de las arterias aorta y carótida. Interesantemente, en el caso de la fibrosis de la carótida, la

correlación arrojó un valor de r de 0.73, dando cuenta de una fuerte correlación entre la fibrosis cardiaca y la fibrosis de la arteria carótida, aun cuando no se observó un incremento estadísticamente significativo en la fibrosis de la carótida en el grupo HFpEF en comparación con el grupo control (Figura 12), lo que puede deberse a que las diferencias entre ambos grupos fueron de escasa magnitud. Lo anterior da cuenta que el daño al tejido cardiaco y arterial producto de la fibrosis que se produce durante HFpEF son procesos que ocurren en forma concomitante y relacionados entre sí.

5.4. Efecto del tratamiento con palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de VSMC

5.3.1. Estandarización de las concentraciones de palmitato y L-NAME en VSMCs

En este trabajo se buscó emular parcialmente las condiciones experimentales de los animales tratados *in vivo*, en un modelo de VSMC *in vitro*. Para ello, la línea celular A7r5, obtenidas de aorta de rata embrionaria, se estimuló con palmitato, principal ácido graso saturado presente en la HFD administrada a los ratones, y L-NAME. El cálculo de las concentraciones a utilizar *in vitro* para emular lo que ocurre *in vivo* resulta extremadamente complejo debido a la gran cantidad de variables a considerar. En el caso del L-NAME, se ha descrito en la literatura que el L-NAME se hidroliza rápidamente a nitro-arginina, metabolito que ejerce la actividad inhibitoria de la NOS^{105,106} y que tiene una vida media de 22,9 h¹⁰⁷. En humanos se ha descrito que el volumen de distribución del L-NAME es de 0,49 L/Kg¹⁰⁷. Sin embargo, el volumen de distribución en ratones no ha sido descrito en la literatura. De todas maneras, asumiendo que el valor fuese similar, sería necesaria una administración intravenosa (iv) del fármaco para conocer la concentración plasmática del L-NAME en el animal. En este trabajo, se calculó una dosis de 104 mg/Kg/día (Figura 4), la cual si fuese administrada en forma IV generaría una concentración plasmática de L-NAME de 1 mM. No obstante, al ser el L-NAME administrado en forma oral, hay que considerar otros factores como el metabolismo de primer paso y el grado de degradación gastrointestinal. Si bien no se realizó

durante esta tesis, la determinación en sangre de la concentración de L-NAME luego de la administración oral entregaría información valiosa al respecto. En el caso del uso de palmitato se presentan los mismos problemas de metabolización producto de su ingesta con la dieta, además del hecho de que parte del palmitato sérico se encuentra conjugado a albúmina en proporciones que varían desde 1:1 a 1:3 en pacientes sanos y valores más elevados de 5:1 en el caso de patologías cardiovasculares¹⁰⁸. Las concentraciones plasmáticas totales de ácido palmítico en individuos sanos varían de entre 0,3 a 4,1 mM¹⁰⁹, y su concentración en los distintos tejidos se mantiene relativamente constante respecto de la ingesta y está sujeta a una estrecha regulación homeostática¹¹⁰. Producto de lo anterior, se determinaron las concentraciones de palmitato y L-NAME a utilizar *in vitro* en base a lo observado en la literatura. Luego de una búsqueda bibliográfica, se procedió a probar concentraciones de palmitato libre 1–5 nM y de L-NAME 1–10 mM, buscando utilizar las concentraciones más altas posibles que no alteraran significativamente la viabilidad celular. En un principio, se realizaron ensayos de colorimétricos de MTT. El tratamiento con palmitato disminuyó importantemente la viabilidad celular a las concentraciones de 3 y 5 nM (Figura 18A), consistente con experimentos similares reportados en la literatura¹¹¹. En el caso del tratamiento con L-NAME, se observó una disminución significativa en el caso de la concentración a 10 mM (Figura 18D). Interesantemente, las concentraciones de 1 y 5 mM, que producían una disminución de aproximadamente un 50% en la formación de formazán, parecían encontrarse en condiciones normales al microscopio (adheridas y con una morfología adecuada). El ensayo de MTT mide la actividad metabólica de la célula, gracias a la actividad de oxidorreductasas dependientes de NADPH, por lo que alteraciones metabólicas producen cambios en los resultados, sin necesariamente alterar la viabilidad celular. Por esta razón, se optó por complementar los ensayos de viabilidad con el ensayo de exclusión de azul de tripán y la incorporación de PI por citometría de flujo. En este último, no se observaron diferencias significativas en los tratamientos con palmitato y L-NAME, probablemente debido a la alta variabilidad obtenida en los datos y a que solo se realizaron 3 réplicas experimentales. Una de las limitaciones del uso de la citometría de flujo en este modelo radica en que las

VSMC presentan un fenotipo muy plástico, por lo que los distintos estímulos alteran el tamaño y morfología de la célula, dificultando la selección de una población homogénea para el análisis de los resultados.

A partir de los resultados mostrados en la [Figura 18](#) (sección 6.3.1), se utilizó palmitato 1 nM y L-NAME 5 mM para los tratamientos conjuntos. A la fecha, no existen estudios que evalúen el efecto del tratamiento conjunto de palmitato y L-NAME sobre el fenotipo de VSMC.

5.3.2. Cambio fenotípico de VSMC frente al tratamiento con palmitato y L-NAME

Para estudiar el cambio fenotípico de VSMC frente al tratamiento con palmitato y L-NAME, se evaluaron 3 parámetros: la expresión de proteínas contráctiles por Western blot, los niveles de colágeno por Western blot y la proliferación celular por ensayos de inmunocitoquímica de Ki67.

Frente al tratamiento con palmitato y L-NAME, se observó una disminución significativa de los niveles de α SMA y calponina, además de una disminución no significativa de los niveles de SM22 ([Figura 19](#)). Estos resultados se condicen en parte con lo observado en las arterias aorta y carótida, en donde se observó una disminución de la expresión génica de α SMA y SM22 frente al tratamiento conjunto con HFD y L-NAME ([Figura 14](#)), aunque esto no se observó en los análisis por Western blot de las aortas ([Figura 15](#)). El tratamiento con L-NAME 10 μ M por 12 h disminuye los niveles de proteínas contráctiles sin alterar la proliferación ni la migración celular⁷⁵, consistente con los resultados aquí reportados ([Figuras 19 y 20](#)). Llama la atención, no obstante, la amplia diferencia entre las concentraciones de L-NAME utilizadas. Adicionalmente, se ha visto que el tratamiento de VSMC con palmitato disminuye los niveles de proteínas contráctiles sin alterar la migración celular, al igual que lo que ocurre con lo descrito para el tratamiento con L-NAME^{112,113}. En el caso de la determinación de los niveles de colágeno, se observó una disminución en los 3 grupos tratados en similar magnitud ([Figura 19C](#)), por lo que se concluye que el tratamiento conjunto con palmitato y L-NAME no afecta en

sí mismo los niveles de COL1A1. Esta disminución fue inesperada, debido a que suele asociarse un incremento en los niveles de colágeno con la disminución de proteínas contráctiles en VSMC²⁵. Una de las razones detrás de esta disminución puede deberse a que se está secretando una mayor cantidad de colágeno, o que se genera un fenotipo mixto en estas células producto del tratamiento. La determinación en futuro de los niveles de colágeno en el medio de cultivo de las células permitirá responder a esta interrogante.

En cuanto a la proliferación celular, se analizaron los niveles de ciclina D1, proteína reguladora del ciclo celular que incrementa cuando las células pasan a fase G1 y G2 del ciclo celular para iniciar y continuar con la proliferación, respectivamente¹¹⁴. Se observó una disminución significativa en los niveles de ciclina D1 frente al tratamiento conjunto con palmitato y L-NAME. Esto no se observó al realizar los tratamientos por separado ([Figura 20C](#)). En forma complementaria, se evaluaron los niveles del antígeno Ki67, proteína nuclear que incrementa de forma marcada al progresar el ciclo celular y que se encuentra ausente en células quiescentes¹¹⁵. No se observaron diferencias significativas en los niveles de Ki67 detectados por fluorescencia en ninguno de las 3 condiciones estudiadas. Como se mencionó previamente, estudios realizados tratando VSMC con palmitato o con L-NAME no generan alteraciones en la proliferación celular^{75,113}. No existen estudios a la fecha que evalúen el tratamiento de ambos en conjunto.

Se propone en base a lo anterior que el tratamiento con palmitato y L-NAME genera un fenotipo mixto en las células A7r5, en el cual se observa una disminución de los niveles de proteínas contráctiles y una disminución en el contenido de colágeno, sin alteraciones en la proliferación celular. En las arterias estudiadas en esta tesis, se observó un incremento del grosor de la pared, lo cual puede deberse a un aumento de la proliferación celular, a un incremento en la hipertrofia de las células musculares lisas y/o a un aumento de la migración de estas células. En un futuro, complementar estos resultados con ensayos de migración e hipertrofia *in vitro*, y proliferación en tejido arterial permitirán concluir a mayor cabalidad la causa detrás de las alteraciones morfológicas observadas.

6. CONCLUSIONES

Objetivo 1: El tratamiento con HFD y L-NAME induce HFpEF cardiometabólico moderado en ratones sometidos a tratamiento durante 15 semanas. Se logra implementar correctamente en nuestro laboratorio el modelo murino propuesto.

Objetivo 2: En ratones con HFpEF cardiometabólico se produce remodelado vascular, caracterizado por un incremento en el grosor de la pared vascular y su relación con el lumen arterial, una alteración en la expresión génica de proteínas contráctiles y, en el caso de la arteria aorta, el desarrollo de fibrosis de la capa media de la arteria. Las alteraciones en la morfología vascular se correlacionaron con las alteraciones morfológicas y funcionales que desarrollaron los animales producto del tratamiento.

Objetivo 3: el tratamiento *in vitro* con palmitato y L-NAME genera cambios fenotípicos en células musculares lisas vasculares, caracterizados por una disminución de las proteínas contráctiles y una disminución en los niveles de colágeno sin alteraciones en la proliferación, consistentes con lo observado *in vivo*.

La hipótesis propuesta en este trabajo, "*Ratones tratados con una dieta rica en palmitato y L-NAME desarrollan HFpEF cardiometabólico y remodelado vascular de las arterias aorta, carótida y femoral, asociado a un cambio fenotípico de células musculares lisas vasculares*" se cumple en base a los objetivos planteados. En este trabajo se da cuenta, por primera vez, que existe remodelado vascular en un modelo preclínico de HFpEF y que el tratamiento de VSMC con palmitato y L-NAME induce alteraciones fenotípicas en estas células.

Los hallazgos del presente trabajo contribuyen al estudio de una de las patologías que en los últimos años se ha transformado en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, debido a su alta prevalencia, alto riesgo de hospitalización y a la escasa disponibilidad de herramientas farmacológicas para su tratamiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Enfermedades cardiovasculares. (2015).
2. Estadísticas, I. N. de. Estadísticas Vitales 2016. *Información rueda de prensa* (2018).
3. Tanai, E. & Frantz, S. Pathophysiology of heart failure. *Compr Physiol* **6**, 187–214 (2016).
4. Celermajer, D. S., Chow, C. K., Marijon, E., Anstey, N. M. & Woo, K. S. Cardiovascular disease in the developing world: Prevalences, patterns, and the potential of early disease detection. *Journal of the American College of Cardiology Preprint* at <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.03.074> (2012).
5. Dunlay, S. M., Roger, V. L. & Redfield, M. M. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* **14**, 591–602 (2017).
6. Gladden, J. D., Linke, W. A. & Redfield, M. M. Heart failure with preserved ejection fraction. *Pflugers Arch* **466**, 1037–1053 (2014).
7. Gevaert, A. B. *et al.* Heart failure with preserved ejection fraction: recent concepts in diagnosis, mechanisms and management. *Heart* **108**, 1342–1350 (2022).
8. Anker, S. D. *et al.* Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med* **385**, 1451–1461 (2021).
9. Verma, A. & Solomon, S. D. Diastolic Dysfunction as a Link Between Hypertension and Heart Failure. *Medical Clinics of North America* **93**, 647–664 (2009).
10. Cohen, J. B. *et al.* Clinical Phenogroups in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail* **8**, 172–184 (2020).
11. Capone, F. *et al.* Cardiac metabolism in HFpEF: from fuel to signalling. *Cardiovasc Res* (2022) doi:10.1093/cvr/cvac166.
12. Paulus, W. J. & Tschöpe, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: Comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* **62**, 263–271 (2013).
13. Wintrich, J. *et al.* Therapeutic approaches in heart failure with preserved ejection fraction: past, present, and future. *Clinical Research in Cardiology* **109**, 1079–1098 (2020).
14. Lam, C. S. P., Voors, A. A., De Boer, R. A., Solomon, S. D. & Van Veldhuisen, D. J. Heart failure with preserved ejection fraction: From mechanisms to therapies. *Eur Heart J* **39**, 2780–2792 (2018).
15. Incalza, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* **100**, 1–19 (2018).
16. Van Heerebeek, L. *et al.* Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* **126**, 830–839 (2012).

17. Schiattarella, G. G. *et al.* Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* (2019) doi:10.1038/s41586-019-1100-z.
18. Shear, F. el. Novel paradigms in the therapeutic management of heart failure with preserved ejection fraction: clinical perspectives. *Am J Cardiovasc Dis* **9**, 91–108 (2019).
19. Takimoto, E. Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. *Circulation Journal* **76**, 1819–1825 (2012).
20. Lyle, M. A. & Brozovich, F. v. HFpEF, a Disease of the Vasculature: A Closer Look at the Other Half. *Mayo Clin Proc* **93**, 1305–1314 (2018).
21. Lee, J. F. *et al.* Evidence of microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart* **102**, 278–284 (2016).
22. Leloup, A. J. A. *et al.* Elastic and muscular arteries differ in structure, basal NO production and voltage-gated Ca²⁺-channels. *Front Physiol* **6**, 1–9 (2015).
23. Newcomer, S. C., Leuenberger, U. A., Hogeman, C. S., Handly, B. D. & Proctor, D. N. Different vasodilator responses of human arms and legs. *Journal of Physiology* **556**, 1001–1011 (2004).
24. Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. & Michel, J. B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* **95**, 194–204 (2012).
25. Owens, G. K. *et al.* Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**, 767–801 (2004).
26. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* **75**, 487–517 (1995).
27. Buetow, B. S., Tappan, K. a, Crosby, J. R., Seifert, R. a & Bowen-Pope, D. F. Chimera analysis supports a predominant role of PDGFRbeta in promoting smooth-muscle cell chemotaxis after arterial injury. *Am J Pathol* **163**, 979–984 (2003).
28. Mondaca-Ruff, D. *et al.* Angiotensin II-Regulated Autophagy Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Front Pharmacol* **9**, 1–13 (2019).
29. van Ham, W. B. *et al.* Clinical Phenotypes of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction to Select Preclinical Animal Models. *JACC Basic Transl Sci* **7**, 844–857 (2022).
30. Cecelja, M. & Chowienczyk, P. Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis* **1**, 1–10 (2012).
31. Hundley, W. G. *et al.* Cardiac cycle-dependent changes in aortic area and distensibility are reduced in older patients with isolated diastolic heart failure and correlate with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol* **38**, 796–802 (2001).

32. Kishimoto, S. *et al.* Endothelial dysfunction and abnormal vascular structure are simultaneously present in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Cardiol* **231**, 181–187 (2017).
33. Borlaug, B. A. *et al.* Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation* (2006) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.632745.
34. Borlaug, B. A. *et al.* Global cardiovascular reserve dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* (2010) doi:10.1016/j.jacc.2010.03.077.
35. Kawaguchi, M., Hay, I., Fetts, B. & Kass, D. A. Combined ventricular systolic and arterial stiffening in patients with heart failure and preserved ejection fraction: implications for systolic and diastolic reserve limitations. *Circulation* (2003).
36. Tartire-Kesri, L., Tartire, J. M., Logeart, D., Beauvais, F. & Cohen Solal, A. Increased proximal arterial stiffness and cardiac response with moderate exercise in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* **59**, 455–461 (2012).
37. Reddy, Y. N. V. *et al.* Arterial Stiffening With Exercise in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* **70**, 136–148 (2017).
38. Mohammed, S. F. *et al.* Comorbidity and ventricular and vascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction a community-based study. *Circ Heart Fail* **5**, 710–719 (2012).
39. Schwartzenberg, S. *et al.* Effects of vasodilation in heart failure with preserved or reduced ejection fraction: Implications of distinct pathophysiologies on response to therapy. *J Am Coll Cardiol* **59**, 442–451 (2012).
40. Fernandes, V. R. S. *et al.* Arterial Stiffness Is Associated With Regional Ventricular Systolic and Diastolic Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 194–201 (2008).
41. Sadowski, J. *et al.* Remodeling of Retinal Arterioles and Carotid Arteries in Heart Failure Development—A Preliminary Study. *J Clin Med* **11**, (2022).
42. Chow, B. & Rabkin, S. W. The relationship between arterial stiffness and heart failure with preserved ejection fraction: a systemic meta-analysis. *Heart Fail Rev* **20**, 291–303 (2015).
43. Aladin, A. I. *et al.* Comparison of the Relation of Carotid Intima-Media Thickness With Incident Heart Failure With Reduced Versus Preserved Ejection Fraction (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [MESA]). *American Journal of Cardiology* **148**, 102–109 (2021).
44. Puato, M. *et al.* Intima-media thickness remodelling in hypertensive subjects with long-term well-controlled blood pressure levels. *Blood Press* **26**, 48–53 (2017).
45. Engström, G., Melander, O. & Hedblad, B. Carotid intima-media thickness, systemic inflammation, and incidence of heart failure hospitalizations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1691–1695 (2009).

46. Farrero, M. *et al.* Pulmonary hypertension is related to peripheral endothelial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* **7**, 791–798 (2014).
47. Hundley, W. G. *et al.* Leg flow-mediated arterial dilation in elderly patients with heart failure and normal left ventricular ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, 1427–1434 (2007).
48. Yuan SY & Rigor RR. Structure and Function of Exchange Microvessels. in *Regulation of endothelial barrier function* (Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), 2011).
49. Secomb, T. W. & Pries, A. R. The microcirculation: physiology at the mesoscale. *J Physiol* **589**, 1047–1052 (2011).
50. Vancheri, F., Longo, G., Vancheri, S. & Henein, M. Coronary Microvascular Dysfunction. *J Clin Med* **9**, 2880 (2020).
51. Sanhueza-Olivares, F. *et al.* A potential role of autophagy-mediated vascular senescence in the pathophysiology of HFpEF. *Front Endocrinol (Lausanne)* **Accepted**, (2022).
52. Kalogeropoulos, A. *et al.* Inflammatory Markers and Incident Heart Failure Risk in Older Adults. *J Am Coll Cardiol* **55**, 2129–2137 (2010).
53. Burgoyne, J. R. & Eaton, P. Oxidant sensing by protein kinases a and g enables integration of cell redox state with phosphoregulation. *Sensors (Basel)* **10**, 2731–51 (2010).
54. Shah, S. J. *et al.* Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HFpEF. *Eur Heart J* **39**, 3439–3450 (2018).
55. Kitzman, D. W. *et al.* Skeletal muscle abnormalities and exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **306**, H1364–H1370 (2014).
56. Mohammed, S. F. *et al.* Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* **131**, 550–559 (2015).
57. Yang, J. H. *et al.* Endothelium-dependent and independent coronary microvascular dysfunction in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* **22**, 432–441 (2020).
58. Chandra, A. *et al.* The association of retinal vessel calibres with heart failure and long-term alterations in cardiac structure and function: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Eur J Heart Fail* **21**, 1207–1215 (2019).
59. Gao, Y. Z., Saphirstein, R. J., Yamin, R., Suki, B. & Morgan, K. G. Aging impairs smooth muscle-mediated regulation of aortic stiffness: a defect in shock absorption function? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* (2014) doi:10.1152/ajpheart.00392.2014.
60. Contard, F. *et al.* Arterial smooth muscle cell phenotype in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* (1993) doi:10.1161/01.HYP.22.5.665.

61. Li, H. & Förstermann, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol* **13**, 161–167 (2013).
62. Liaudet, L., Vassalli, G. & Pacher, P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front Biosci* **14**, 4809–4814 (2009).
63. Gao, S., Ho, D., Vatner, D. E. & Vatner, S. F. Echocardiography in Mice. **1**, 71–83 (2011).
64. Kadam, P. & Bhalerao, S. Sample size calculation. *Int J Ayurveda Res* (2010).
65. Valero-Muñoz, M., Backman, W. & Sam, F. Murine Models of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A “Fishing Expedition”. *JACC Basic Transl Sci* **2**, 770–789 (2017).
66. Animal Care and Use Committee, J. H. U. The Mouse. <https://web.jhu.edu/animalcare/procedures/mouse.html#:~:text=The%20average%20daily%20consumption%20of,g%20and%204%20ml%20respectively>.
67. Bake, T., Murphy, M., Morgan, D. G. A. & Mercer, J. G. Large, binge-type meals of high fat diet change feeding behaviour and entrain food anticipatory activity in mice. *Appetite* **77**, 60–71 (2014).
68. Kern, M. *et al.* C57BL/6J mice are protected against diet induced obesity (DIO). *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 717–720 (2012).
69. Pang, J. *et al.* Effects of Excess Energy Intake on Glucose and Lipid Metabolism in C57BL/6 Mice. *PLoS One* **11**, e0146675 (2016).
70. Bongers, K. S. *et al.* Antibiotics cause metabolic changes in mice primarily through microbiome modulation rather than behavioral changes. *PLoS One* **17**, e0265023 (2022).
71. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**, 415–45 (2011).
72. Zi, M. *et al.* Cardiac hypertrophy or failure? - A systematic evaluation of the transverse aortic constriction model in C57BL/6NTac and C57BL/6J substrains. *Curr Res Physiol* **1**, 1–10 (2019).
73. Moldoveanu, B. *et al.* Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res* **2**, 1–11 (2009).
74. Johns, C., Gavras, I., Handy, D. E., Salomao, A. & Gavras, H. Models of experimental hypertension in mice. *Hypertension* **28**, 1064–9 (1996).
75. Chen, J.-X. *et al.* 5-Lipoxygenase deficiency attenuates L-NAME-induced hypertension and vascular remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 2379–2392 (2019).
76. de Moudt, S. *et al.* Aortic Stiffness in L-NAME Treated C57Bl/6 Mice Displays a Shift From Early Endothelial Dysfunction to Late-Term Vascular Smooth Muscle Cell Dysfunction. *Front Physiol* **13**, 874015 (2022).
77. Jana Kopincová, Angelika Púzserová & Iveta Bernátová. L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? *Pharmacological Reports* **64**, 511–520 (2012).

78. Miller, M. J. S. *et al.* Failure of L-NAME to cause inhibition of nitric oxide synthesis: Role of inducible nitric oxide synthase. *Inflammation Research* **45**, 272–276 (1996).
79. Schnelle, M. *et al.* Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. *J Mol Cell Cardiol* **114**, 20–28 (2018).
80. Faggiano, P. *et al.* The study of left ventricular diastolic function by Doppler echocardiography: the essential for the clinician. *Heart Int* **3**, 42 (2007).
81. Carmo, L. S. *et al.* Expansive Vascular Remodeling and Increased Vascular Calcification Response to Cholecalciferol in a Murine Model of Obesity and Insulin Resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 200–211 (2019).
82. Gil-Ortega, M. *et al.* Arterial stiffness is associated with adipokine dysregulation in non-hypertensive obese mice. *Vascul Pharmacol* **77**, 38–47 (2016).
83. Gentile, D. *et al.* Luteolin Prevents Cardiometabolic Alterations and Vascular Dysfunction in Mice With HFD-Induced Obesity. *Front Pharmacol* **9**, (2018).
84. Moraes, R. dos A., Webb, R. C. & Silva, D. F. Vascular Dysfunction in Diabetes and Obesity: Focus on TRP Channels. *Front Physiol* **12**, (2021).
85. Renna, N. F., de Las Heras, N. & Miatello, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens* **2013**, 808353 (2013).
86. Humphrey, J. D. Mechanisms of Vascular Remodeling in Hypertension. *Am J Hypertens* **34**, 432–441 (2021).
87. Maneesai, P. *et al.* Hesperidin Prevents Nitric Oxide Deficiency-Induced Cardiovascular Remodeling in Rats via Suppressing TGF- β 1 and MMPs Protein Expression. *Nutrients* **10**, (2018).
88. Bhatta, A. *et al.* Angiotensin II-Induced Arterial Thickening, Fibrosis and Stiffening Involves Elevated Arginase Function. *PLoS One* **10**, e0121727 (2015).
89. Xu, J. & Shi, G.-P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 2106–2119 (2014).
90. Santana, A. B. C. *et al.* Effect of high-fat diet upon inflammatory markers and aortic stiffening in mice. *Biomed Res Int* **2014**, 914102 (2014).
91. DeMarco, V. G. *et al.* Low-Dose Mineralocorticoid Receptor Blockade Prevents Western Diet-Induced Arterial Stiffening in Female Mice. *Hypertension* **66**, 99–107 (2015).
92. Simmonds, S. J., Cuijpers, I., Heymans, S. & Jones, E. A. v. Cellular and Molecular Differences between HFpEF and HFrEF: A Step Ahead in an Improved Pathological Understanding. *Cells* **9**, 242 (2020).
93. Billaud, M., Johnstone, S. R. & Isakson, B. E. Loss of compliance in small arteries, but not in conduit arteries, after 6 weeks exposure to high fat diet. *J Cardiovasc Transl Res* **5**, 256–63 (2012).

94. Wang, H. *et al.* MiR-377-3p inhibits atherosclerosis-associated vascular smooth muscle cell proliferation and migration via targeting neuropilin2. *Biosci Rep* **40**, (2020).
95. Huang, S. *et al.* Myeloid differentiation 2 deficiency attenuates AngII-induced arterial vascular oxidative stress, inflammation, and remodeling. *Aging* **13**, 4409–4427 (2021).
96. Pothen, L. *et al.* Sustained Downregulation of Vascular Smooth Muscle Acta2 After Transient Angiotensin II Infusion: A New Model of “Vascular Memory”. *Front Cardiovasc Med* **9**, (2022).
97. Chettimada, S. *et al.* Vascular smooth muscle cell contractile protein expression is increased through protein kinase G-dependent and -independent pathways by glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition and deficiency. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **311**, H904–H912 (2016).
98. Chi, C., Liu, Y., Xu, Y. & Xu, D. Association Between Arterial Stiffness and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Cardiovasc Med* **8**, 707162 (2021).
99. Park, S.-H. *et al.* Empagliflozin improved systolic blood pressure, endothelial dysfunction and heart remodeling in the metabolic syndrome ZSF1 rat. *Cardiovasc Diabetol* **19**, 19 (2020).
100. Ganbaatar, B. *et al.* Empagliflozin ameliorates endothelial dysfunction and suppresses atherogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Eur J Pharmacol* **875**, 173040 (2020).
101. Dupas, T. *et al.* The Endothelial Dysfunction Could Be a Cause of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction Development in a Rat Model. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, 1–30 (2022).
102. Schauer, A. *et al.* Sacubitril/Valsartan Improves Diastolic Function But Not Skeletal Muscle Function in a Rat Model of HFpEF. *Int J Mol Sci* **22**, 3570 (2021).
103. Adams, V. *et al.* High-intensity interval training attenuates endothelial dysfunction in a Dahl salt-sensitive rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *J Appl Physiol* **119**, 745–752 (2015).
104. Nadruz, W., Shah, A. M. & Solomon, S. D. Diastolic Dysfunction and Hypertension. *Medical Clinics of North America* **101**, 7–17 (2017).
105. Griffith, O. W. & Kilbourn, R. G. Nitric oxide synthase inhibitors: Amino acids. in 375–392 (1996). doi:10.1016/S0076-6879(96)68040-9.
106. Vítěček, J., Lojek, A., Valacchi, G. & Kubala, L. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. *Mediators Inflamm* **2012**, 1–22 (2012).
107. Abdelwahab, M. S., Mohammed, M. A. M., Abdelwhab, H. M., Mohamed, M. S. A. & Bellal, M. A. Basic Pharmacology of NG -Nitro – L – Arginine Methyl Ester. *J Adv Med Pharm Sci* **19**, 1–5 (2019).

108. Alsabeeh, N., Chausse, B., Kakimoto, P. A., Kowaltowski, A. J. & Shirihai, O. Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1863**, 143–151 (2018).
109. Abdelmagid, S. A. *et al.* Comprehensive Profiling of Plasma Fatty Acid Concentrations in Young Healthy Canadian Adults. *PLoS One* **10**, e0116195 (2015).
110. Carta, G., Murru, E., Banni, S. & Manca, C. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front Physiol* **8**, (2017).
111. Zhang, Y. *et al.* Palmitate induces VSMC apoptosis via toll like receptor (TLR)4/ROS/p53 pathway. *Atherosclerosis* **263**, 74–81 (2017).
112. Oh, S. *et al.* Pyrogallol-Phloroglucinol-6,6-Bieckolon Attenuates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Phenotype Switching in Hyperlipidemia through Modulation of Chemokine Receptor 5. *Mar Drugs* **18**, 393 (2020).
113. Zhang, Y. *et al.* PGC-1 α Inhibits Oleic Acid Induced Proliferation and Migration of Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *PLoS One* **2**, e1137 (2007).
114. Yang, K., Hitomi, M. & Stacey, D. W. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div* **1**, 32 (2006).
115. Bruno, S. & Darzynkiewicz, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* **25**, 31–40 (1992).