



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

“Participación de lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) en la inducción de autofagia y sobrevivencia de miofibroblastos cardiacos”

Memoria de título para optar al título de Químico Farmacéutico por:

Gabriel Ignacio Ceballos Zúñiga

Profesora patrocinante

Lorena García Nannig, PhD.

**Laboratorio de Inflamación y Estrés
Oxidativo Cardiovascular.
Dpto de Bioquímica y Biología Molecular.**

Directores

**Lorena García Nannig, PhD.
Hugo Díaz Alvarado, Ms.**

**Laboratorio de Inflamación y Estrés
Oxidativo Cardiovascular.
Dpto de Bioquímica y Biología Molecular.**

Santiago – Chile

2016

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1140713 (Lorena García, investigadora responsable)

Centro FONDAP 15130011 (Lorena García, investigadora asociada)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi gran familia, partiendo por mis padres: Roberto y Soledad, quienes desde que tengo uso de razón han creído en mí y mis habilidades y me han brindado su total apoyo y amor a lo largo de toda mi vida. Me ha aguantado, soportado y guiado como nadie y este logro es para ellos más que nadie, pues desde niño supe que era capaz; y si no hubiese tenido esa certeza, quizás ni lo hubiese intentado.

A mis hermanas: Tania, por apoyarme, amarme y malcriarme desde que llegue a su vida, por siempre estar dispuesta a cederme lo suyo y por la comprensión que me ha tenido especialmente este último tiempo; y Constanza por darnos una oportunidad como familia y unirse a nosotros y a mi vida, entregando todo su amor y recibiendo todo el nuestro, brindándome alegría cada vez que nos vemos y sonriendo para mí como sueles hacer.

A mi polola, Constanza (sí, se llama igual que mi hermana), por soportarme y guiarme en todo este proceso de memoria de título. Cada vez que dude o me sentí incapaz ella me mostraba o ayudaba a encontrar la respuesta para seguir, fue capaz de acompañarme en cada momento del desarrollo de este trabajo y no sé como pero me aguantó como nadie. Sin tí, pucha que me hubiese costado. ¡Te amo!

A mis abuelos: Mi tata Jorge, mi Abuelo, mi Tata Tito, y mi Abuelita Georgina. Cada uno de ellos contribuyó enormemente en definirme como niño, joven, y persona. Siempre agradeceré a la vida por permitirme crecer con mis 4 abuelos cerca de mí, fui y soy muy afortunado (¿Quién vive con sus 4 abuelos a menos de 4 cuadras?). Cada uno de ellos me crío, educó, malcrió, y enseñó; y lo siguen y seguirán haciendo. Pues a pesar de que ya no todos están (Te amo abuelita), todo lo que han dejado es un montón de experiencia de vida, la cual aún no he terminado de recibir.

A mis tíos y tías, especialmente a Laly, Mauro, Marianella, Claudia, Maricella, Leo y Juan. Desde chiquitito fueron fundamentales en mi crecimiento, cada cual mostrándome la vida de diferentes maneras y dándome diferentes experiencias. Mi tía Laly y mi tío Mauro que siempre me han recibido en su casa como si fuera un hijo más, mi tía Marianella quien me demostró que el amor va más allá de los kilómetros de distancia y el tiempo que uno puede estar sin ver a sus seres queridos, la Claudia quién me regaló desde niñito siempre se preocupó de estar presente y ser alguien en mi vida, la Mary por enseñarme lo que es el sacrificio y un amor más allá de lo “convencional” hacia los

padres, a mi Tío Leo por la infancia que me dejó vivir con él, y por seguir en mi vida y a mi Tío Juan por el cariño que siempre me ha entregado y quien hoy más que nunca necesita de nuestro apoyo.

A mis primos: Franco, Mauricio, Nicolás, Rodrigo, Fernando y Martín. El Franco, el Mao y el Nico desde siempre fueron mis compañeros de juegos, aún ni siquiera tenía uso de razón y ya estaba con el Franco, luego nació el Mao y finalmente el Nico. Sinceramente no recuerdo mi vida sin ellos y estoy muy feliz y agradecido de que nuestros lazos sean tan fuertes como para seguir siendo los mismos cabros chicos de siempre. Rodrigo es mi primo mayor, y lo conocí ya más grande pues no vivía en Chile. Desde que apareció en mi vida fue un pilar fundamental para mí, pues su apoyo, sus consejos, y su constante preocupación hicieron de él, alguien a quien admiro y que me ayudó a definirme, ser como soy, y ser como quiero ser. Fernando y Martín son los menores, cada cual me da una alegría particular y única, y me han hecho querer mejorar como persona para ojalá yo ser un buen ejemplo para ellos.

A mis amigos del liceo: Esteban, Iván, Miguel, Matías, Ignacio y Myron. De alguna forma nos las arreglamos para mantenernos en contacto, de alguna forma siempre nos veíamos, y de alguna forma u otra me mostraron su apoyo. Mención especial a Esteban e Iván que si no fuera por ellos quizás ni siquiera hubiese entrado a estudiar, pues fueron fundamental en mi desarrollo como estudiante en el Liceo, me ayudaron a volver a confiar en mis capacidades y a retomar el amor por aprender.

A mis amigos de la facultad: Pau C., Diego M., Luis, Pau A., Katherine (Katu), Karl, Mauro, Daniela I., Diego B., Sergio, Javiera, Sebastián, Víctor, Hans, Bastián, Rodolfo, Edgar, Víctor, Daniela L. y Felipe. Cada uno de ellos me acompañó en diferentes etapas, la mayoría lo siguen haciendo, y espero que lo sigan haciendo. Pueden ser muchos pero realmente cada una de estas personas me enseñó y me acompañó en el proceso universitario. Son muchas las experiencias vividas, y es lo que más se agradece, la compañía en cada parte de la vida. Una mención también a mi siempre querido 3 Litros Basket Team, que nunca ganamos nada pero como una vez nos dijo el tío del Ricoffe: “Los admiro porque eran malos pa’ jugar, pero es sorprendente que pasan los años y se siguen juntado, cualquiera se hubiese desanimado”, o algo así jajaja, de verdad gracias por todo. Además agradecer al Prof. Julio quien siempre me brindo una mano o una palabra ante cualquier duda o consejo que necesitase.

A mis amigos “de la vida”, por decirlo de alguna manera: Christian, Ricardo, Francisco, Luisfi, Nicolás, Rayen, Paz y Camila. Cada cual participó y participa en

diferentes aspectos de mi vida, cada cual me enseñó y enseña diferentes cosas. Gracias por la paciencia y los momentos que hemos compartidos. Especialmente a Paz quien desde hace más de 10 años se ha mantenido en mi vida a pesar de lo negligente que he sido con ella, de verdad, gracias. Y a Francisco quien nos dejó hace unos años pero jamás olvidaré lo buen amigo que es.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Sebastián, Mónica, Camila, Eliseo, Elías, Marcelo, Fernanda, Ignacio y Hugo. Gracias por la paciencia durante este año, por todo lo que me enseñaron y por cada conversación banal y relajante que tuvimos durante este periodo. Mención especial a Hugo quien fue aquel que más me enseñó y guió durante todo este proceso, que a pesar de haberse ido me siguió ayudando con las mismas ganas y fuerzas y siempre tenía palabras para aconsejarme en lo que estaba haciendo.

Finalmente agradecer a quien hizo esto posible al aceptarme a entrar en su grupo de trabajo: la Profesora Lorena. Gracias por toda la paciencia que me ha brindado, sé que más de un dolor de cabeza le pude causar por mis descuidos. Y se de toda la paciencia que se tuvo que armar para tratar conmigo. De verdad gracias por todo lo que me ha enseñado, y por todo lo que me entregó; de lo cual aún sigo aprendiendo.

Realmente les agradezco de corazón a cada persona mencionada, pues de alguna manera u otra hicieron esto posible, y siempre estarán en algún rinconcito de mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.....	2
1.2. Autofagia.....	3
1.3. LDL oxidado y su receptor LOX-1.....	6
2. HIPÓTESIS.....	9
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
a) Evaluar en miofibroblastos cardiacos de rata el efecto de oxLDL sobre la autofagia.....	9
b) Determinar el efecto de autofagia y oxLDL en la sobrevivencia de MFC.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Animales.....	10
4.2. Reactivos.....	10
4.2.1. Preparación de reactivos y soluciones.....	11
4.3. Métodos.....	12
4.3.1. Obtención de miofibroblastos cardíacos de ratas neonatas.....	12
4.3.2. Protocolo de estímulos en miofibroblastos cardíacos.....	13
4.3.3. Ensayos de viabilidad celular.....	13
4.3.4. Ensayo de Western blot.....	13
4.3.5. Preparación de LDL nativo y LDL oxidado.....	14
4.3.6. Análisis estadístico.....	15
5. RESULTADOS.....	16

5.1	Evaluación del efecto de LDL oxidado en la autofagia de miofibroblastos cardíacos.	16
5.2	Evaluación del efecto de LDL oxidado y autofagia en sobrevida de miofibroblastos cardíacos.....	23
6.	DISCUSION.....	27
7.	CONCLUSIONES.....	31
8.	BIBLIOGRAFIA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación de fibroblasto cardíaco a miofibroblasto cardíaco.....	3
Figura 2. Proceso de formación de vesículas autofágicas	5
Figura 3. Efecto propuesto de LDL oxidado en miofibroblastos cardíacos	8
Figura 4. Efecto de oxLDL en flujo autofágico en niveles de LC3-II.....	18
Figura 5. Efecto de LDL oxidado en los niveles de LC3-II	19
Figura 6. Efecto de LDL oxidado en los niveles de Beclin-1.	21
Figura 7. Efecto de oxLDL en la activación de LOX-1/NADPH Oxidasa	22
Figura 8. Efectos de LDL oxidado, cloroquina y rapamicina en viabilidad celular de miofibroblastos cardíacos.	23
Figura 9. Efecto de H ₂ O ₂ en viabilidad celular de miofibroblastos cardíacos.	24
Figura 10. Efectos de autofagia en sobrevivencia celular de miofibroblastos cardíacos tratados con H ₂ O ₂	25
Figura 11. Efecto de LDL oxidado en sobrevivencia celular de miofibroblastos cardíacos tratados con H ₂ O ₂	26
Figura 12. Efectos de LDL oxidado en autofagia y sobrevivencia celular de miofibroblastos cardíacos.	30

ABREVIATURAS

ANOVA	“ <i>Analysis of Variance</i> ”: Análisis de varianza
Apo B100	Apolipoproteína B-100
Atg	“Autophagy related gen”. Gen relacionado a autofagia
Bcl-2	“ <i>B-cell lymphoma-2</i> ”: proteína de linfoma de células B-2
BSA	“ <i>Bovine Serum Albumin</i> ”: Albúmina de suero bovino
csp	cantidad suficiente para
DMEM	“ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ”: Medio Eagle de Dulbecco modificado
ECV	Enfermedades cardiovasculares
FBS	“ <i>Fetal Bovine Serum</i> ”: Suero fetal bovino
FC	Fibroblasto cardíaco
HUVEC	“ <i>Human umbilical vascular endothelial cells</i> ”: Células endoteliales vasculares humanas.
IAM	Infarto agudo del miocardio
IC	Insuficiencia cardíaca
LC3	“Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3”: Proteína 1A/1B de cadena liviana 3 asociada a microtúbulos.
LDL	“ <i>Low-Density Lipoprotein</i> ”: Lipoproteína de baja densidad
LOX-1	“ <i>Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i> ”: Receptor de lipoproteína oxidada de baja densidad similar a lectina-1
MEC	Matriz extracelular
MFC	Miofibroblasto cardíaco
MMP	“ <i>Matrix Metalloproteinase</i> ”: Metaloproteinasas de matriz extracelular
mTOR	“ <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> ”: Blanco de rapamicina en mamíferos.
NADPH	“ <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> ”: Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
nLDL	“ <i>Native Low-Density Lipoprotein</i> ”: Lipoproteína nativa de baja densidad
NOX	NADPH oxidasa
oxLDL	“ <i>Oxidized low-density lipoprotein</i> ”: Lipoproteína de baja densidad oxidada
PBS	“ <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ”: Fosfato salino tamponado
PVDF	“ <i>Polivinyllidene fluoride</i> ”: Polifluoruro de vinilideno
Rapa	Rapamicina

RIPA	<i>“Radioimmunoprecipitation Assay buffer”</i> : Amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación
ROS	<i>“Reactive Oxygen Species”</i> : Especies reactivas del oxígeno
SDS	<i>“Sodium Dodecyl Sulphate”</i> : Dodecil sulfato de sodio
SEM	<i>“Standard Error of the Mean”</i> : Error estándar de la media
TBS	<i>“Tris-buffered saline”</i> : Tris salino tamponado
TGF- β 1	<i>“Transforming Growth Factor-β1”</i> : Factor de crecimiento transformante- β 1
VSMC	<i>“Vascular smooth muscle cell”</i> . Células de músculo liso vascular
WB	<i>“Western blot”</i>
α -SMA	<i>“α-Smooth Muscle Actin”</i> : α -actina de músculo liso

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo. Los elevados niveles de colesterol y lipoproteína de baja densidad (LDL), que se han relacionado a un aumento de la cantidad de LDL oxidado (oxLDL) destacan entre los factores de riesgo.

OxLDL se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis cardíaca posterior al daño miocárdico y a la activación o inhibición del proceso autofágico en diferentes modelos celulares. Los miofibroblastos cardíacos (MFC) son células diferenciadas de fibroblastos cardíacos. Son los principales productores de matriz extracelular (MEC) luego del daño tisular, formando un tejido de cicatriz. Una vez terminada su función, los MFC mueren por apoptosis. Sin embargo, se ha identificado la persistencia de MFC en el corazón después del daño, condición que favorece el desarrollo de fibrosis. No hay evidencias que relacionen oxLDL, autofagia y sobrevida celular.

En esta memoria se propuso la siguiente hipótesis: “**oxLDL induce autofagia y aumenta la sobrevida en miofibroblastos cardiacos**”. Los objetivos a desarrollar fueron: **a)** Evaluar el efecto de oxLDL en autofagia de MFC y **b)** Determinar el efecto de autofagia y oxLDL en sobrevida de MFC.

Se trabajó con MFC estimulados con oxLDL a diferentes concentraciones y tiempos, con el fin de evaluar el efecto en el flujo autofágico. Para ello, se cuantificaron los niveles de LC3-I y LC3-II mediante Western blot. Se utilizó H₂O₂ como estímulo de muerte para estudiar los efectos de oxLDL y autofagia en la viabilidad celular por conteo con azul de Tripán.

Los resultados de este trabajo indicaron que: **a)** oxLDL por sí solo no indujo activación de la autofagia, sin embargo disminuye la acumulación de LC3-II inducida por cloroquina. **b)** Autofagia inducida por rapamicina disminuye la viabilidad celular ante estímulo de muerte de H₂O₂. **c)** oxLDL no afecta la viabilidad celular ante estímulo de muerte H₂O₂, no obstante disminuye la muerte celular inducida por rapamicina y H₂O₂.

ABSTRACT

Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) participation on autophagy induction and survival of cardiac myofibroblast

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. A major risk factor in these diseases is high levels of cholesterol and low-density lipoprotein (LDL), and this has been correlated with high levels of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL).

OxLDL is linked to fibrosis development after myocardial injury and this has been correlated with activation or inhibition of autophagic process in various cellular models. Cardiac myofibroblasts (CMF) are a differentiated phenotype from cardiac fibroblasts (CF). They are the main extracellular matrix producers after tisular injury, MFC make a scar and then die via apoptosis. Nevertheless, CMF in cardiac tissue have been identified after their work, this condition promotes fibrosis development and cardiac failure. There is no evidence of relationship between oxLDL, autophagy and cellular survival.

The following hypothesis was proposed to this work: “***oxLDL induces autophagy activation and enhances cardiac myofibroblast survival***”.

Specifics objectives to answer the hypothesis were: **a)** To evaluate the effect of oxLDL on autophagy of MFC, and **b)** To determine the effects of oxLDL and autophagy on MFC survival.

To fulfill the proposed objectives MFC were stimulated with oxLDL and its effects were observed on autophagic flux. LC3-I and LC3-II levels were quantified by Western blot. H₂O₂ was used as a death stimulus to observe oxLDL and rapamycin-induced autophagy on cellular survival the viable cells where counted by tripan blue method.

The results of this works show that: **a)** oxLDL has no effect on LC3-II levels under normal conditions, but diminish LC3-II chloroquine-induced LC3-II accumulation. **b)** Rapamycin-induced autophagy diminishes cell survival on death stimulus H₂O₂. **c)** oxLDL has no effect on cell survival, but reverts loss of cell viability on MFC treated with H₂O₂ and rapamycin.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte a nivel nacional y mundial (1). Los principales factores de riesgo se relacionan fuertemente con el estilo de vida del hombre moderno (obesidad, sedentarismo y vicios como el alcohol y el tabaco) (1–3). Estos factores de riesgo se relacionan con elevados niveles plasmáticos de colesterol asociados a la lipoproteína de baja densidad (LDL, “*Low-density lipoprotein*”), que en su forma oxidada (oxLDL, “*oxidized low-density lipoprotein*”) se asocia a diferentes mecanismos de ECV como hipertensión y aterosclerosis (4,5), así como a infarto agudo del miocardio (IAM) (3).

En daño cardíaco, como en IAM, se inicia un proceso de reparación que involucra diferentes mecanismos moleculares y tipos celulares, finalizando con la formación a una cicatriz de colágeno en el área infartada (6,7). Se ha observado que luego de IAM, a largo plazo se desarrolla insuficiencia cardíaca (IC). La IC está relacionada con fibrosis posterior a un IAM, donde la sobreproducción de matriz extracelular (MEC) conlleva a una pérdida de la función normal del ventrículo izquierdo, deteriorando la capacidad contráctil del corazón (6,8,9). Se ha observado que esta sobreproducción de MEC es causada por la permanencia crónica de miofibroblastos cardíacos (MFC) en el corazón (6,9,10).

Estudios de Ghavami y cols. (7) han demostrado que la fibrogénesis mediada por el factor transformante de crecimiento β_1 (TGF- β_1 , “*transforming growth factor- β_1* ”) está relacionada a varios procesos fisiopatológicos, entre ellos el desarrollo de fibrosis, la cual está regulada por la capacidad de este factor de inducir autofagia en miofibroblastos auriculares humanos.

La autofagia, un proceso que existe en todos los tipos celulares y es altamente regulado, se ha asociado a cardioprotección en condiciones de estrés, como en IAM (11) o en falta de nutrientes (12,13), donde su activación disminuye el tamaño de la zona dañada. Otros estudios muestran la dependencia de TGF- β_1 con el receptor de lipoproteína de baja densidad tipo lectina-1 (LOX-1, “*Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*”) para producir colágeno (14). Se ha observado que en células de la musculatura lisa vascular (VSMC, “*vascular smooth muscle cell*”) oxLDL induce autofagia al activar el receptor de oxLDL LOX-1 (15–17) y que la autofagia inducida por LOX-1 es dependiente de estímulos como Angiotensina-II (Ang-II) (18).

No se ha investigado la relación entre autofagia y supervivencia de miofibroblastos cardíacos (MFC), pero estudios preliminares de nuestro laboratorio indican que los niveles basales de autofagia en los MFC son mayores que en los fibroblastos cardíacos (FC). Además, un trabajo de tesis de nuestro laboratorio demostró que los MFC poseen una mayor tolerancia al estrés oxidativo y una mayor expresión de LOX-1 que los FC (19).

1.1. Fibroblastos y miofibroblastos cardíacos

El corazón, principal órgano afectado por las ECV, está compuesto por diferentes tipos celulares, entre los que destacan los cardiomiocitos y los fibroblastos cardíacos. Los cardiomiocitos corresponden a aproximadamente el 20% de población celular del miocardio y son encargados de la contracción del músculo cardíaco. Los fibroblastos corresponden al 70% de la población celular y su rol es la mantención estructural y la homeostasis del miocardio (20). También, se ha reportado que los FC son capaces de regular la transmisión de señales mecánicas y eléctricas, mediante interacciones fibroblasto-fibroblasto o fibroblasto-cardiomiocito, respectivamente (21). Además, los FC son los principales productores y reguladores de la MEC debido a su capacidad de producir colágeno y de mediar la actividad de metaloproteinasas (MMP), siendo claves en la mantención del equilibrio de la MEC (20,22). Para ejercer esta acción los FC deben comunicarse a través de señales, secretando mediadores que actúan tanto de forma paracrina como autocrina, entre los que se encuentran el TGF- β_1 , prostaglandinas, citoquinas, entre otros (21). Estas señales permiten a los FC y a otras células sensor estado fisiológico del corazón, pudiendo actuar en conjunto eficazmente ante estímulos dañinos (23).

Los MFC son células diferenciadas con mayor capacidad contráctil y fibrogénica que los FC (6). Se caracterizan por expresar α -actina de músculo liso (α -SMA), proteína no expresada por FC, siendo utilizada como marcador de diferenciación (24). Los MFC son los principales responsables del proceso reparativo, sintetizan colágeno tipo I y III, fibronectina ED-A, MMP-2 y MMP-9, proteínas encargadas de la formación y deposición de la cicatriz en el área dañada (19) (**Figura 1**).

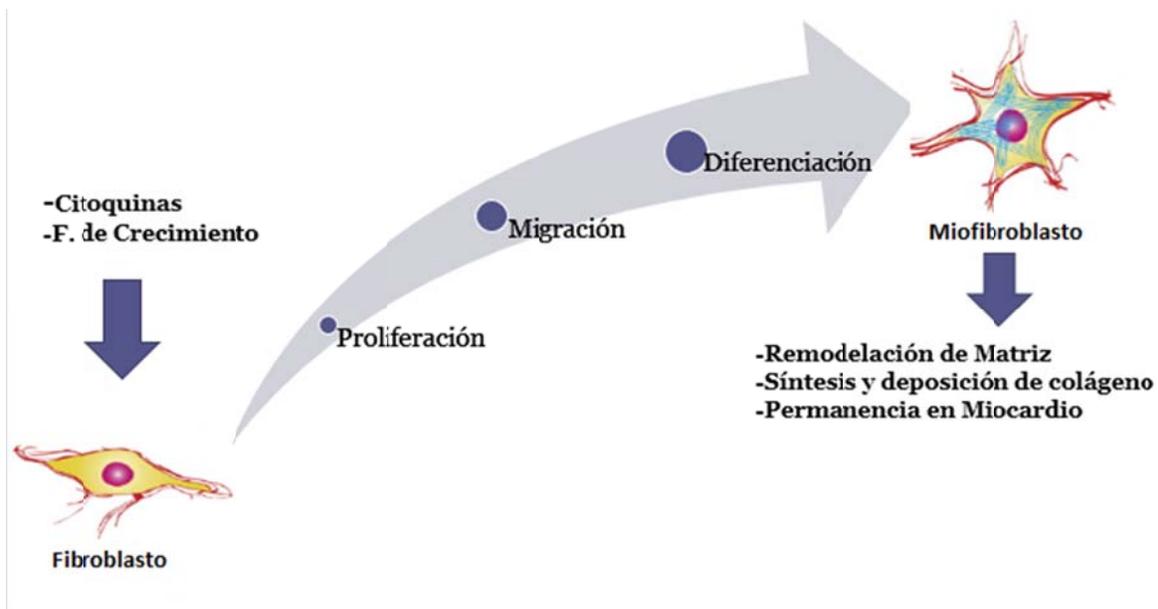


Figura 1. Diferenciación de fibroblasto cardíaco a miofibroblasto cardíaco. Los fibroblastos responden a citoquinas y factores de crecimiento liberados en la fase inflamatoria de respuesta a daño cardíaco, dando inicio a la fase proliferativa, caracterizada por un aumento y reclutamiento de fibroblastos en el área dañada y la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Los miofibroblastos están encargados de la remodelación de la matriz extracelular y la síntesis y deposición de colágeno, formando la cicatriz cardíaca. Imagen modificada de (6)

Una vez finalizada la fase proliferativa, cuando el daño ha sido reparado, en fase de maduración, los MFC mueren por apoptosis, dejando sólo la cicatriz de colágeno en el área infartada (25). Se ha reportado la prevalencia crónica de MFC en áreas no infartadas posterior a un episodio de IAM. Esto produce aumento de la producción de proteínas de MEC, ocasionando fibrosis, lo que conlleva a pérdida de elasticidad y funcionalidad del corazón, lo que finalmente culmina en insuficiencia cardíaca (6,9,22). Se desconoce el mecanismo por el cual los MFC no cesan su actividad, pero se presume que permanecen crónicamente activos en respuesta al elevado estrés mecánico en el que se encuentran (6,9). No existen estudios que indiquen bajo qué mecanismos estos MFC no entran en apoptosis, pero se ha relacionado el proceso de autofagia como un mecanismo de supervivencia celular en condiciones de estrés en células cardíacas (11), por lo que posiblemente existe un rol de este proceso con la supervivencia de los MFC.

1.2. Autofagia.

La autofagia es un proceso catabólico altamente regulado el cual permite la degradación de proteínas u organelos defectuosos, cumpliendo un rol protector en la

célula, ayudándola a sobrellevar situaciones de estrés ocasionado por diversos factores; tales como compresión mecánica, falta de nutrientes u otros (11,26,27). El mecanismo consiste en la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Los autofagosomas secuestran proteínas, organelos, o porciones del citoplasma y las trasladan a vacuolas/lisosomas para su degradación y reciclaje (11,27) (**Figura 2**).

Existen al menos 3 diferentes mecanismos autofágicos: Macro-autofagia, micro-autofagia, y autofagia mediada por chaperonas. Estas varían en la selección del cargo para el autofagosoma, y pueden llegar a ser selectivas o no selectivas en la degradación de organelos, ribosomas, agregados proteicos o fracciones citoplasmáticas. La macro-autofagia fue el primer modelo de autofagia descrito y corresponde al tipo de autofagia más ampliamente estudiado, por lo que es comúnmente denominada simplemente “autofagia” en la literatura (27).

La autofagia inicia con la formación del fagóforo (o membrana de aislamiento), en el cual se agrupan las proteínas y organelos secuestrados hasta que se completa el autofagosoma, encargado de transportar el material a degradar hasta los lisosomas, con el cual fusionan membranas, formando el autolisosoma y degradando en su interior el contenido de la vesícula (27,28).

El complejo de fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), proteína vacuolar de destinación 34 (Vsp34) y beclin-1 da inicio a la formación del fagóforo; este complejo está inhibido por la interacción entre Beclin-1 y Bcl-2, y por la actividad del blanco de rapamicina de mamíferos (mTOR, “mammalian Target of Rapamycin”). En condiciones de falta de nutrientes, Bcl-2 se fosforila, liberando Beclin-1, por su parte, mTOR es inactivado por lo que se favorece el proceso autofágico (26). Junto a PI3K existen dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (Ubl) interrelacionados que ocurren paralelamente formando finalmente el complejo Atg12-Atg5/16 y LC3-PE (Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos-fosfatidil-etanolamina) o también conocida como LC3-II (29–31). Estos dos sistemas tienen un rol en la regulación de la elongación y expansión del autofagosoma en formación (27,29–32).

El complejo Atg12-Atg5/16 se conjuga mediante un proceso de similar al de ubiquitinación (31). Atg12 es activada por Atg7 (Enzima activadora E1) y luego transferida a Atg10 (enzima conjugadora E2), la cual permite la unión covalente a una lisina interna (K130) de Atg5; siendo este proceso constitutivo e irreversible (31). Las proteínas conjugadas Atg12-Atg5 interactúan con la proteína Atg16, uniendo este complejo Atg12-Atg5-Atg16 en un tetrámero por auto-oligomerización, y uniéndose al fagóforo (33,34).

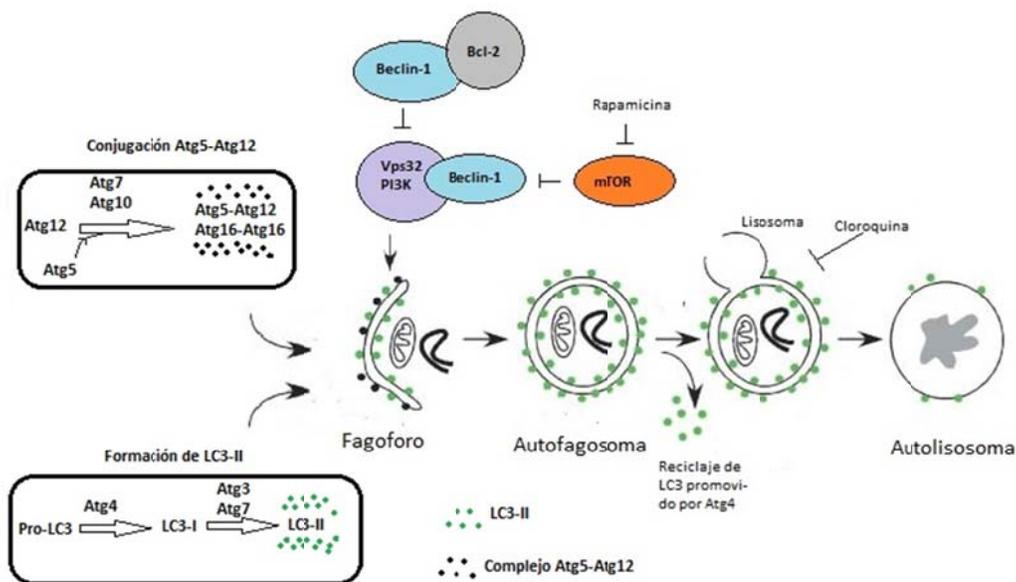


Figura 2. Proceso de formación de vesículas autofágicas. El complejo PI3K-Vsp34-Beclin-1 da inicio a la formación del fagóforo; el cual agrupa las proteínas y organelos a ser degradados hasta la formación de autofagosoma; una vez completo el autofagosoma, es capaz de fusionarse con el lisosoma para formar el autolisosoma donde se degradarán las macromoléculas orgánicas. Figura modificada de (27).

La conjugación de LC3 es similar al proceso anterior. El inicio de esta conjugación es mediante el procesamiento de pro-LC3 por Atg4, una proteasa que cual libera un residuo de arginina permitiendo la exposición de un residuo de glicina en el carboxilo, lo que permite que interactúe con Atg7 (E1) y gracias a esta interacción, que Atg3 (E2) haga su acción reemplazando a Atg7 formando LC3-Atg3. El complejo LC3-Atg3 es finalmente conjugado al lípido PE a través de un enlace amida, proceso facilitado por el conjugado Atg12-Atg5 tipo E3, el cual secuestra a Atg3 y permite la unión del lípido PE. A diferencia de la formación del complejo, este proceso es reversible (30,35).

El complejo Atg12-Atg5/16 es esencial para la elongación de la membrana pre-autofagosomal pero se disocia del autofagosoma completamente formado. Por su parte LC3 se encuentra en condiciones normales mayoritariamente en el citosol (en cambio durante el proceso autofágico LC3 se encuentra predominantemente en su forma lipídada (LC3-II) y se localiza en ambas membranas del fagóforo, controlando el tamaño del autofagosoma (31,32).

Cuando el autofagosoma está formado, se fusiona con el lisosoma con ayuda de la proteína de membrana lisosomal LAMP-2 y la GTPasa Rab7 (36,37). En este proceso LC3-II es liberada de la membrana externa del autofagosoma hacia el citosol, pudiendo ser deconjugada a LC3-I por Atg4; la LC3-II de la membrana interna es degradada en el autolisosoma (30,38). Luego de la fusión, la degradación del material depende de hidrolasas ácidas lisosomales. Finalmente, el producto es transportado al citosol para ser reciclado y reutilizado en la síntesis de proteínas y otras macromoléculas (membranas por ejemplo), ayudando a mantener funciones celulares en condiciones de estrés como privación de nutrientes (27).

En el miocardio, se ha reportado que la falta de nutrientes aumenta marcadores de autofagia (12,13). En IAM la autofagia en la zona infartada protege de la muerte celular, minimizando el daño (11). En hipertrofia ventricular izquierda se ha encontrado una elevada cantidad de autofagosomas (13).

Estos antecedentes indican un rol cardioprotector de la autofagia, aumentando sobrevivencia de células cardíacas en condiciones de estrés. Además se ha reportado en VSMC, células endoteliales y células cancerígenas HT-29 que la autofagia puede ser inducida por oxLDL (15–17)

Resultados preliminares de nuestro laboratorio demostraron que MFC poseen mayores niveles de LC3-II que los FC. Lo que podría sugerir que la autofagia es un proceso determinante en la permanencia del fenotipo miofibroblástico.

1.3. LDL oxidado y su receptor LOX-1.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) están compuestas por ésteres de colesterol y triglicéridos que forman un núcleo lipídico central rodeado por una monocapa de fosfolípidos, y en la parte externa se asocia una proteína llamada apolipoproteína B₁₀₀ (ApoB₁₀₀) (39). La función principal de las LDL es el transporte de colesterol desde el hígado hasta los tejidos periféricos. Las LDL se pueden oxidar debido a su alto porcentaje de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), los cuales al ser peroxidados dan inicio a cambios estructurales dando como producto final aldehídos tóxicos, capaces de modificar la estructura de la ApoB₁₀₀ formando bases de Schiff, aumentando la carga superficial negativa de estas lipoproteínas (39). Se ha sugerido que la oxidación de las LDL puede ocurrir en la pared arterial o en la circulación sanguínea. En células de la pared arterial se encuentran diferentes enzimas oxidativas, como lipooxigenasas y mieloperoxidasas, y

también iones activos con capacidad oxidativa como hierro y cobre, que pueden ejercer un rol oxidativo (4,5,40).

Se ha relacionado oxLDL con diversas ECV, como aterosclerosis, donde se ha evidenciado un rol patológico de esta partícula oxidada (4,5). En IAM se han encontrado niveles plasmáticos elevados del receptor de oxLDL, LOX-1, el que se ha relacionado al desarrollo de fibrosis cardíaca (41).

El receptor LOX-1 ha despertado el interés de las nuevas investigaciones en enfermedades cardiovasculares, debido a que está relacionado con diversos procesos fisiopatológicos como autofagia, apoptosis, inflamación y estrés oxidativo (42). En FC de ratón se ha demostrado que el silenciamiento de LOX-1 produce quiescencia celular y que fibroblastos de ratones envejecidos expresan menores cantidades de LOX-1 (43). Además, se ha reportado un rol importante de LOX-1 en la producción de colágeno dependiente de TGF- β_1 , dado que el silenciamiento de LOX-1 induce una disminución en los niveles de TGF- β_1 y colágeno del tipo I y III (14). Existen estudios que demuestran que el silenciamiento de LOX-1 disminuye autofagia en células del cuerpo calloso (18). Sin embargo, en la actualidad no existen antecedentes sobre el efecto de la activación de LOX-1 por oxLDL en autofagia ni sus posibles efectos en la sobrevida del MFC.

En resumen, el estado del arte indica que:

1.- El rol fibrogénico de TGF- β_1 está regulado por la expresión de LOX-1 (14), y además LOX-1 regula la autofagia inducida por Ang-II en células de cuerpo calloso de rata hipertensiva.(18).

2.- La activación de LOX-1 por oxLDL induce autofagia en células VSMC de aorta de ratas, células cancerígenas HT-29 y células endoteliales humanas (15–17).

3.- La autofagia cumple un rol cardioprotector en condiciones de estrés en células cardíacas, aumentando su sobrevida celular en estas condiciones (11–13).

4.- En el desarrollo de la fibrosis cardíaca, destacan la sobrevida celular de los MFC en zonas no infartadas y su alta tasa de producción de MEC (6,9).

La **Figura 3** resume los antecedentes descritos y contextualiza el posible rol del oxLDL en la autofagia y la sobrevivencia celular de los MFC.

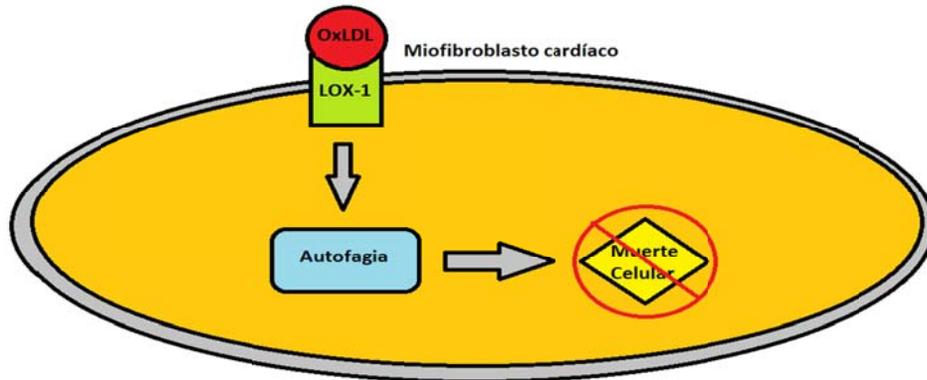


Figura 3. Efecto propuesto de LDL oxidado en miofibroblastos cardíacos. Según los antecedentes presentados, la unión de oxLDL a su receptor LOX-1 induciría autofagia en miofibroblastos cardíacos. La activación de autofagia inducida por oxLDL/LOX-1 inhibiría la muerte celular en condiciones de estrés

Esta memoria de título tuvo como objetivo evaluar el efecto de oxLDL sobre autofagia en MFC de rata neonata, y el rol de la autofagia en la sobrevivencia de celular frente a condiciones de estrés oxidativo.

2. HIPÓTESIS

“La lipoproteína de baja densidad oxidada, oxLDL, induce autofagia y aumenta la sobrevida en miofibroblastos cardiacos de rata”.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar en miofibroblastos cardiacos de rata el efecto de oxLDL sobre la autofagia.

Para la realización de este objetivo se estimularon los MFC con oxLDL a diferentes tiempos y concentraciones para evaluar su efecto en el flujo autofágico normal y detenido. Para observar los cambios en la autofagia de MFC se cuantificó LC3 por Western blot del lisado celular posterior a los estímulos.

- b) Determinar el efecto de autofagia y oxLDL en la sobrevida de MFC.

Para la realización de este objetivo se estimularon los MFC con H₂O₂ como inductor de muerte para evaluar los efectos de oxLDL y de autofagia inducida por rapamicina en la viabilidad celular. Para medir la viabilidad celular se realizó conteo de células por azul de Tripán.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se trabajó con ratas neonatas Sprague-Dawley. Las ratas fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios fueron realizados de acuerdo a la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, 1996). Los fibroblastos utilizados en este trabajo provienen del protocolo N° CBE2013-04 (proyecto FONDAF 15130011), aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. En este protocolo se aíslan miocitos cardíacos, y los fibroblastos son eliminados, y son estas últimas células las que se recuperaron para realizar este trabajo.

4.2. Reactivos

- De Winkler: NaCl, KCl, NaH₂PO₄, MgSO₄, HEPES ác. libre, NaHCO₃, Tris base, ácido deoxicólico, dodecil sulfato de sodio, glicerol, 2-mercaptoetanol, acrilamida, bis-acrilamida, glicina, TEMED, persulfato de amonio, ácido sulfosalicílico, Tween-20.
- De Sigma: D-(+)-glucosa, rojo Ponceau, cloroquina, rapamicina, anticuerpo anti-p47phox, anticuerpo Anti-p47phox fosforilado, medio de cultivo Hanks, pancreatina.
- De Cell signaling: Anticuerpo anti-GAPDH, anticuerpo Anti-LC3.
- De Merck: Bicarbonato de sodio, piruvato de sodio, Tritón X-100, isopropanol, metanol, ácido tricloroacético, azul de Tripán, peróxido de hidrógeno 40 volúmenes, TGF-β₁, anticuerpo secundario anti-conejo.
- De Gibco: Medio de cultivo DMEM/F12, suero fetal bovino (FBS), tripsina-EDTA 10x, colagenasa tipo II.
- De Biorad: EDTA sal sódica, azul de bromofenol, reactivo de Bradford.
- De Roche: Cocktail inhibidor de proteasas, cocktail inhibidor de fosfatasa.
- De Thermo Scientific: Estándar de peso molecular para proteínas.
- De Marcherey Nagel: Membranas de PVDF.
- De Biological industries: Reactivo quimioluminiscente EZ-ECL, penicilina-estreptomina.
- De Amresco: Bicarbonato de sodio, HEPES.

4.2.1. Preparación de reactivos y soluciones

- Reconstitución de TGF- β_1 : Se resuspendió en 10 mL de PBS estéril a concentración final 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se almacenó en alícuotas a -20°C .
- Preparación de cloroquina: 32 mg de cloroquina en 2mL de PBS estéril (25 mM). Se almacenó en alícuotas a -20°C .
- Solución Acrilamida/Bis-Acrilamida (A/BA): Solución 29:1 p/v de acrilamida-bisacrilamida al 30% disueltos en agua destilada y protegidos de la luz. Se almacenó a 4°C .
- Amortiguador inferior para preparación del gel separador: 18,165 g Tris base, 4 mL de SDS 10%, agua destilada (csp 100 mL) y a pH 8,8 con HCl.
- Amortiguador superior para preparación del gel concentrador: 6,055 g Tris base, 4 mL SDS 10%, agua destilada (csp 100 mL) y a pH 6,8.
- Amortiguador de electroforesis 10X: 30,25 g Tris base, 144 g glicina, 10 g SDS, agua destilada (csp 1 litro).
- Amortiguador de transferencia 10X: 30,25 g Tris base, 144 g glicina, agua destilada (csp 1 litro).
- Solución de deshibridización 10X: 2 g rojo Ponceau, 30 g ácido tricloroacético, 30 g ácido sulfosalicílico, agua destilada (csp 100 mL).
- TBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris base, agua destilada (csp 1 litro) a pH 7,4 con HCl 6N.
- TBS-Tween 1X: 100 mL TBS 10X, 1 mL Tween-20, agua destilada (csp 1 litro).
- Amortiguador de lisis RIPA stock: 4,4 g NaCl, 0,65 g Tris base, agua destilada (csp 400 mL hasta llevar a pH 7,2), 5 g ácido deoxicólico, 8,9 g EDTA, 0,5 g SDS, 5 mL Tritón X-100. A 10 mL de solución RIPA stock, se agrega 1 tableta de inhibidores de proteasas y una de inhibidores de fosfatasa. Se almacena a -20°C .
- Amortiguador de carga para electroforesis 4X (pH 6,8): 20 mL glicerol, 10 mL 2-mercaptoetanol, 5 g SDS, 1,51 g Tris base, 0,01 g azul de bromofenol, agua destilada (csp 100 mL).
- Solución Hank's: 0,35 g de bicarbonato, 5,21 g Hepes, 9,5g Hanks, agua nanopura (csp 1 L), ajustar a pH 7,2.
- Medio de digestión: 0,02 g colagenasa tipo II, 0,06 g pancreatina, 100 mL Hank's.
- Medio de mantención: 800 mL DMEM, 200 mL M199.
- DMEM: 17,3 g DME, 6,51 g Hepes, 3,7 g bicarbonato de sodio, agua destilada (csp 1 L), 10 mL de penicilina-estreptomicina. Ajustar a pH 7,2.

- M199: 14,7 g M199, 6,51 g Hepes, 2,2 g bicarbonato de sodio, agua destilada (csp 1 L), 10 mL de penicilina-estreptomicina. Ajustar a pH 7,2.
- DMEM/F12: DMEM/F12, 1,2 g bicarbonato de sodio, agua destilada (csp 1 L), 10 mL de penicilina-estreptomicina. Ajustar a pH 7,2.

4.3. Métodos

4.3.1. Obtención de miofibroblastos cardíacos de ratas neonatas.

Los FC se aislaron de ratas neonatas de la cepa Sprague-Dawley de 1 a 3 días de vida. Los animales se sumergieron hasta el cuello en etanol 70% y fueron decapitados, se les removieron los corazones, los que se depositaron en un vaso precipitado con 10 mL de solución Hank's a 37°C, luego se lavaron 2 veces con esta misma solución. Los corazones se colocaron en placas Petri para la remoción de las aurículas. Los ventrículos se disgregaron en placas Petri con solución Hank's a 37°C con una hoja de afeitar en pequeños trozos, los que se colocaron en una botella plástica de cultivo de 25 mL con 13 mL en medio de digestión (ver en sección 4.2.1). Se selló la botella y se incubaron por 15 min a 37°C en baño termostático. Luego, se añadió 13 mL de medio de digestión y se volvió a incubar por 15 min a 37°C. Se centrifugó a 500 g durante 6 min, el sobrenadante se eliminó por aspiración y se añadió 3 mL de medio de mantención + 10% de suero fetal bovino (FBS) para resuspender las células. Las células se distribuyeron en placas de cultivo de 100 mm y se incubaron durante 2 h a 37°C, posteriormente, se retiró el medio de cultivo (donde se encontraban los cardiomiocitos) y se añadió 10 mL de medio de mantención + 10% FBS a la placa (Los FC se mantuvieron adheridos a la placa). Pasadas 18 h se lavó la placa de cultivo enriquecida en fibroblastos 3 veces con PBS y se añadió DMEM/F12 + 10% FBS. Se dejaron proliferar durante una semana hasta confluencia cambiando el medio cada dos días. Luego, los FC se desprendieron de la placa de cultivo con tripsina 0,1% en PBS. Se neutralizó la tripsina con 6 volúmenes de medio DMEM/F12 + 10% FBS y se contaron las células en suspensión por el método de exclusión azul de Tripán y se sembraron en placas de cultivo de 35 mm a 2×10^5 células por placa en medio DMEM-F12 + FBS 10%. Las células se estabilizaron por 4 h, y se verificó su adherencia por microscopía. Para la diferenciación a MFC se adicionó a cada placa TGF- β 1 a concentración final 10 ng/mL por 96 h en medio DMEM/F12 + 2% FBS.

4.3.2. Protocolo de estímulos en miofibroblastos cardíacos.

Pasadas las 96 h las placas de cultivo se lavaron con PBS y se les agregó 1,0 mL de medio de medio de nutrientes F12 + 2% FBS. Las células se estabilizaron por 2 h y luego se realizaron los diferentes estímulos según el protocolo a ensayar. Una vez finalizado el tiempo de estímulo, las placas fueron recibidas en hielo y lavadas 3 veces con PBS frío no estéril.

4.3.3 Ensayos de viabilidad celular.

Se evaluó la viabilidad celular por el método de exclusión de azul de Tripán. Una vez realizados los estímulos, las células se lavaron con PBS y se trataron con 250 μ L de Tripsina-EDTA 1X (Gibco) por 2 min para desprenderlas de la placa. El producto de digestión se mezcló con azul de Tripán (1:1) en cámara de Neubauer y se contaron las células viables (incoloras) y muertas (azul). La cantidad de células viables presentes se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de células viables} = (\text{Promedio Conteo}) * FD * \frac{10000}{\text{Volumen } (\mu\text{L})}$$

Donde el promedio de conteo corresponde al promedio de las células no coloreadas en cada uno de los cuadrantes de la cámara y FD corresponde al factor de dilución del producto de digestión con tripsina.

4.3.4 Ensayo de Western blot.

Luego del término de cada estímulo, las células se lisaron en 50 μ L de amortiguador RIPA, y se dejaron a -20°C durante 48 h, pasado este tiempo, usando un rastrillo para células en las placas de 35 mm se recolectó el lisado en tubos Eppendorf de 1 mL, en los que las células lisadas y recolectadas fueron sometidas a un sonicador a nivel 9 de potencia y luego se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C. Se tomaron los sobrenadantes y se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford, usando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar. Los sobrenadantes del lisado celular se prepararon en amortiguador de carga para electroforesis 1X a una concentración de 1 μ g/ μ L de proteína.

Se realizó SDS/PAGE en gradiente discontinua (15% y 5% de A/BA 30/0,8), para lo cual se cargaron 30 μ g del extracto proteico de cada muestra. Se realizó la corrida electroforética a 80 V. Una vez terminada la electroforesis se realizó una transferencia

líquida a membranas de PDVF a un amperaje constante de 40 mA por 15 h. Previo a la transferencia, las membranas de PVDF se activaron con metanol 95% durante 30 seg. Una vez realizada la electrotransferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau 1X por 5 min para verificar la transferencia de las proteínas al gel, se lavaron con amortiguador TBS-T, se bloquearon con leche comercial descremada al 3% en TBS-T durante 1 h. Posteriormente, se incubaron con el respectivo anticuerpo primario y se dejó a 4°C durante toda la noche con agitación suave. Las membranas se lavaron con TBS-T, se incubaron por 1 h con el respectivo anticuerpo secundario, se volvieron a lavar y finalmente, se evidenció la interacción antígeno-anticuerpo por el método quimioluminiscente por captura fotográfica en el equipo Syngene XT4. Se realizó análisis densitométrico de las fotografías por el uso del programa Un-scan-it.

4.3.5 Preparación de LDL nativo y LDL oxidado.

Las partículas de oxLDL y nLDL (LDL nativa) se prepararon en colaboración con el grupo del Dr. Jorge Toledo del Laboratorio de Biotecnología y Biofarmacia de la Universidad de Concepción.

Las partículas de nLDL se prepararon a partir de muestras de sangre obtenidas de 10 individuos sanos que firmaron un consentimiento informado (200 mL totales). Se aislaron partículas de LDL (1,019 a 1,063 g/mL) desde las muestras de plasma sanguíneo por ultracentrifugación secuencial a 4°C. Las partículas de LDL fueron dializadas contra amortiguador 3 veces durante 36 h a 4°C. Luego de una diálisis extensiva contra 3 cambios de PBS durante 36 h a 4°C, una parte de las nLDL obtenidas (1,5 mL) se almacenaron a 4°C y los 17 mL restantes se oxidaron para obtener las oxLDL. La oxidación de las LDL se realizó incubando las partículas purificadas con CuSO_4 7 mM durante 3 h a 37°C. La modificación oxidativa se monitoreó por espectroscopía a través de la generación de dienos conjugados a 243 nm y por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador borato de sodio para determinar el cambio en la migración electroforética entre la forma nativa y la oxidada. Los geles fueron posteriormente teñidos con azul de Coomassie R-250 y se analizó la movilidad electroforética de las bandas de nLDL y oxLDL. Se trabajó con nLDL y las partículas de oxLDL completamente oxidadas.

4.3.6 Análisis estadístico.

Los resultados se representaron como el promedio \pm SEM (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía con post-test de Tukey, usando el software GraphPad Prism 6. Se consideró diferencia significativa un $p < 0,05$, con un 95% de confianza.

5. RESULTADOS

Se ha evidenciado que el receptor de LDL oxidado, LOX-1, está altamente relacionado con desarrollo de fibrosis cardíaca y la inducción de la autofagia en ciertos modelos celulares (14,18,41). Además, se ha demostrado que la autofagia aumenta la sobrevivencia de células cardíacas ante daño del miocardio (11,12). En condiciones fisiológicas, los MFC, luego de cumplir su rol cicatrizante, por mecanismos aún no conocidos, mueren por apoptosis y el proceso de reparación culmina de forma normal. Mientras que en condiciones patológicas, dichos MFC no mueren y prevalecen en el corazón durante largos períodos de tiempo, favoreciendo el desarrollo de fibrosis cardíaca (6,23). Al no existir estudios que relacionen la sobrevivencia de estos MFC con autofagia, ni la activación de LOX-1 por oxLDL con el proceso autofágico, este trabajo tuvo como finalidad relacionar oxLDL, autofagia y sobrevivencia celular en MFC. Para lograrlo se definieron 2 objetivos específicos:

- Evaluar en miofibroblastos cardíacos de rata el efecto de oxLDL sobre la autofagia.
- Determinar el efecto de autofagia y oxLDL en la sobrevivencia de miofibroblastos cardíacos.

5.1 Evaluación del efecto de LDL oxidado en la autofagia de miofibroblastos cardíacos.

En el proceso autofágico, LC3-I es procesada, dando como producto LC3-II, que cumple una función importante en la formación y elongación del autofagosoma. Cuando el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, formando el autolisosoma, LC3-II se deconjugua a LC3-I o se degrada dentro de la vesícula autofágica (11,29,30).

Para determinar el efecto de oxLDL en la autofagia de MFC, se cuantificaron los niveles de LC3-I y LC3-II mediante Western blot, en condición control y con un flujo autofágico detenido, evitando la degradación de LC3-II. Para detener el flujo autofágico se utilizó cloroquina 25 μ M (CQ) como inhibidor de la fusión del autofagosoma con el lisosoma, lo cual genera una acumulación de LC3-II (44). En células VSMC y células HT-29 se ha evidenciado la capacidad de oxLDL de aumentar los niveles de LC3-II tanto en flujo autofágico normal como detenido (16,17), sugiriendo que en estos modelos celulares oxLDL induce autofagia. Para la realización de los experimentos se estimularon

MFC con oxLDL a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante tiempos de 1, 2, 6 y 24 h. con flujo autofágico normal y detenido por cloroquina.

Resultados en la **Figura 4 (A, B, C y D)** indican que oxLDL 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a ninguno de los tiempos de estímulo afecta la cantidad de LC3-II en el flujo autofágico normal. No obstante, oxLDL disminuye la acumulación de esta proteína cuando el flujo autofágico está detenido por cloroquina a los tiempos de 2 y 6 h (**Figura 4: B y C**). El efecto de oxLDL parece ser concentración dependiente, pues a mayor cantidad de oxLDL, hay una menor acumulación de LC3-II por cloroquina. Por otra parte, a los tiempos de 1 y 24 h (**Figura 4: A y D**) no se observaron diferencias significativas en los niveles de LC3-II en el flujo autofágico detenido por cloroquina más oxLDL, respecto a estímulo sólo con cloroquina.

Se investigó el efecto de oxLDL en flujo autofágico normal de manera tiempo/concentración-dependiente. Para ello, se estimuló MFC con oxLDL en concentraciones de 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante tiempos de 15 y 30 min, y 1, 3 y 24h. Mediante WB se cuantificaron las proteínas LC3-I y LC3-II.

Resultados en la **Figura 5 (A, B, C, D y E)** indican que a ninguno de los tiempos ni concentraciones de oxLDL utilizadas hay diferencias significativas de LC3-II respecto al control. Estos resultados sugieren, junto con los descritos en la **Figura 4** que oxLDL no disminuye los niveles basales de LC3-II, si no que los regula cuando se encuentran elevados debido a la detención del flujo autofágico por cloroquina.

Los efectos de oxLDL sobre el nivel de LC3-II sólo se observaron en flujo autofágico detenido (**Figura 4: B y C**), y junto a los resultados descritos en la **Figura 5** se comprueba que oxLDL no afecta los niveles basales de esta proteína autofágica. Se ha documentado la capacidad de oxLDL de modificar los niveles LC3-II en flujo autofágico normal y en flujo autofágico detenido en células VSMC y HT-29 (16,17). Adicionalmente se ha evidenciado que en células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC) oxLDL aumenta LC3-II y Beclin-1 (45).

Beclin-1 es una proteína que se ha relacionado con la auto-regulación de autofagia y apoptosis en células de mamíferos. A concentraciones fisiológicas de nutrientes, se inhibe la disociación de Bcl-2 y Beclin-1. Este complejo mantiene la autofagia inhibida. En condición de privación de nutrientes, Bcl-2 se fosforila y libera a Beclin-1, permitiendo su interacción con el complejo PI3K, activando el proceso autofágico. Se ha relacionado el aumento de los niveles de Beclin-1 con la activación del proceso autofágico (26,46)

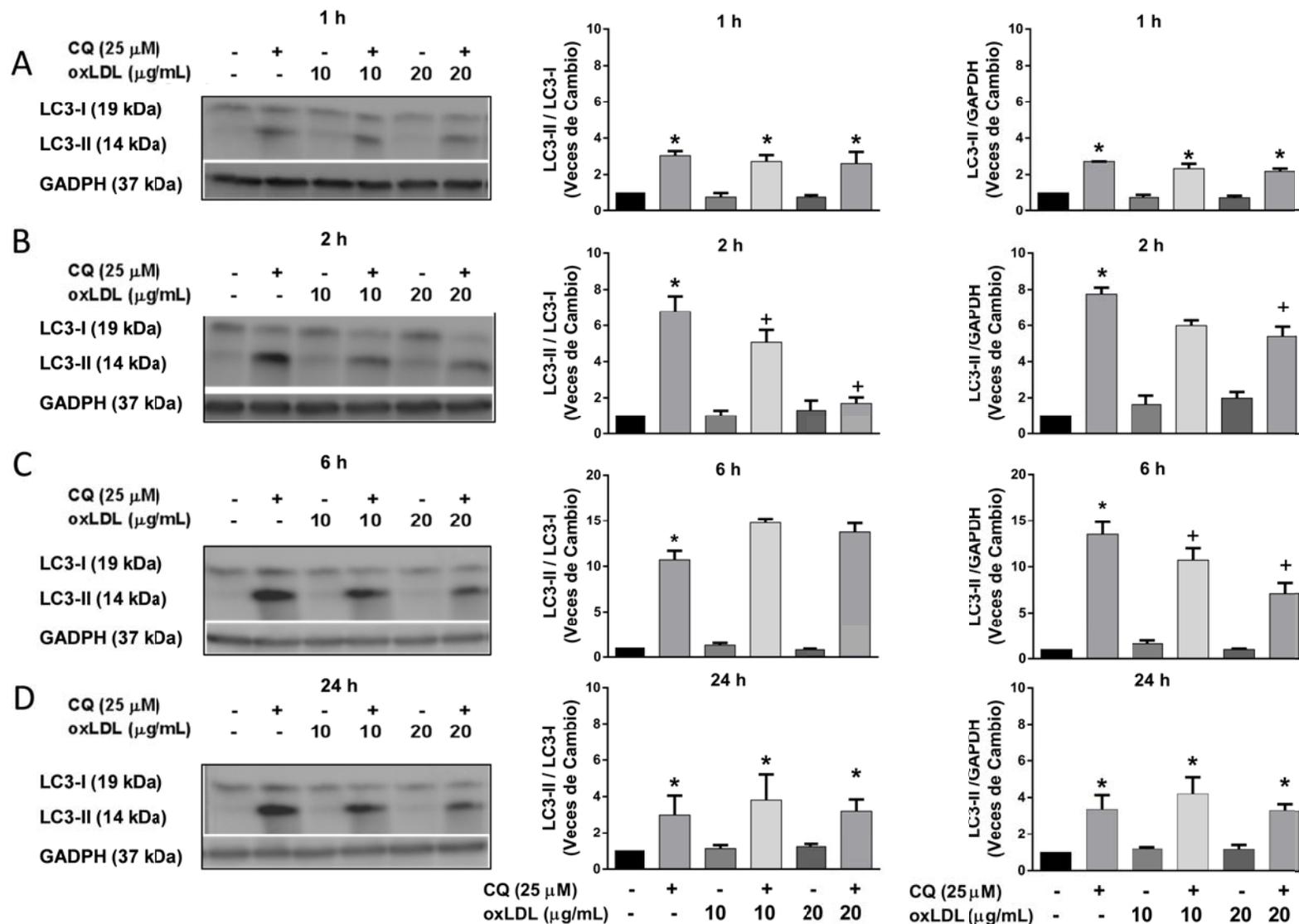


Figura 4. Efecto de oxLDL en flujo autofágico en niveles de LC3-II. Se trataron MFC con oxLDL a concentraciones de 10 y 20 μ g/mL y cloroquina (CQ) a 25 μ M por tiempos de 1 hr. (A), 2 hrs. (B), 6 hrs. (C) y 24 hrs. (D) y se midieron los niveles de las proteínas LC3-I y LC3-II mediante WB. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post-test de tukey (n=3). *: p < 0,05 respecto de control. +: p < 0,05 respecto de MFC tratados con cloroquina

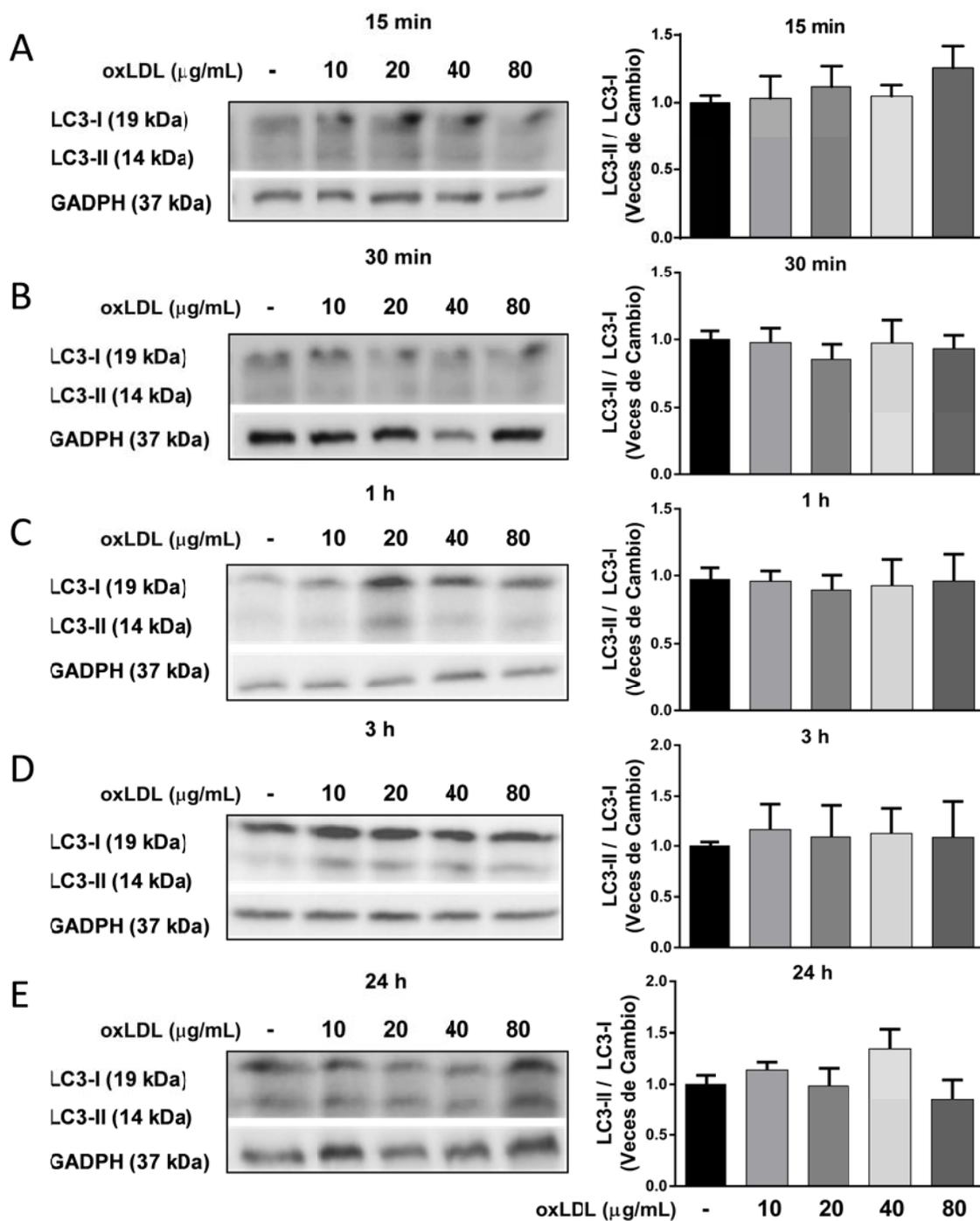


Figura 5. Efecto de LDL oxidado en los niveles de LC3-II. Se trataron MFC con oxLDL a (10, 20, 40 y 80 µg/mL) en tiempos de 15 (A) y 30 (B) min, y 1 (C), 3 (D) y 24 h (E). Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post-test de tukey (n=3). No hubo diferencias significativas respecto a control a ningún tiempo ni concentración.

Se realizó un estudio concentración/tiempo-dependiente, estimulando MFC con oxLDL en concentraciones de 10, 20, 30 y 40 µg/mL durante tiempos de 15 y 30 min, y 1, 3 y 24h. Posteriormente se realizó WB y se cuantificó Beclin-1.

Los datos expuestos en la **Figura 6 (A, B, C, D y E)** fueron insuficientes para realizar un análisis estadístico. El bajo número de réplicas experimentales (n) obtenidas a la fecha no fue suficiente para realizar un análisis estadístico sobre el efecto de oxLDL en los niveles de Beclin-1, por lo que se debe repetir el experimento con el fin de establecer con claridad el comportamiento de Beclin-1 frente al estímulo con oxLDL en este modelo celular.

En MFC de rata adulta, la unión de oxLDL a LOX-1 activa a la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX-2) e induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (19). Se ha evidenciado que la producción de ROS dependiente de NOX-2 tiene efectos regulatorios en la autofagia (47). La actividad de NOX-2 se puede medir mediante la activación de su subunidad regulatoria: la proteína p47, la cual al ser activada se fosforila.

En MFC de rata neonata se desconoce si oxLDL activa NOX-2 luego de ser reconocido por su receptor LOX-1. Debido a los efectos regulatorios que puede ejercer NOX-2 en autofagia es de interés averiguar si esta partícula oxidada ejerce un rol en la activación de NOX-2 y consecuentemente, sobre la producción de ROS en este modelo celular.

Para determinar la activación de NOX-2 se realizó un estudio concentración/tiempo-dependiente, estimulando MFC con oxLDL en concentraciones de 10, 20, 40 y 80 µg/mL durante tiempos de 15 y 30 min, y 1, 3 y 24h. Posteriormente se realizó WB y se cuantificó p47 total y p47 fosforilada.

Los resultados en la **Figura 7** no pudieron ser analizados estadísticamente debido al bajo número de "n" experimental. Sin embargo, se puede observar una leve tendencia al aumento en la fosforilación de p47 después de una hora de una manera concentración/dependiente (**Figura 7C**). Por lo tanto, es necesario aumentar la cantidad de "n" experimentales para estudiar con claridad si es que el tratamiento con oxLDL es capaz de activar la fosforilación de la enzima NOX-2. Asimismo, se requiere medir la producción de ROS para estudiar si la ruta oxLDL/LOX-1/NADPH oxidasa es completamente activa en este tipo celular.

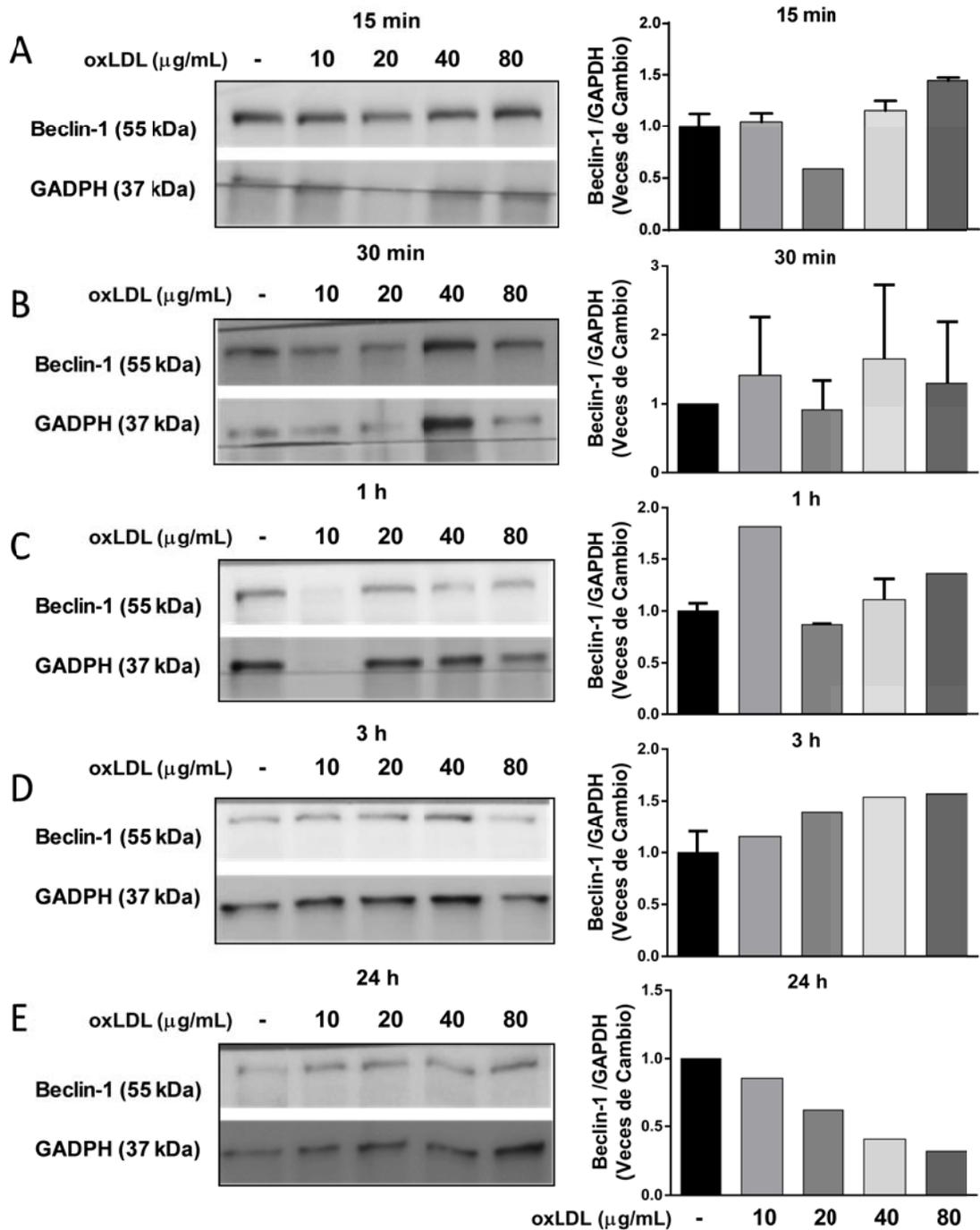


Figura 6. Efecto de LDL oxidado en los niveles de Beclin-1. Se trataron MFC con oxLDL a (10, 20, 40 y 80 μg/mL) por tiempos de 15 min (A), 30 min (B) y 60 min (C) (n=2), y además, 3 horas (D) y 24 horas (E) (n=1). Se midió Beclin-1 mediante WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. No se realizó análisis estadístico.

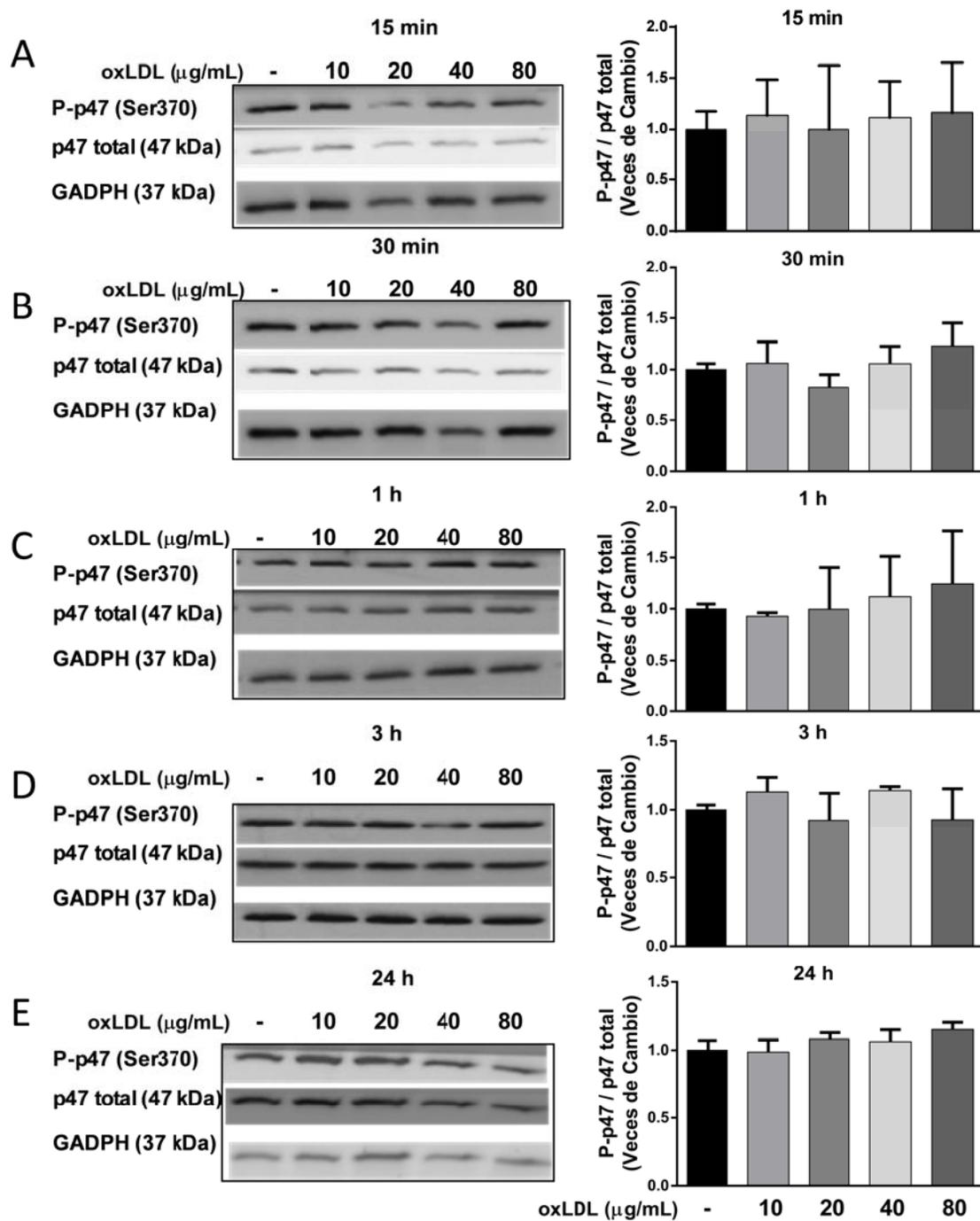


Figura 7. Efecto de oxLDL en la activación de LOX-1/NADPH Oxidasa. Se trataron MFC con oxLDL (10, 20, 40 y 80 µg/mL) por tiempos 15min (A), 30 min (B), 1 hora (C) 3 horas (D) y 24 horas (E) Se midió p47 total y p47 fosforilada (Ser 370) mediante WB. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. n = 2. No se realizó análisis estadístico

5.2 Evaluación del efecto de LDL oxidado y autofagia en sobrevida de miofibroblastos cardiacos.

Para evaluar la citotoxicidad de los diferentes estímulos realizados se estimularon MFC con cloroquina 25 μM (CQ), rapamicina 1 μM (Rapa) y oxLDL a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas. Posteriormente se realizó conteo de células por el método de exclusión de azul de Tripán.

Los resultados en la **Figura 8** indican que ningún compuesto afecta la viabilidad celular al no haber diferencias significativas de estos ante el control sin estimular. Este hallazgo sugiere que la activación de autofagia por 24 h por Rapamicina no resulta tóxica para este tipo celular, así como tampoco la inhibición de autofagia por cloroquina. Estos resultados en su conjunto sugieren que autofagia no tiene un efecto directo en la sobrevida de MFC, por lo que es necesario estudiar el efecto estos estímulos autofágicos en MFC sometidos a una condición de estrés, con el fin de determinar un posible rol protector de autofagia ante estímulos capaces de inducir muerte celular, por ejemplo (11, 27). Por otro lado, se observa que oxLDL por sí mismo no resultó ser tóxico para este tipo celular, en presencia y ausencia de rapamicina y cloroquina.

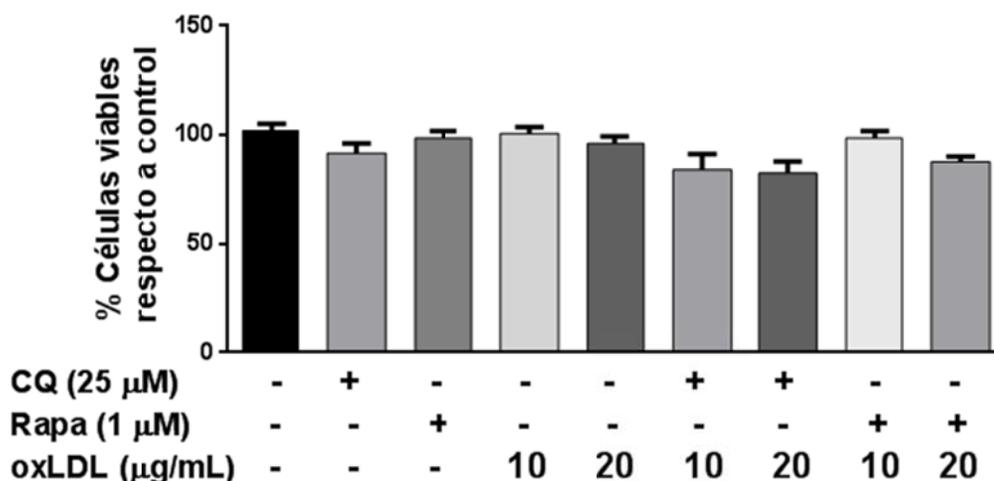


Figura 8. Efectos de LDL oxidado, cloroquina y rapamicina en viabilidad celular de miofibroblastos cardiacos. Se trataron MFC neonatos con nLDL, oxLDL a las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$, cloroquina 25 μM (CQ) y Rapamicina 1 μM (Rapa) durante 24 h; como control se usaron células sin tratamiento. Luego mediante azul de Tripán se contó la cantidad de células viables, y se relativizaron respecto a control. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post-test de Tukey ($n=3$). No hubo diferencias significativas en ningún estímulo respecto a control.

Se ha reportado un rol cardioprotector de la autofagia en falta de nutrientes y condiciones de estrés, aumentando la sobrevivencia celular (11,27). Esto se relaciona con el mecanismo auto-regulatorio de autofagia y apoptosis (15,46). Sin embargo, en la actualidad, no existen estudios que vinculen la autofagia con sobrevivencia celular de MFC.

En el proceso reparativo seguido de daño al miocardio, los MFC luego de generar la cicatriz de colágeno mueren por apoptosis. En fibrosis cardíaca, los MFC permanecen activos en el corazón, generando una sobreproducción y acumulación de proteínas de la MEC, como colágenos I y III, estas condiciones favorecen el desarrollo de insuficiencia cardíaca (9,22,24). En este trabajo se propuso que oxLDL al inducir autofagia promueve la sobrevivencia celular de MFC. Hasta el momento, nuestros resultados sugieren que oxLDL no induce autofagia. Sin embargo, no se puede descartar que oxLDL tenga un rol protector en MFC tratados con un estímulo de muerte. Por lo tanto, abordamos esta hipótesis mediante la realización de conteo celular en miofibroblastos tratados con peróxido de hidrógeno.

Se realizó una curva dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad por H_2O_2 , para seleccionar una concentración capaz de inducir muerte celular en nuestro estudio. Para ello se realizó conteo de células por azul de Tripán de MFC estimulados con concentraciones crecientes de H_2O_2 durante 24 h como se muestra en la **Figura 9**.

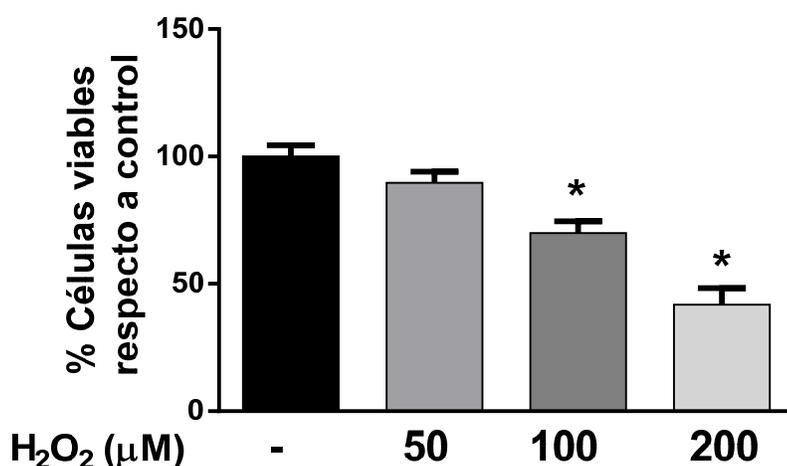


Figura 9. Efecto de H_2O_2 en viabilidad celular de miofibroblastos cardíacos. Se trataron los MFC a concentraciones de 50, 100 y 200 μM de H_2O_2 durante 24 h. Luego mediante azul de tripán se contaron las células vivas y se relativizó respecto al control. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post-test de Tukey (n=4). *: $p < 0,05$ respecto de control.

En la **Figura 9** se puede apreciar que la concentración óptima para estimular muerte celular en MFC es de 200 μM de H_2O_2 , por lo que fue la concentración utilizada en los siguientes experimentos para investigar efectos de oxLDL y autofagia en la sobrevivencia celular de MFC.

Está ampliamente documentado que la proteína mTOR al estar activa inhibe el proceso autofágico y que rapamicina es un inductor de la autofagia vía inhibición de mTOR (27,46). Para evaluar los efectos de autofagia en la sobrevivencia celular de MFC se indujo muerte celular por H_2O_2 a 200 μM y se estimuló con rapamicina 1 μM y cloroquina 25 μM como inductor e inhibidor de autofagia respectivamente. Posteriormente se realizó conteo de células por azul de Tripán.

Los resultados en la **Figura 10** indican que la autofagia inducida por rapamicina, contrario a lo propuesto, aumentó la muerte celular de MFC ante el estímulo de muerte de H_2O_2 a 200 μM . Además se observó que cloroquina y cloroquina con rapamicina también aumentan la muerte celular por H_2O_2 .

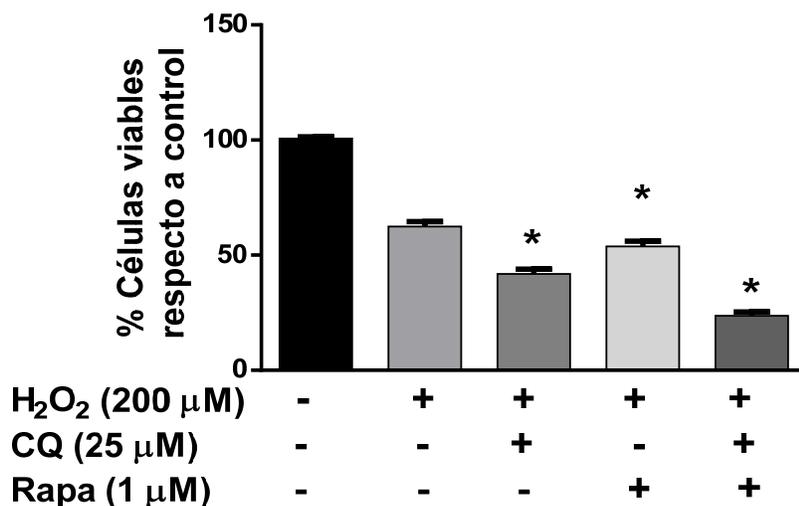


Figura 10. Efectos de autofagia en sobrevivencia celular de miofibroblastos cardíacos tratados con H_2O_2 . Se utilizó H_2O_2 200 μM como estímulo de muerte durante 24 h, al mismo tiempo se estimuló con cloroquina 25 μM y rapamicina 1 μM . Luego mediante azul de tripán se contaron las células vivas y se relativizó respecto al control. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post-test de Tukey (n=3). *: p < 0,05 respecto de control H_2O_2 .

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que oxLDL no induce autofagia en este modelo celular (**Figura 5**), no obstante es capaz de reducir la acumulación de LC3-II

inducida por cloroquina (**Figuras 4: B y C**). Por otro lado, observamos que la autofagia inducida por rapamicina promueve la muerte celular inducida por H₂O₂ (**Figura 10**).

Es por ello que además de analizar los efectos de oxLDL en sobrevida celular ante el estímulo de muerte de H₂O₂, se estudió su efecto en la sobrevida celular ante la muerte inducida por rapamicina y H₂O₂.

Para evaluar los efectos de oxLDL en la sobrevida celular de MFC se indujo muerte celular por H₂O₂ a 200 µM y se estimuló con oxLDL a 10 y 20 µg/mL, adicionalmente se estimuló con rapamicina 1 µM y H₂O₂ en presencia y ausencia de oxLDL 20 µg/mL. Todos los estímulos se realizaron por un tiempo de 24 h. Posteriormente se realizó conteo celular por azul de Tripán.

Resultados en la **Figura 11** indican que oxLDL no tiene efectos en la sobrevida celular, dado que no se observan diferencias entre MFC tratados con peróxido en presencia y ausencia de oxLDL. No obstante cuando se estimuló con H₂O₂, rapamicina y oxLDL, se observa una leve disminución en la viabilidad celular respecto de MFC estimulados con oxLDL y peróxido solamente. Este último resultado sugiere que oxLDL previene la muerte celular inducida por rapamicina en presencia del estresor H₂O₂. Para poder establecer con mayor claridad el rol de oxLDL y autofagia en la sobrevida del MFC, es necesario complementar los ensayos aquí realizados con otras técnicas, con el fin de estudiar con mayor profundidad los mecanismos de muerte celular involucrados frente a los estímulos aquí realizados.

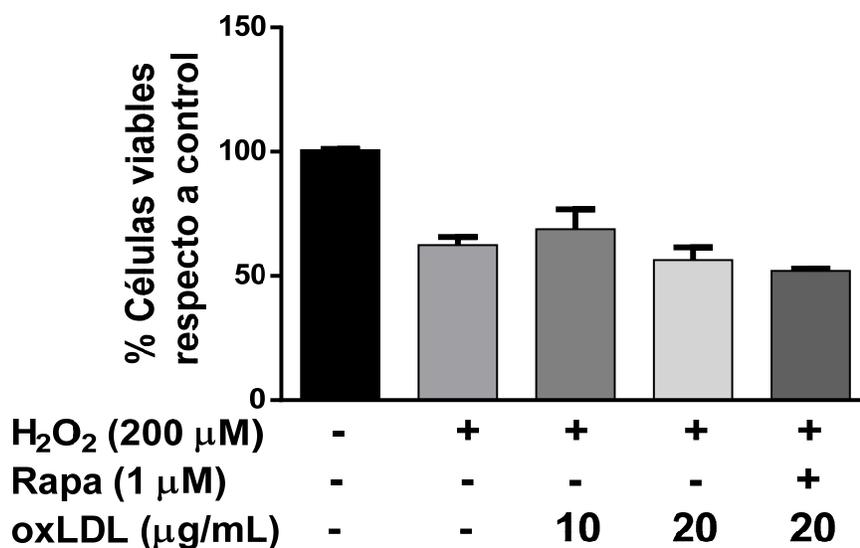


Figura 11. Efecto de LDL oxidado en sobrevida celular de miofibroblastos cardíacos tratados con H₂O₂. Se utilizó H₂O₂ 200 µM como estímulo de muerte durante 24 h, al mismo tiempo se estimuló con oxLDL a 10 y 20 µg/mL y rapamicina a 0,1 µM. Luego mediante azul de tripán se contaron las células vivas y se relativizó respecto al control. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post-test de Tukey (n=3). No hubo diferencias significativas respecto de control H₂O₂.

6. DISCUSION

En esta memoria de título se estudió el efecto de oxLDL en la activación de autofagia de MFC y su efecto en la sobrevivencia de MFC ante estímulos de muerte. Este estudio se basó en que los MFC tienen un rol fundamental en el desarrollo de fibrosis debido a su elevada capacidad de producción de MEC y persistencia en el miocardio luego de haber generado la cicatriz en el área dañada (6,8,23). Además se ha relacionado a la autofagia tanto con el desarrollo de la fibrosis (7) como con la sobrevivencia celular (11,13) y se evidenció una dependencia de MFC a LOX-1, el receptor de LDL oxidado, para producir colágeno ante estímulos fibróticos (14,41). Adicionalmente, se ha reportado que en células de cerebro de ratón la autofagia inducida por Ang-II es mediada por el receptor LOX-1 (18).

Los MFC son células que se encuentran presentes en condiciones patológicas y su prevalencia ha sido asociada al desarrollo de fibrosis en diferentes órganos (24,48). Entender los mecanismos mediante los cuales los MFC no mueren y permanecen activos es fundamental para entender el proceso fisiopatológico del desarrollo de la fibrosis y poder desarrollar alternativas terapéuticas, debido a que, según el órgano afectado, puede generar diferentes efectos nocivos. Por ejemplo, en el corazón, el desarrollo y mantenimiento de tejido fibrótico está asociado a una mayor incidencia de insuficiencia cardíaca (8), debido a que las grandes deposiciones de colágeno tipo I y III alteran la conductividad eléctrica y capacidad contráctil del miocardio (49).

Existe evidencia que demuestra que pacientes con ECV son propensos a desarrollar insuficiencia cardíaca. En diferentes ECV se han encontrado niveles elevados de oxLDL, como en cardiomiopatía diabética, hipertensión arterial y aterosclerosis (40). Como se ha identificado un rol de LOX-1 en el desarrollo de fibrosis cardíaca, y en la regulación de la autofagia ante ciertos estímulos, es necesario estudiar el efecto de la activación de este receptor por su ligando, oxLDL, en el MFC.

Estudios de nuestro laboratorio señalan que la activación de LOX-1 por oxLDL induce activación de NADPH oxidasas y generación de ROS (19). No hay estudios que lo demuestren lo mismo en ratas neonatas, ni tampoco se conocen los efectos de la activación LOX-1 por oxLDL en autofagia ni sobrevivencia celular.

Resultados de este trabajo indicaron que:

oxLDL no activa autofagia a concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los tiempos de 1, 2, 6 y 24 h (**Figura 4**) ni a concentraciones de 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los tiempos de 15 y 30 min, y 1, 3 y 24 h (**Figura 5**). Además se intentó medir la actividad autofágica por la proteína Beclin-1 (**Figura 6**), pero la cantidad de muestras fue insuficiente para realizar un análisis estadístico. No obstante, a los tiempos de 2 y 6 h, oxLDL disminuye la acumulación de LC3-II inducida por cloroquina de manera concentración dependiente (**Figura 4B y C**) lo que sugiere un posible mecanismo inhibitor de la autofagia.

En células VSMC se ha visto que oxLDL es capaz de inducir o inhibir la autofagia. A bajas concentraciones oxLDL induce autofagia, pero a altas concentraciones, la inhibe (16,50). En la línea celular monocítica THP-1, oxLDL disminuye la acumulación de LC3-II por cloroquina y se comprobó que este efecto se debía a una inhibición de la autofagia inducida por oxLDL (51). Para poder confirmar esta última hipótesis, habría sido de utilidad haber cuantificado los niveles de LC3 en presencia de oxLDL y Rapamicina, esperando que el tratamiento con oxLDL previniera la conversión de LC3-I a LC3-II inducida por Rapamicina.

En nuestro laboratorio se reportó que en MFC de ratas adultas estimulados con oxLDL, aumenta la producción de ROS inducida por NOX-2, de manera dependiente de LOX-1 (19). Existe evidencia que NOX-2 está implicada en la regulación de autofagia en células del sistema inmune (47). Para averiguar si la regulación de los niveles de LC3-II por oxLDL en flujo autofágico detenido por cloroquina está relacionada con la actividad de NOX-2, se midió la actividad de esta enzima mediante la cuantificación de la fosforilación de su subunidad regulatoria: la proteína p47 (a nivel del residuo de serina 370). Se realizaron estímulos con oxLDL a concentraciones de 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los tiempos de 15 y 30 min, y 1, 3 y 24 h (**Figura 6**). La cantidad de muestras fue insuficiente para realizar un análisis estadístico. Sin embargo se observa una tendencia al aumento en los niveles de p47 fosforilada al tiempo de 1 h en una forma concentración/dependiente por lo tanto, para obtener datos concluyentes, se debe aumentar el "n" experimental y analizar los resultados.

La posible regulación de la autofagia por oxLDL, podría estar relacionada a la actividad de la proteína autofágica Atg4. Atg4 es una proteasa encargada de procesar pro-LC3 en LC3-I, pero también puede desconjugar LC3-II en LC3-I (32,38,52). Su actividad se ha relacionado a los niveles de ROS en la célula, pues está regulada por

procesos de óxido-reducción (52,53). La activación de NOX-2 vía oxLDL/LOX-1 podría explicar los efectos que oxLDL induce en la autofagia. Sin embargo, no existen antecedentes que vinculen oxLDL y Atg4, pero la desregulación de la actividad de esta proteasa puede estar relacionada a la disminución de LC3-II en flujo autofágico detenido. Para corroborar esta acción es necesario realizar experimentos en los que se mida la actividad de Atg4 con oxLDL, en presencia y ausencia de rapamicina y cloroquina.

Los estímulos realizados con oxLDL a concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, cloroquina a 25 μM , y rapamicina a 1 μM no afectan la viabilidad celular de MFC (**Figura 8**). Para la evaluar de forma indirecta los efectos de oxLDL y autofagia en sobrevivencia celular se utilizó H_2O_2 a 200 μM debido a su capacidad de inducir muerte celular en MFC en un periodo de 24 h (**Figura 9**). Además, se ha descrito que ROS inducen muerte celular por apoptosis (54,55). Otras alternativas para inducir muerte celular por este mecanismo eran: estaurosporina (56), sobre-expresión de c-ski (57) o AsO_3 como inductor de ROS (54). Sin embargo, se utilizó peróxido de hidrógeno al existir amplia evidencia de su uso como inductor de muerte celular (54) y porque es un estímulo que se usa de forma rutinaria en nuestro laboratorio (19). Además, se sabe que ROS están directamente implicados con el daño cardíaco producido por eventos como isquemia-reperfusión (23,58).

Rapamicina y cloroquina disminuyen aún más la viabilidad celular inducida por H_2O_2 (**Figura 10**). Por otro lado, estímulos de oxLDL en MFC tratados con H_2O_2 no aumentaron la viabilidad celular (**Figura 11**). Sin embargo, en la **Figura 11** se observa que no hubo pérdida de viabilidad celular respecto al control de H_2O_2 en presencia de oxLDL 20 $\mu\text{g/mL}$ y rapamicina a 1 μM , a diferencia de lo observado en la **Figura 10** donde rapamicina 1 μM sí disminuye la sobrevivencia celular. Este último resultado sugiere que autofagia en este modelo celular no representa un mecanismo protector frente a muerte celular, dado que rapamicina no previno los efectos de H_2O_2 .

Se ha asociado autofagia a muerte celular programada tipo II (60,61). Sin embargo, en la **Figura 8** observamos que rapamicina a 1 μM por sí sola no afecta la viabilidad celular. No obstante, sería necesario observar una cinética concentración-tiempo dependiente para evaluar este potencial mecanismo de muerte celular en MFC.

El hecho de que el tratamiento de MFC con H_2O_2 y rapamicina disminuya la viabilidad celular y que el tratamiento con oxLDL, rapamicina y peróxido no sea distinto del control con H_2O_2 , indica un posible rol protector de oxLDL en MFC ante muerte celular inducida por autofagia. Se ha evidenciado en células de la granulosa que la vía

oxLDL/LOX-1 es capaz de modular la muerte celular por autofagia (62), teniendo oxLDL efectos en la modulación de la autofagia y de la sobrevivida celular. No obstante, no se obtuvo resultados suficientes para esclarecer un rol de la autofagia ni de oxLDL en la sobrevivida celular de MFC tratados con H₂O₂ como estímulo de muerte.

En este trabajo se observó que oxLDL es capaz de disminuir la acumulación de LC3-II (**Figura 4**), sugiriendo un rol inhibitorio de la autofagia, pero no hubo datos suficientes para relacionar esta actividad con NOX-2 y producción de ROS (**Figura 7**). Además, se encontró que rapamicina aumenta la pérdida de viabilidad celular de MFC tratados con H₂O₂ (**Figura 10**), a diferencia de oxLDL, que no afecta la viabilidad de estos MFC. No obstante, oxLDL al parecer revierte el aumento de muerte celular inducida por rapamicina en MFC tratados con H₂O₂ (**Figura 11**).

En resumen los resultados obtenidos en esta memoria indicaron que oxLDL inhibe autofagia, que autofagia aumenta muerte celular en condiciones de estrés oxidativo, y oxLDL revierte la muerte celular inducida por autofagia. En la **Figura 12** se propone una vía de regulación de la autofagia por oxLDL/LOX-1 vía NOX-2.

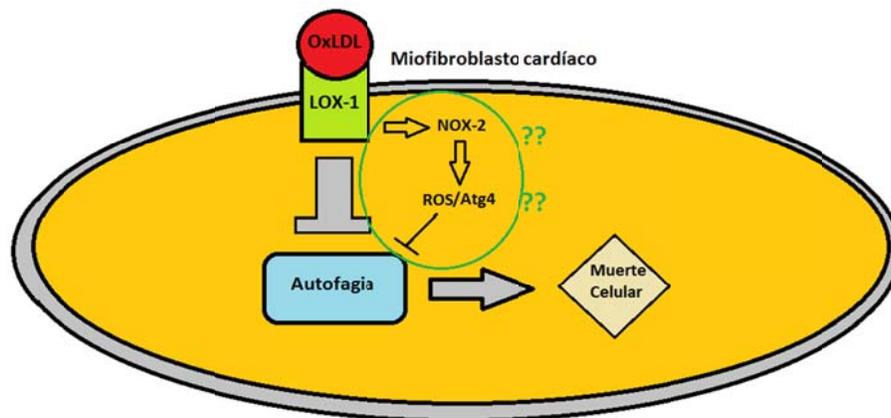


Figura 12. Efectos de LDL oxidado en autofagia y sobrevivida celular de miofibroblastos cardíacos. oxLDL puede regular la autofagia, y con ello aumentar la sobrevivida celular de CFM. No obstante el mecanismo por el cual realiza esta acción es aún desconocido. Se propone que la producción de ROS por NOX-2 juega un rol fundamental en esta disminución de la autofagia.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de memoria de título indican lo siguiente:

- oxLDL no induce autofagia en MFC de rata neonata.
- oxLDL disminuye acumulación de LC3-II inducida por cloroquina, lo que se relaciona a inhibición del proceso autofágico.
- La inducción de autofagia por rapamicina disminuye sobrevida celular en MFC ante el estímulo de muerte de H₂O₂ a 200 µM.
- oxLDL no altera la sobrevida celular de MFC tratados con H₂O₂ a 200 µM. Pero sí parece revertir el efecto de la rapamicina en la muerte celular en presencia de H₂O₂.
- Como conclusión general se puede indicar que oxLDL previene la disminución en la viabilidad celular inducida por rapamicina en MFC bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por H₂O₂.

Una posible proyección de este trabajo sería investigar la señalización río abajo de oxLDL/LOX-1, en el contexto del estudio de esta ruta en la progresión de procesos fisiopatológicos como fibrosis cardíaca, en la que se ha demostrado la importancia de LOX-1. Nuestros resultados muestran que autofagia no constituiría un elemento regulatorio importante para la señalización de oxLDL, por lo que es necesario investigar la función de elementos como NOX-2 o ROS. Por ejemplo, con el fin de ubicar nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de la condición de fibrosis cardíaca, proceso asociado a la mayoría de las ECV, y que en la práctica no es reversible y muy difícil de atenuar.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(7):e46-215.
2. Rafael Rondanelli RR. Estilo de vida y enfermedad cardiovascular en el hombre. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2014;69-77.
3. Trpkovic A, Resanovic I, Stanimirovic J, Radak D, Mousa SA, Cenic-Milosevic D, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(2):70-85.
4. Yang H, Mohamed ASS, Zhou S. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2012;11:85.
5. Satchell L, Leake DS. Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Iron at Lysosomal pH: Implications for Atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;51(18):3767-75.
6. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(4):945-53.
7. Ghavami S, Cunnington RH, Gupta S, Yeganeh B, Filomeno KL, Freed DH, et al. Autophagy is a regulator of TGF- β 1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts. *Cell Death Dis*. 2015;6(3):e1696.
8. Martínez Rosas Martín. Remodelación cardíaca e inflamación. *Arch. Cardiol. Méx*. 2006; 76(4): 58-66.
9. Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6:5.
10. Morales C, Rodriguez M, Gonzales GE, Matoso M, Bertolasi C, Gelpi RJ. Cronodinamia de infarto agudo al miocardio en conejo. *Medicina (Mex)*. 2001;61(6):830-6.
11. Yan L, Vatner DE, Kim S-J, Ge H, Masurekar M, Massover WH, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(39):13807-12.
12. Wohlgemuth SE, Julian D, Akin DE, Fried J, Toscano K, Leeuwenburgh C, et al. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. *Rejuvenation Res*. 2007;10(3):281-92.
13. Ahn J, Kim J. Nutritional Status and Cardiac Autophagy. *Diabetes Metab J*. 2013;37(1):30-5.
14. Hu C, Dandapat A, Sun L, Khan JA, Liu Y, Hermonat PL, et al. Regulation of TGF β 1-mediated collagen formation by LOX-1: studies based on forced overexpression of TGF β 1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10226-31.
15. Zhang Y, Xie Y, You S, Han Q, Cao Y, Zhang X, et al. Autophagy and Apoptosis in the Response of Human Vascular Endothelial Cells to Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Cardiology*. 2015;132(1):27-33.
16. Li J, Zhao L, Yang T, Zeng Y-J, Yang K. c-Ski inhibits autophagy of vascular smooth muscle cells induced by oxLDL and PDGF. *PloS One*. 2014;9(6):e98902.
17. Zahirnyk O, Liu W, Khalil S, Sharma A, Phang JM. Oxidized low-density lipoproteins upregulate proline oxidase to initiate ROS-dependent autophagy. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):446-54.
18. Ding Z, Liu S, Wang X, Khaidakov M, Fan Y, Deng X, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 regulates autophagy and Toll-like receptor 4 in the brain of hypertensive mice. *J Hypertens*. 2015;33(3):525-533; discussion 533.
19. Diaz H. Efecto de oxLDL y TNF- α en el fenotipo y expresión del receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada (LOX-1) en miofibroblastos cardíacos. Tesis presentada a Universidad de Chile; 2015.
20. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005;65(1):40-51.
21. Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial Fibroblast Myocyte Communication. *Circ Res*. 2010;106(1):47-57.
22. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:657-87.
23. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110(1):159-73.

24. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807–16.
25. Zhao W, Lu L, Chen SS, Sun Y. Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(2):605–11.
26. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402(6762):672–6.
27. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3–12.
28. Jannig PR, Moreira JBN, Bechara LRG, Bozi LHM, Bacurau AV, Monteiro AWA, et al. Autophagy Signaling in Skeletal Muscle of Infarcted Rats. *PLoS ONE.* 2014;9(1).
29. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 2001;20(21):5971–81.
30. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 2008;19(5):2092–100.
31. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep.* 2008;9(9):859–64.
32. Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell.* 2008;19(8):3290–8.
33. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* 1999;18(14):3888–96.
34. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(5):553–61.
35. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, et al. The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *J Biol Chem.* 2007;282(52):37298–302.
36. Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 20):4837–48.
37. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 2000;406(6798):902–6.
38. Yu Z-Q, Ni T, Hong B, Wang H-Y, Jiang F-J, Zou S, et al. Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy.* 2012;8(6):883–92.
39. Calmarza P. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. *Electron J Biomed.* 2008;3:52–60.
40. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Mol Biol Clifton Nj.* 2010;610:403–17.
41. Hu C, Dandapat A, Chen J, Fujita Y, Inoue N, Kawase Y, et al. LOX-1 deletion alters signals of myocardial remodeling immediately after ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2007;76(2):292–302.
42. Taye A, El-Sheikh AAK. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(7):740–5.
43. Wang X, Khaidakov M, Ding Z, Mitra S, Lu J, Dai Y, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and cardiac fibroblast growth. *Hypertension.* 2012;60(6):1437–42.
44. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. *Methods in Mammalian Autophagy Research.* Cell. 2010;140(3):313–26.
45. Ding Z, Liu S, Wang X, Khaidakov M, Dai Y, Mehta JL. Oxidant stress in mitochondrial DNA damage, autophagy and inflammation in atherosclerosis. *Sci Rep.* 2013;3.
46. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):571–80.
47. Huang J, Brumell JH. NADPH oxidases contribute to autophagy regulation. *Autophagy.* 2009;5(6):887–9.

48. Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, Yanagisawa H, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(1):L56–69.
49. Petrov VV, van Pelt JF, Vermeesch JR, Van Duppen VJ, Vekemans K, Fagard RH, et al. TGF-beta1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages. *Exp Cell Res*. 2008;314(7):1480–94.
50. Ding Z, Wang X, Schnackenberg L, Khaidakov M, Liu S, Singla S, et al. Regulation of autophagy and apoptosis in response to ox-LDL in vascular smooth muscle cells, and the modulatory effects of the microRNA hsa-let-7g. *Int J Cardiol*. 2013;168(2):1378–85.
51. Gu H-F, Li H-Z, Tang Y-L, Tang X-Q, Zheng X-L, Liao D-F. Nicotinate-Curcumin Impedes Foam Cell Formation from THP-1 Cells through Restoring Autophagy Flux. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154820.
52. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol*. 2000;151(2):263–76.
53. Pérez-Pérez ME, Zaffagnini M, Marchand CH, Crespo JL, Lemaire SD. The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy*. 2014;10(11):1953–64.
54. You BR, Park WH. Arsenic trioxide induces human pulmonary fibroblast cell death via increasing ROS levels and GSH depletion. *Oncol Rep*. 2012;28(2):749–57.
55. Huang SK, White ES, Wettlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, Thannickal VJ, et al. Prostaglandin E2 induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J*. 2009;23(12):4317–26.
56. Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*. 2001;20(26):3354–62.
57. Zeglinski MR, Davies JJL, Ghavami S, Rattan SG, Halayko AJ, Dixon IMC. Chronic expression of Ski induces apoptosis and represses autophagy in cardiac myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(6 Pt A):1261–8.
58. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Molecular Basis of Cardioprotective Effect of Antioxidant Vitamins in Myocardial Infarction. *BioMed Res Int*. 2013;437613.
59. Zhang Y, Xie Y, You S, Han Q, Cao Y, Zhang X, et al. Autophagy and Apoptosis in the Response of Human Vascular Endothelial Cells to Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Cardiology*. 2015;132(1):27–33.
60. Shen H-M, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*. 2011;7(5):457–65.
61. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):87–95.
62. Duerschmidt N, Zabirnyk O, Nowicki M, Ricken A, Hmeidani FA, Blumenauer V, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1-mediated autophagy in human granulosa cells as an alternative of programmed cell death. *Endocrinology*. 2006;147(8):3851–60.