

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EVALUACIÓN DEL RECEPTOR DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA
DENSIDAD OXIDADA, LOX-1, COMO NUEVO BLANCO TERAPÉUTICO
PARA FIBROSIS CARDÍACA**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctora
en Farmacología por:**

MÓNICA ANDREA VILLA CASTRO

Directores de tesis: Dra. Lorena Garcia y Dr. Andrew Quest

Santiago de Chile

Junio-2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

MÓNICA ANDREA VILLA CASTRO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Farmacología, en el examen público rendido el día

Directores de tesis:

Lorena Garcia Nannig

Andrew Quest

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Ramon Rodrigo (presidente)

Dr. Mario Chiong

Dr. Jaime Jalil

Dr. Luis Michea

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido fruto de un largo camino recorrido, en el cual me acompañaron muchísimas personas a las que me gustaría agradecer.

Primero que todo agradezco a mis tutores de tesis: La Dra Lorena Garcia y el Dr. Andrew Quest, que me han apoyado durante todos estos años y que me han sabido guiar en este proceso formativo. También les doy las gracias a los miembros de mi comisión, por la contribución que hicieron en cada uno de mis avances de tesis y que fueron fundamentales para concluir este trabajo de investigación.

Durante estos años de doctorado he tenido la suerte de pertenecer a un grupo de laboratorio que me apoyó incondicionalmente. Les agradezco profundamente a cada uno de mis compañeros, compañeras, docentes por brindarme su tiempo, conocimientos y consejos cuando los necesité. No puedo dejar de nombrar a la Sra Gindra y a Fidel, que me han ayudado y apoyado durante todo el desarrollo de esta tesis.

En este proceso, además de obtener un grado académico, también tuve la gran suerte de encontrar amigos y amigas que me llevaré para toda la vida y que hicieron estos años memorables. ¡Muchísimas gracias a Andrea, Camila, Constanza, Cesar, Evelyn, Ignacio, Mario, Marina, Pablo, Pancho, Sebastian y Valeria!

Finalmente le agradezco a mis papás por su apoyo incondicional durante estos años, por no juzgar mis decisiones y por alentarme día a día a terminar esta aventura. A mis hermanos Brunela, Victor y Carlos por siempre estar pendientes de mi y a mis amados sobrinos por sacarme una sonrisa aún en las épocas más complejas.

Esta tesis esta dedicada a mi querido tío Francisco Villa Lezana. Me hubiese encantado que estuvieras en este momento conmigo para compartir esta alegría, pero tal como tu decias “Los seres humanos hemos sido llamados a la existencia, no para sufrir de manera absurda, sino para ser felices” y yo hoy soy profundamente feliz.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	7
FINANCIAMIENTO:.....	10
PRODUCTIVIDAD Y DIFUSIÓN.....	10
I. RESUMEN.....	12
I. SUMMARY.....	14
II. ANTECEDENTES.....	16
II.1. Enfermedades cardiovasculares.....	16
<i>II.1.1 Epidemiología.....</i>	<i>16</i>
<i>II. 1.2 Tipos de ECVs y remodelado cardíaco.....</i>	<i>16</i>
II.2. Lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox).....	18
<i>II.2.1 Formación de LDLox.....</i>	<i>18</i>
<i>II. 2.2 LDLox y aterosclerosis:.....</i>	<i>19</i>
<i>II.2.3 Receptores scavenger y LDLox.....</i>	<i>19</i>
II.3. Receptor LOX-1.....	20
<i>II.3.1 Gen ORL-1 y estructura proteica de LOX-1.....</i>	<i>20</i>
<i>II.3.4 LOX-1 en enfermedades cardiovasculares.....</i>	<i>21</i>
II.4. Fibrosis cardíaca.....	22
<i>II.4.1 Nociones generales de la fibrosis.....</i>	<i>22</i>
<i>II.4.2 Fibrosis cardíaca.....</i>	<i>23</i>
<i>II.4.3 Blancos terapéuticos actuales en fibrosis cardíaca.....</i>	<i>24</i>
<i>II.4.4 LDLox y LOX-1 en fibrosis.....</i>	<i>25</i>
II.5. Caveolina-1 y fibrosis.....	26
<i>II.5.1 Generalidades de caveolina-1.....</i>	<i>26</i>
<i>II.5.3 CAV1 y su rol en fibrosis cardíaca.....</i>	<i>27</i>
<i>II.5.4 Relación de CAV1 y la vía LDLox/LOX-1.....</i>	<i>28</i>
II.6. El estado del arte indica que:.....	28
III. HIPÓTESIS.....	30
IV. OBJETIVOS.....	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
V. 1 Materiales.....	31

V.1.1 Animales.....	31
V.1.4 Insumos y reactivos.....	31
V.1.4.1 Trabajo con animales:	31
V.1.4.2 Cultivo celular:	31
V.1.4.3 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR a tiempo real:.....	32
V.1.4.5 Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección.	32
V.1.4.6 Inmunocitoquímica:	33
V.1.4.7 Ensayos de proliferación celular y geles de contracción:	33
V.1.4.8 Silenciamiento de la expresión de LOX-1, TGF- β 1 y CAV1:.....	33
V.2 Métodos.....	33
V.2.1. <i>Cultivo primario de FC y diferenciación a MFC.</i>	33
V.2.1.1 Cultivo de FC.....	33
V.2.2 <i>Preparación de partículas LDLox</i>	34
V.2.3. <i>Cinética de tratamiento de MFC con LDLox</i>	34
V.2.4. <i>Extracción y cuantificación de proteínas.</i>	34
V.2.5. <i>Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección.</i>	34
V.2.6. <i>Inmunocitofluorescencia</i>	35
V.2.7 <i>Ensayos de proliferación celular.</i>	35
V.2.7.1. <i>Conteo con azul del Tripán.</i>	35
V.2.7.2. <i>Ensayo de viabilidad con MTT.</i>	35
V.2.7.3. <i>Nivel de Ki67 por inmunocitoquímica</i>	35
V.2.8. <i>Ensayo de herida para ensayo de migración celular</i>	36
V.2.9. <i>Ensayo de geles de contracción de colágeno.</i>	36
V.2.10 <i>Ensayo de detección de colágeno soluble</i>	36
V.2.11 <i>Evaluación actividad MMP-2 y MMP-9.</i>	37
V.2.12. <i>Silenciamiento de LOX-1, CAV1 y FOXO-1</i>	37
V.2.13. <i>Ensayo de citotoxicidad en MFC</i>	37
V.2.14. <i>Inhibición del receptor LOX-1 con lovastatina y procianidina C1.</i>	37
V.2.15. <i>Inhibición de la vía canónica de LOX-1 con apocinina</i>	38
V.2.16. <i>Curva dosis respuesta de TGF-β1 en MFC</i>	38
V.2.17. <i>Análisis estadístico</i>	38
VI. RESULTADOS.....	39
VI.1 Determinar el efecto pro-fibrótico de LDLox en MFC de rata adulta.	39
VI.1.1 <i>Viabilidad de MFC tratados con LDLox.</i>	39

VI.1.2 Activación de NOX-2 en MFC tratados con LDLox.	39
VI.1.3 El tratamiento de MFC con LDLox aumenta los niveles de LOX-1.	40
VI.1.4 Evaluación de los niveles de marcadores pro-fibróticos en MFC.	41
VI.1.5 Evaluación de parámetros funcionales en MFC tratados con LDLox.	44
VI.1.5.1 Ensayo de migración por herida.	44
VI.1.5.2 Ensayo de contracción de geles de colágeno.	46
VI.1.5.3 Proliferación de MFC.	47
VI.1.5.4 Actividad de MMP-2 y MMP-9 en medios de cultivo de MFC tratados con LDLox.	47
VI. 1.5.5 Secreción de colágeno al medio extracelular.	47
VI.1.6 Morfología de los MFC tratados con LDLox.	50
VI.1.7 Niveles de COL-I, FN-EDA y LOX-1 en corazón de ratones sometidos por 5 meses en dieta alta en grasa.	52
VI. 2. Analizar si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente del receptor LOX-1	52
VI.2.1 Efecto del silenciamiento del receptor LOX-1 en la señal pro-fibrótica de LDLox.	52
VI.2.2 El efecto pro-fibrótico de la vía LDLox/LOX-1 es dependiente de la actividad de las NOXs.	54
VI.3 Determinar si el uso de inhibidores del receptor LOX-1 (lovastatina y procianidina C1) previene el efecto pro-fibrótico inducido por LDLox.	55
VI 3.1 Usó de inhibidores químicos del receptor LOX-1 y su efecto en la señal pro-fibrótica de LDLox.....	55
VI.3.1.1 Procianidinas C1.....	55
VI.3.1.1.a Toxicidad de MFC tratados por 24 h con procianidinas C1.	55
VI.3.1.1.b Efecto de la inhibición del receptor LOX-1 con procianidinas C1 en la señal pro-fibrótica de LDLox en MFC.	56
VI.3.1.2 Lovastatina.....	56
VI.3.1.2.a. Toxicidad de MFC tratados por 24 h con lovastatina.	57
VI.3.1.2.b. Efecto de la inhibición del receptor LOX-1 con lovastatina en la señal pro-fibrótica de LDLox en MFC.	57
VI.4. Evaluar si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente de los niveles de CAV1	59
VI.4.1 El tratamiento de MFC con LDLox induce el aumento de CAV1.....	59
VI.4.2 El silenciamiento de CAV1 previen el efecto pro-fibrótico de LDLox.....	60
VI.4.3 La regulación de CAV-1 por LDLox es dependiente del factor de transcripción FOXO-1	62
VII. DISCUSIÓN	63
VII.1 Efecto pro-fibrótico de la vía LDLox/LOX-1/NOX-2 en MFC	64
VII.1.1 LDLox aumenta los niveles de proteínas de MEC.	64

VII.1.1.1 La vía LDLox/LOX-1/NOX-2 induce el aumento de los niveles COL-I:.....	65
VII.1.1.2 LDLox induce el aumento de FN-EDA:	65
<i>VII.1.2 Cambio morfológico y funcional de MFC inducido por LDLox.....</i>	<i>66</i>
VII.1.2.1 Cambio morfológico de MFC inducido por LDLox.	66
VII.1.2.2 LDLox modifica los parámetros funcionales de MFC.....	67
<i>VII.1.3 ¿vía LDLox/LOX-1 un nuevo blanco terapéutico para fibrosis cardíaca?.....</i>	<i>69</i>
VII.1.3.1 LDLox induce el aumento del receptor LOX-1 en MFC de rata adulta.....	69
VII.1.3.2 La intervención molecular y farmacológica del receptor LOX-1 previene del efecto pro-fibrótico de LDLox.	69
VII.1.3.3 Prueba de concepto: Ratones obesos (eventualmente con altos niveles de LDLox) deberían aumentar los niveles de LOX-1 y marcadores de fibrosis en tejido cardíaco.	71
VII.2 Efecto pro-fibrótico de LDLox/LOX-1 es dependiente de proteína CAV1	71
<i>VII.2.1 LDLox aumenta los niveles de CAV-1 en MFC.....</i>	<i>71</i>
<i>VII.2.2 CAV1 regula la proliferación de MFC inducida por LDLox.....</i>	<i>72</i>
<i>VII.2.3 FOXO-1 regula CAV11 en MFC.....</i>	<i>72</i>
VIII. CONCLUSIONES.....	74
IX. ANEXOS	75
X. REFERENCIAS.	76

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Remodelado cardíaco	17
Figura 2. Modificación oxidativa de la partícula de LDL	18
Figura 3. Estructura del receptor LOX-1	20
Figura 4. Vías de señalización activadas por los distintos ligandos de LOX-1	23
Figura 5. Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos cardíacos	24
Figura 6. Estructura de la proteína caveolina-1	26
Figura 7. Modelo pro-fibrótico de LDLox en MFC de rata adulta	29
Figura 8. Viabilidad de MFC tratados por 96 h con LDLox	39
Figura 9. Cinética de activación de NOX-2 (p47Fosf/p47total) en MFC tratados con LDLox.....	40
Figura 10. El tratamiento con LDLox aumenta los niveles de LOX-1 en MFC.....	41
Figura 11. El tratamiento con LDLox no tiene efecto en los niveles de α -SMA	42
Figura 12. MFC estimulados con LDLox aumentan los niveles de COL1 hasta las 72 h post-tratamiento	43
Figura 13. Los niveles de FN-EDA aumentan en MFC a las 72 y 96 h posterior al tratamiento con LDLox	44
Figura 14. MFC tratados con LDLox disminuyen su capacidad de migración	45
Figura 15. El tratamiento con LDLox disminuye la capacidad contráctil de MFC de rata adulta	46
Figura 16. Inducción de la proliferación de MFC tratados con LDLox	48
Figura 17. Actividad de la MMP-2 pro, MMP-2 activa y MMP-9 pro en los medios de cultivo de MFC de rata adulta tratados a distintos tiempos con LDLox	49
Figura 18. Aumento de la secreción de colágeno en MFC de rata adulta tratados con LDLox por 24 y 72 h	50
Figura 19. El tratamiento de MFC con LDLox induce cambios en la morfología de MFC.....	51
Figura 20. Aumento de los niveles de COL-I, FN-EDA y LOX-1 en corazones de ratones alimentados con dieta alta en grasa	52
Figura 21. Dependencia de LOX-1 en la señal pro-fibrótica de LDLox en MFC de rata adulta.....	53
Figura 22. Apocinina inhibe el efecto pro-fibrótico de LDLox en MFC.....	55
Figura 23. Citotoxicidad de MFC tratados con procianidinas C1 por 24 h.....	56
Figura 24. Efecto del pre-tratamiento de MFC con procianidinas C1 en la señal pro-fibrótica del LDLox sobre los niveles de COL-I, α -SMA y contractilidad celular.....	56
Figura 25. Citotoxicidad de MFC tratados con lovastatina por 24 h	57
Figura 26. Efecto del pre-tratamiento de MFC con lovastatina en la señal pro-fibrótica del LDLox sobre los niveles de COL-I, α -SMA y contractilidad	58
Figura 27. Niveles de CAV1 en MFC tratados a distintos tiempos con LDLox.....	59

Figura 28. El silenciamiento de CAV1 inhibe la señal pro-fibrótica de la vía LDLox/LOX-1 en MFC de rata adulta.....	60
Figura 29. El silenciamiento de CAV1 previene la proliferación inducida por LDLox.....	61
Figura 30. EL silenciamiento de FOXO-1 previene el aumento de CAV1 inducido por LDLox en MFC.....	62
Figura 31. Modelo del mecanismo pro-fibrótico de la vía LDLox/LOX-1 en MFC.....	74
Figura suplementaria 1. Niveles de α-SMA y FN-EDA en MFC tratados con distintas concentraciones de TGF-β1 por 24 h.....	75

ABREVIATURAS.

α -SMA: Alpha-smooth muscle actin (Alfa-actina de musculo liso)
AGEs: *Advanced glycation end products* (Productos finales de glicación avanzada).
ALK: *Anaplastic lymphoma kinase receptor* (Receptor quinasa de linfoma anaplásico).
Ang-II: Angiotensina II.
ANOVA: *Analysis of variance* (Análisis de varianza).
APO: Apocinina.
AT₁R: *Angiotensin II receptor type 1*. Receptor de angiotensina II tipo 1.
BCA: *Bicinchoninic acid assay* (Ensayo del ácido bicinconínico).
BSA: *Bovine serum albumin* (Albúmina sérica de bovino).
CAV1: Caveolina-1.
CAV2: Caveolina-2
CE: Celulas endoteliales
SMC: *Smooth muscle cells* (clulas de la musculatura lisa)
CAV3: Caveolina-3
CLA-1: *Lysosomal integral membrane protein-II analogous-1* (Proteína II integral de membrana lisosomal análoga 1).
COL-I: Colágeno tipo-I.
COL-III: Colágeno tipo-III
COL-IV: Colágeno tipo-IV
CRP: *C reactive protein* (Proteína C reactiva).
CTGF: *Connective tissue growth factor* (Factor de crecimiento de tejido conectivo).
dSR-C1: *Drosophila scavenger receptor-C1* (Receptor scavenger de drososofila C1).
ECVs: Enfermedades cardiovasculares.
ET-1: Endotelina-1
FC: Fibroblastos cardíacos.
FN-EDA: *Fibronectin extradomain A* (Fibronectina-extradominio A).
FOXO: *The forkhead box O transcription factor*.
HCD: *High cholesterol diet* (Dieta alta en colesterol)
HDL: *High density lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidad).
HFD: High fat diet (Dieta alta en grasa)
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
IC: Insuficiencia cardíaca.
IC₅₀: *The half maximal inhibitory concentration* (La mitad de la concentración inhibitoria máxima)
ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule-1* (Proteína de adhesión intercelular-1).
IDL: *Intermediate density lipoprotein* (Lipoproteína de mediana densidad oxidada).
IL-1: Interleuquina-1.
KO: *Knockout*.
LDL: *Low density lipoprotein* (Lipoproteína de baja densidad).
LDLox: *Oxidized low density lipoprotein* (Lipoproteína de baja densidad oxidada).
LOX-1: *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1* (Receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada tipo lectina).

LPS: Lipopolisacárido.

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína quinasa activada por mitógeno).

MEC: Matriz extracelular.

MFC: Miofibroblastos cardíacos.

MFC-siCAV1: Miofibroblastos cardíacos con CAV1 silenciado.

MFC-siFOXO-1: Miofibroblastos cardíacos con FOXO-1 silenciado.

MFC-siLOX-1: Miofibroblastos cardíacos con el receptor LOX-1 silenciado.

MMPs: *Matrix metalloproteinases* (Metaloproteinasas de matriz extracelular).

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

NF- κ B: Nuclear factor kappa B (Factor nuclear kappa B).

NOS: *Nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintasa).

NOX-2: *-oxidase 2* (NADPH oxidasa tipo 2).

OMS: Organización mundial de la salud.

ORL-1: *Oxidized low density lipoprotein receptor 1 gene* (Gen del receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidada).

PBS: *Phosphate-buffered saline* (Tampón fosfato salino).

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

PCSK9: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Proteína subtilisina convertasa/ Kexina tipo-9).

PDGF: Platelet-derived growth factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas).

PFA: Paraformaldehído.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.

PKC: Proteína quinasa C.

PRO: Procianidinas.

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction (Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa).

Rcf: Relative centrifugal force (Fuerza centrífuga relativa)

Rho-ROCK: Rho-associated kinase (Quinasa asociado a Rho).

ROS: *Reactive oxygen species* (Especies reactivas del oxígeno).

SFB: Suero fetal bovino.

siRNA: *Small interfering RNA* (RNA pequeño de interferencia).

Smad: *Transcription factors similar mothers against decapentaplegic*.

SR-AI/II: *The macrophage scavenger receptor type AI/AII* (Receptor scavenger de macrófagos tipo AI y AII).

SREC: *Scavenger receptor expressed by endothelial cells I* (Receptor scavenger-I expresado en células endoteliales).

SR-G: *Scavenger receptor type G* (Receptor scavenger tipo G).

SRs: *Scavenger receptors* (Receptores scavenger).

TBS-T: *Tris-buffered saline with Tween-20* (Tampón Tris-salino con Tween 20).

TGR: *Transforming growth factor β receptor* (Receptor 2 del factor de crecimiento transformante β).

TGFRI: *Transforming growth factor β receptor 1* (Receptor 1 del factor de crecimiento transformante β).

TGFRII: *Transforming growth factor β receptor 2* (Receptor 2 del factor de crecimiento transformante β).

TGF- β 1: *Transforming growth factor β 1* (Factor de crecimiento transformante β 1).

TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinase* (Inhibidor tisular de metaloproteinasas).

TNF- α : Tumor necrosis factor- α (Factor de necrosis tumoral- α).

VCAM-1: *Vascular cell adhesion molecule-1* (Proteína de adhesión celular vascular-1).

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de crecimiento endotelial vascular)

VIP21: *Vesicular integral-membrane protein 21*.

VLDL: *Very low density lipoprotein* (Lipoproteína de muy baja densidad).

FINANCIAMIENTO:

Proyecto FONDECYT 1140713 (LG)
Beca CONICYT Doctorado 21140144 (MV)
Proyecto FONDAP 15130011 (LG, AQ)

PRODUCTIVIDAD Y DIFUSIÓN.

Publicaciones:

- **Villa M**, Cerda-Opazo P, Jiménez-Gallegos D, Garrido-Moreno V, Chiong M, Quest AF, Toledo J, García L. Pro-fibrotic effect of oxidized LDL in cardiac myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 9;524(3):696-701, 2020.
- Silva VDA, Cuevas C, Muñoz P, **Villa M**, Ahumada-Castro U, Huenchuguala S, Santos CCD, Araujo FM, Ferreira RS, Silva VBD, Silva JHCE, Soares ÉN, Velozo ES, Segura-Aguilar J, Costa SL. Autophagy protects against neural cell death induced by piperidine alkaloids present in *Prosopis juliflora* (Mesquite). *An Acad Bras Cienc.*;89(1):247-261. 2017.
- Ramírez-Sagredo A, Aleman L, **Villa M**, Chávez M, García L, Lavandero S. Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. *Revisión ciencias básicas. Revista Chilena de Cardiología.* Vol. 35 (3), 2016.
- Glutathione transferase-M2-2 secreted from glioblastoma cell protects SH-SY5Y cells from aminochrome neurotoxicity. Cuevas C1, Huenchuguala S, Muñoz P, **Villa M**, Paris I, Mannervik B, Segura-Aguilar J. 27(3):217-28. *Neurotox Res.* 2015.
- Huenchuguala S, Muñoz P, Zavala P, **Villa M**, Cuevas C, Ahumada U, Graumann R, Nore BF, Couve E, Mannervik B, Paris I, Segura-Aguilar J. Glutathione transferase mu-2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. *Autophagy.* (4):618-30. 2014.

Congresos:

- **Villa M**, Jiménez D, Bruneau N, Quest AFG, García L. La respuesta pro-fibrótica de la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox) es dependiente de caveolina-1 en miofibroblastos cardiacos. XXXIII Reunión Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas / International Society for Heart Research (ISHR). Huilo-Huilo, Chile, 2018.
- **Villa, M.**, Parra, E., Díaz, G., Quest, A. García N, L. Profibrotic response of the pathway LDLox/LOX-1 in cardiac myofibroblast. XXXIX reunión de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Varas, Chile. Septiembre, 2017.

- **Villa M**, Díaz H, Díaz G, Quest A, García L LOX-1. Receptor is essential in differentiation and preservation of pro-fibrotic phenotype of cardiac myofibroblasts". (Poster). XXXIX reunión de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Varas, Chile, Septiembre, 2016.
- **Villa M**, Díaz H, Leiva S, Figueroa D, Camus V, Inostroza E, Parra E, Ceballos G, García L. El receptor LOX-1 es esencial en el proceso de diferenciación y mantención del fenotipo pro-fibrótico de miofibroblastos cardíacos. Nominado a mejor presentación de ciencias básicas (Presentación oral). XXV Congreso interamericano de cardiología y cirugía cardiovascular. Santiago, Chile, Diciembre 2015.
- Díaz H, Reyes J, **Villa M**, Toledo J, García L. Role of TNF- α and LDLox/LOX-1 pathway on cardiac myofibroblast phenotype, XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Puerto Varas, Septiembre, 2015.

Actividades docentes

a) Ayudantías en asignaturas de Pregrado (Facultad de Ciencias Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile)

- Formulación de Proyectos, carrera de Bioquímica, primer semestre 2016
- Química fisiológica o patológica integrada 1, carreras de Bioquímica y Química y Farmacia, 1° semestre 2016

b) Clases de pregrado (Universidad Central)

- Integrado de ciencias de la salud I (Fisiología), para enfermería 2017-2019
- Integrado de ciencias de la salud II (Fisiopatología), para enfermería 2017-2019

Asistencia a cursos:

- 4ta South American Workshop of new trends in advance fluorescence microscopy techniques, Concepción, Chile, 2016.
- Workshop de estadística aplicada, Instituto de Neurociencias Biomédicas, Santiago. Chile 2017.

Difusión científica:

- Adjudicación y desarrollo del proyecto de estudiantes de postgrado de la Universidad de Chile: "Jornadas de Iniciación científica para estudiantes de colegios de la comuna de independencia". Financiado por la Universidad de Chile y patrocinado por ACCDiS, 2016
- Coordinación Ejecutiva del Proyecto Explora RM Norte del Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación. Ejecutado por la Universidad de Chile-ACCDiS. 2019-2022.

I. RESUMEN

Posterior a un infarto cardíaco, aparecen y se perpetúan en el corazón miofibroblastos (MFC). Estas células tienen función contráctil y secretora de matriz extracelular (MEC). La acumulación de MEC en el tejido cardíaco se denomina fibrosis y su continuidad crónica puede llegar a producir arritmias e insuficiencia cardíaca (IC), entre otras patologías. A la fecha no existe tratamiento para prevenir o atenuar este proceso cuando se torna patológico, por lo que es relevante la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos.

Antecedentes demuestran que la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox) se asocia al desarrollo de fibrosis renal y hepática, pero no ha sido implicada en la fibrosis cardíaca, aunque si ha sido demostrada su acumulación en los ventrículos de personas con enfermedades coronarias. En modelos in vitro se ha observado que el tratamiento de distintos tipos celulares con las LDL oxidadas estimula tanto la proliferación como la secreción de COL-1. Además, en corazones de ratones knockout para LOX-1, el principal receptor de estas partículas, que fueron sometidos a isquemia/reperfusión (I/R) se observó baja acumulación de colágeno en comparación a lo observado en ratones wild type. Más aún, en nuestro laboratorio se determinó que el nivel de LOX-1 es mayor en MFC que en FC de rata adulta y que dichos niveles aumentan durante el proceso de diferenciación in vitro. Existen varios inhibidores descritos para el Receptor LOX-1, pero sólo están disponibles comercialmente: las procianidinas (tipo B y C) y las estatinas. Ambas podrían ser usadas para inhibir la vía LDLox/LOX-1 en MFC.

Una vez que LDLox se une a su receptor LOX-1, este es internalizado vía caveolas y activa a la enzima NOX-2 con la consecuente producción de ROS. La principal proteína de las caveolas, caveolina-1 (CAV1), es regulada positivamente por LDLox y se ha descrito como una proteína relevante en fibrosis cardíaca. Sin embargo, no se ha descrito su regulación vía LDLox/LOX-1 en MFC.

En razón a los antecedentes presentados, la hipótesis de esta tesis fue: ***“Determinar si la vía LDLox/LOX-1 aumenta la señal fibrótica en MFC de manera dependiente de CAV1 y evaluar si el uso de inhibidores del receptor LOX-1 disminuye el efecto pro-fibrótico del LDLox in vitro”***. Para desarrollarla se plantearon los siguientes objetivos específicos: (1) Establecer el efecto pro-fibrótico de LDLox; (2) Analizar si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente del receptor LOX-1; (3) Determinar si el uso de inhibidores del receptor LOX-1 (lovastatina y procianidina C1) previenen el efecto pro-fibrótico inducido por LDLox; (4) Evaluar si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente de los niveles de CAV1.

Los resultados de esta tesis evidenciaron que la LDLox activa la vía canónica del receptor (NOXs) a los 60 min y que el tratamiento con LDLox indujo aumento significativo del nivel del receptor LOX-1 (24 y 48 h). Los tratamientos a tiempos largos aumentaron significativamente los niveles de COL-1 (24-72 h), FN-EDA (72-96 h) y de la proteína CAV1 (24-48 h). La morfología los MFC tratados con LDLox (24-72 h) evidenció disminución significativa del área celular, y las fibras de α -SMA en estas células se visualizaron menos ordenadas que las de las células sin tratamiento. Funcionalmente, los MFC estimulados con la LDLox fueron menos contráctiles con aumento significativo de la secreción de colágeno y aumento de actividad de la proMMP-9 comparado con los MFC sin tratar. A su vez, la LDLox

produjo aumento significativo en la proliferación. En conjunto estos resultados demuestran por primera que la LDLox sería central en el desarrollo de fibrosis cardíaca.

Por otra parte, se encontró que los MFC-siLOX-1 tratados con LDLox no aumentaron los niveles de COL-1 y LOX-1 como había sido previamente descrito y presentaron una contractilidad similar a las células controles. A su vez, el tratamiento con apocinina previno el aumento de COL-1 en MFC tratados con LDLox por 24 h, lo que reafirmó que la vía LDLox/LOX-1/NOXs es pro-fibrótica en MFC de rata adulta. El pre-tratamiento de MFC con lovastatina y procianidinas antes del estímulo con LDLox mostró un efecto similar al observado al silenciar LOX-1. Estos resultados confirman a LOX-1 como un blanco terapéutico en fibrosis cardíaca y los dos fármacos podrían ser aplicables en individuos con ECVs para prevenir el desarrollo de patologías como la IC y arritmias que cursan con fibrosis, proceso que es clave en ambas alteraciones.

Finalmente se demostró que LDLox aumenta significativamente el nivel de CAV-1 a las 24 y 48 hrs postratamiento con LDLox. Los MFC-siCAV1 tratados con LDLox por 24 h no aumentaron los niveles de LOX-1, COL-1 a las 24 h. similar a lo observado al silenciar el receptor LOX-1. El aumento de los niveles de CAV-1 basales e inducidos por LDLox se demostró fueron dependientes del factor transcripcional FOXO-1 en MFC. En conclusión, la vía LDLox/LOX-1 es pro-fibrótica en MFC de rata adulta y este efecto es dependiente de CAV1. Los MFC tratados con LDLox aumentan su capacidad de proliferación, son menos contráctiles y más secretores lo que explicaría un posible mecanismo por el que estas células se perpetuarían en el corazón.

Finalmente se demostró que LDLox aumenta significativamente el nivel de CAV-1 a las 24 y 48 hrs postratamiento con LDLox. Los MFC-siCAV1 tratados con LDLox por 24 h no aumentaron los niveles de LOX-1, COL-1 a las 24 h. similar a lo observado al silenciar el receptor LOX-1. El aumento de los niveles de CAV-1 basales e inducidos por LDLox es dependiente de factor transcripcional FOXO-1 en MFC

En conclusión, la vía LDLox/LOX-1 es pro-fibrótica en MFC de rata adulta y este efecto es dependiente de CAV1. Los MFC tratados con LDLox aumentan su capacidad de proliferación, son menos contráctiles y más secretores lo que explicaría un posible mecanismo por el que estas células se perpetuarían en el corazón.

I. SUMMARY

After myocardial infarction, myofibroblasts appear and perpetuate in the heart. These cells are contractile and significant producers of extracellular matrix. However extracellular matrix accumulation in injured cardiac tissue (fibrosis) can lead to arrhythmias and heart failure. To date, there is no treatment to prevent or mitigate pathological cardiac fibrosis and to find novel therapeutic targets is a key point in the cardiovascular research.

Although low-density oxidized lipoprotein has been associated with the development of renal and hepatic fibrosis, its role in cardiac fibrosis is less clear. However some lines of evidence have depicted that the treatment of different cell types with low-density oxidized lipoprotein stimulates both their proliferation and collagen 1 secretion. Also our group showed that the main receptor of low-density oxidized lipoprotein LOX-1 protein levels are much higher in cardiac myofibroblasts than in adult rat cardiac fibroblasts, suggesting that their levels increased during cell differentiation. In addition, cardio-specific knockout mice for LOX-1 subjected to ischemia/reperfusion (I/R) accumulates less collagen accumulation in comparison with wild type mice. Once oxLDL binds to LOX-1, this receptor is internalized via *caveole* in order to activate the NADPH oxidase 2 (NOX-2) and generate reactive oxygen species. The main *caveole* protein caveolin-1 is positively regulated by oxLDL and also plays a relevant role in the development of cardiac fibrosis. However, the regulation of caveolin-1 by oxLDL/LOX-1 has not been investigated in cardiac myofibroblasts.

The present work aims to study whether the oxLDL/LOX-1 pathway increases fibrogenesis in cardiac myofibroblasts in a caveolin-1-dependent manner. To test this hypothesis, the specific objectives were set up: 1) To investigate *in vitro* if oxLDL stimulates fibrogenesis in cardiac myofibroblasts; 2) To determine the role of LOX-1 on the pro-fibrotic effect of oxLDL in cardiac myofibroblasts; 3) To assess the effect of LOX-1 receptor inhibitors lovastatin and procyanidin C1 prevents oxLDL-dependent pro-fibrotic effect; 4) To evaluate whether the pro-fibrotic effect of oxLDL is dependent on CAV1 levels in cultured cardiac myofibroblasts.

The results showed that oxLDL activates the canonical receptor pathway in cultured cardiac myofibroblasts, including NADPH oxidase activation and increases in LOX-1 protein level. Long-term treatment of cultured cardiac myofibroblasts with oxLDL enhances protein levels of collagen-I, fibronectin-EDA and caveolin-1. Also oxLDL stimulates the presence of dedifferentiated cardiac fibroblasts characterized by a decrease in cell area and disordered fibers containing α -smooth muscle actin. OxLDL stimulates metalloprotease-9 activity, collagen secretion and cell proliferation. Moreover, cardiac myofibroblasts knockdown for LOX-1 and treated with oxLDL did not increase the protein levels of collagen-1 and LOX-1 and exhibited a contractile phenotype similar to the controls. Interestingly, apocinin treatment prevented the ox-LDL-dependent increase of collagen-1 protein levels. Pre-treatment of these cells with lovastatin and procyanidins prior to exposure to oxLDL showed a similar effect to that seen to cardiac myofibroblasts knockdown for LOX-1. OxLDL significantly increases the level of caveolin-1 protein after 24 and 48 h in cultured cardiac myofibroblasts. The treatment of these cells with siRNAs for caveolin-1 or for LOX-1 and further exposure to oxLDL prevent increases in LOX-1 and collagen-1 protein levels. The oxLDL-dependent increase of basal levels of caveolin-1 seems to be driven by the FoxO-1 transcription factor.

In summary, the activation of oxLDL/LOX-1 pathway stimulates fibrogenesis in adult rat cardiac myofibroblasts, being this effect dependent of caveolin-1. OxLDL also increases proliferation and the development of a less contractile and more secretive phenotype. In aggregate these effects of oxLDL on cardiac myofibroblasts could explain their perpetuation in the injured heart.

II. ANTECEDENTES

II.1. Enfermedades cardiovasculares.

II.1.1 Epidemiología.

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) comprenden un grupo de patologías que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos y en su conjunto son la primera causa de muerte a nivel mundial ¹. Según datos de la organización mundial de la salud (OMS) el año 2014 murieron cerca de 17,7 millones de personas a causa de estas enfermedades, lo que representa el 31 % de las muertes en el mundo ². En Chile el panorama es similar, la estadística indica que un 27,1 % de la población muere a causa de ECVs³.

II. 1.2 Tipos de ECVs y remodelado cardíaco

Las ECVs se clasifican según los criterios de la OMS en: cardiopatía coronaria, cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita y trombosis venosa ¹.

En el corazón se puede producir una respuesta patológica progresiva denominada remodelado cardíaco, la que puede deberse a muerte de cardiomiocitos, inflamación, sobrecarga de presión o de volumen generado por estas enfermedades, infecciones bacterianas y algunas toxinas. Esta respuesta se caracteriza por un conjunto de eventos moleculares, celulares e intersticiales que clínicamente se manifiestan en cambios en el tamaño, forma y función de este órgano, llevando a una disfunción cardíaca progresiva que puede generar arritmias e insuficiencia cardíaca (IC)⁴. El mecanismo patológico de remodelado (**Figura 1**) involucra muerte de cardiomiocitos por necrosis y apoptosis, la que es compensada por hipertrofia (aumento de tamaño) de estas células, modificación del metabolismo energético del corazón asociado a resistencia a la insulina y alteración electrofisiológica, gatillada por acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) producida por los miofibroblastos cardíacos (MFC). Este último proceso es conocido como fibrosis cardíaca. ⁵⁻⁹.

II. 1.3 Factores de riesgo cardiovascular y lipoproteínas de baja densidad oxidada (LDLox)

Los principales factores de riesgo para este grupo de patologías, según los datos de la cohorte de Framingham y el estudio Interheath son: predisposición genética, hipertensión, tabaquismo, diabetes, falta de actividad física, obesidad e hiperlipidemia ^{10,11}.

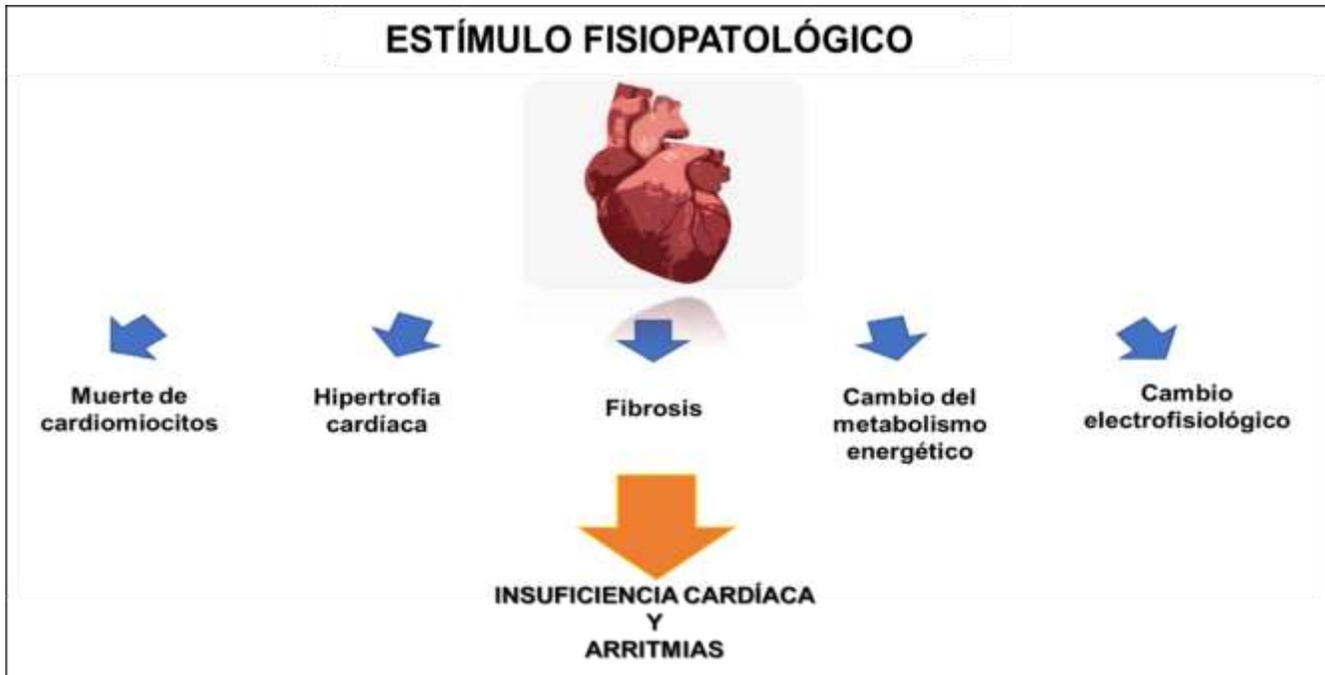


Figura 1. Remodelado cardíaco. Un estímulo fisiopatológico crónico o agudo (ejemplo: inflamación, sobrecarga de presión o volumen) produce una serie de eventos en el corazón: muerte de los miocitos, hipertrofia, cambio en el metabolismo energético y electrofisiológico, lo que a largo plazo produce arritmias e IC.

Luego de la hipertensión, la hiperlipidemia es considerada la segunda condición crónica de mayor incidencia en Estados Unidos y el factor de riesgo más común en personas que presentan infarto del miocardio (50% de los pacientes con colesterol elevado)^{11,12}. En Japón un estudio que reunió 65594 individuos reveló una relación directa entre altos niveles de colesterol plasmático y el desarrollo de ECVs en individuos entre 40-69 años¹³. Más aún, una serie de trabajos revisados por Wadhwa y cols., indican que la disminución del nivel de colesterol total entre 1980 al 2010 explicaría el descenso entre un 19 a 6% en la mortalidad asociada a ECVs en Estados Unidos y Canadá¹⁴. En Chile, según datos de la última encuesta nacional de salud realizada el 27,8% de la población presenta niveles altos de colesterol (>200 mg/dL)¹⁵.

La hiperlipidemia es definida como el aumento de la concentración plasmática de colesterol total con o sin aumento de triglicéridos¹⁶. EL colesterol es transportado en el cuerpo asociado a 5 tipos de lipoproteínas: Quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), densidad intermedia (IDL), baja densidad (LDL) y alta densidad (HDL). Sin embargo, en la actualidad la forma oxidada de la LDL (LDLox) es considerada como la partícula responsable del riesgo cardiovascular debido a su papel central en la formación de la placa de ateroma¹⁷⁻²¹.

Adicionalmente, se ha propuesto que la LDLox puede ser usada como un biomarcador de ECVs debido a que el nivel elevado de esta partícula en sangre es un predictor del desarrollo de ECVs en hombres²². Fraley y cols., demostraron que existe un aumento temporal significativo del nivel plasmático de esta partícula en pacientes con síndrome coronario agudo²³. A su vez, se ha observado que la

reducción del nivel de LDLox en pacientes con riesgo cardiovascular disminuye significativamente la probabilidad de desarrollo de este tipo de patologías²⁴.

II.2. Lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox)

II.2.1 Formación de LDLox

La función normal de la LDL es el transporte del colesterol a las distintas células del organismo. Esta partícula se genera a partir del catabolismo del VLDL (rica en triglicéridos) en el hígado. Una vez en circulación esta partícula pierde triglicéridos y algunas de las proteínas que la conforman (APO-CI, APO-CII, APO-C3, APOE) y capta colesterol hasta formar la LDL, compuesta mayoritariamente por ésteres de colesterol, lipoproteína APO-B y algunas moléculas antioxidantes como α -tocoferol y β -carotenos^{25,26}. En condiciones pro-oxidantes esta partícula es modificada oxidativamente como se observa en la **Figura 2**. Inicialmente, la oxidación tiene lugar en la porción lipídica de esta apolipoproteína, formando la partícula mínimamente oxidada. Luego, la oxidación afecta a la proteína APO-B100. La partícula de LDL, ahora altamente oxidada es reconocida por receptores tipo *scavengers* (RS) expresados en varios tipos celulares como plaquetas, macrófagos, endotelio, cardiomiocitos y fibroblastos^{25,27}.



Figura 2. Modificación oxidativa de la partícula de LDL. Las moléculas nativas de LDL son inicialmente lipoperoxidadas y se forman las moléculas de LDL medianamente oxidadas. Cuando la proteína apoB es oxidada las partículas de LDL se transforman en moléculas de LDL altamente oxidadas²⁷.

II. 2.2 LDLox y aterosclerosis:

Desde que la LDLox fue descrita en 1979 por Henriksen, hasta la fecha existen 8170 publicaciones en la base de datos PubMed (NCBI) relacionadas con su búsqueda²⁸⁻³⁰. Esto se debe al papel fundamental del LDLox en la fisiopatología de la aterosclerosis y por ende en su participación indirecta en el desarrollo de otras ECVs³¹⁻³³.

Por consenso, se ha descrito que la partícula de LDL es oxidada mayoritariamente en el sub-endotelio arterial por acción de macrófagos y células endoteliales, debido a que en la circulación sanguínea existe un alto nivel de compuestos antioxidantes como tocoferol, uratos, apolipoproteínas y albúmina sérica, lo que hace poco probable que ocurra este proceso directamente en la sangre³⁴⁻³⁷. La LDLox formada intracelularmente por macrófagos o en la MEC del sub-endotelio por especies reactivas del oxígeno (ROS) se puede unir a sus RS en los macrófagos, los que se diferencian a células espumosas que secretan metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), citoquinas, factores de crecimiento y MCP-1, entre otros factores³⁸⁻⁴¹. También, se ha observado que la LDLox se une a receptores en las células endoteliales, las que son activadas por esta señal y producen proteínas de adhesión, tales como E-selectina y VCAM-1, entre otras, lo que induce la interacción de monocitos y células T al endotelio vascular y finalmente, migración de estas células al sub-endotelio⁴². A su vez, esto promueve la migración de las células de la musculatura lisa vascular desde la íntima al sub-endotelio donde secretan proteínas de MEC y proliferan debido a la acción de factores de crecimiento^{42,43}. Adicionalmente, la LDLox se une a plaquetas, un proceso que aumenta el tamaño de la placa de ateroma y la vuelve más inestable⁴⁴.

II.2.3 Receptores *scavenger* y LDLox.

Goldstein fue el primero en demostrar que la partícula de LDLox no es reconocida por el receptor tradicional para la LDL (sin modificaciones)⁴⁵. En la actualidad se sabe que la LDLox se une a SRs⁴⁶. Inicialmente, los SRs se describieron como receptores capaces de unir la LDLox con distintos grados de oxidación. Sin embargo, en la actualidad es conocido que estos receptores pueden reconocer también proteínas endógenas y algunos patógenos⁴⁷. Aunque al menos 7 de los 10 tipos de SR descritos, son capaces de reconocer distintos estados de modificación del LDL⁴⁷. Estos receptores se clasifican en Clase A: SR-AI/II and MARCO; Clase B: SR-B1/CLA-1 y CD36; Clase C: dSR-CI (solo presente en *Drosophila melanogaster*); Clase D: CD68/macrosialinas; Clase E: *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1* (LOX-1); Clase F: SREC y Clase G: SR-G (SR-PSOX)⁴⁷.

Uno de los SRs más estudiados es el receptor de clase E, LOX-1, clonado y descrito por primera vez en células endoteliales por Sawamura en 1997⁴⁸. Este receptor es central en la fisiopatología de la aterosclerosis junto con la LDLox, su principal ligando⁴⁹.

II.3. Receptor LOX-1

II.3.1 Gen ORL-1 y estructura proteica de LOX-1

LOX-1 (273 aminoácidos, 52 kDa), es una glicoproteína de membrana del tipo II, de la superfamilia de las lectinas tipo C⁵⁰. Contiene cuatro dominios estructurales: 1) un dominio corto N-terminal citoplasmático; 2) un dominio transmembrana; 3) un dominio cuello y 4) un dominio tipo lectina en el carboxilo terminal expuesto al espacio extracelular que participa en la unión de su principal ligando, LDLox, el que interactúa con una región del receptor formada por una espina básica de 4 argininas (208, 229, 231 y 248)^{51,52}. La mutación de estos aminoácidos produce pérdida de afinidad por su LDLox^{51,53}. LOX-1 en la membrana plasmática se encuentra como homodímero, cuyas subunidades se unen a través de su dominio C-terminal formando una característica estructura de corazón⁵² (**Figura 3A**)

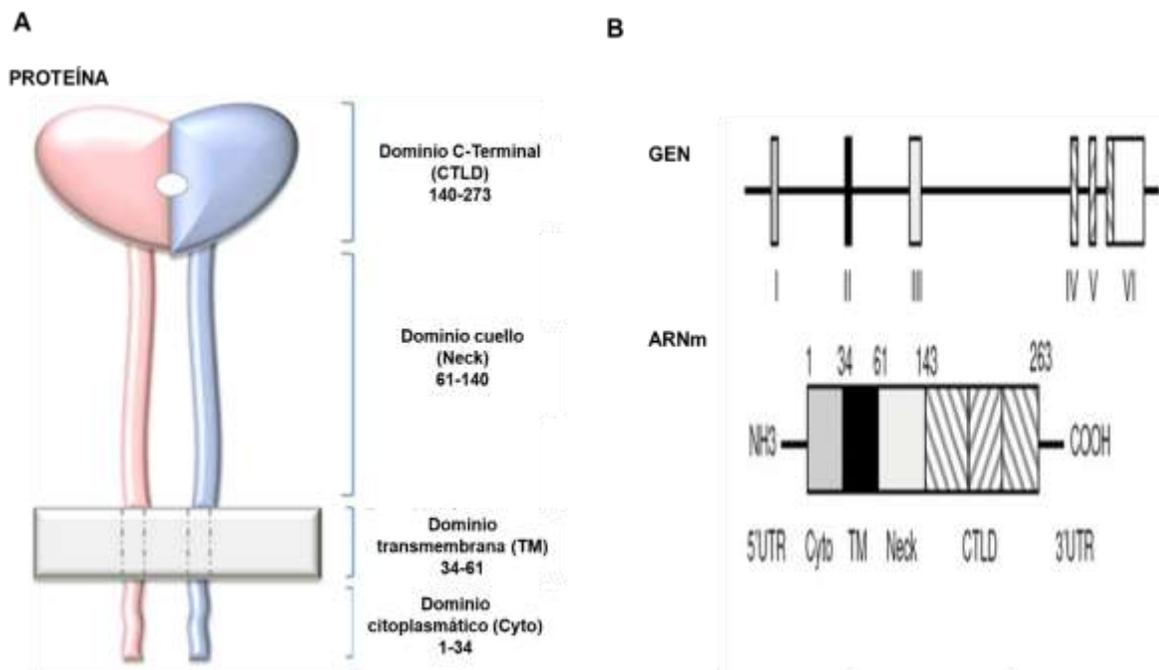


Figura 3. Estructura del receptor LOX-1^{54,55}. En A: se observan los 4 dominios del receptor LOX-1. En B: se muestra la estructura del gen ORL1 que codifica para el receptor LOX-1 y del RNA m que da origen a esta proteína.

Este receptor es codificado por el gen ORL1 ubicado en el cromosoma 12 humano⁵⁶. Tiene 18060 pb, es conocido también con el nombre de LOXIN, SLOX1, CLEC8A y SCARE1. Está compuesto por 6 exones y 5 intrones (**Figura 3B**)^{55,57}. Codifica para tres variantes de RNA mensajeros (NM_001172633; NM_001172632 y 1NM_002543.3)⁵⁷. La variante 1, contiene los 6 exones y codifica para el receptor funcional, la variante 2 pierde el exón 4 y parte del sitio de reconocimiento al ligando y la variante 3, pierde el exón 5 que codifica para la región C-terminal de la proteína que reconoce el ligando y se ha hipotetizado que tiene un efecto protector en el infarto del miocardio, posiblemente por la dimerización con LOX-1 generado por la variante 1⁵⁷.

Análisis de este receptor a nivel de secuencias entre distintas especies muestra un alto grado de conservación entre mamíferos. Según datos de nuestro laboratorio, a nivel estructural este receptor presenta diferencias entre humano, rata y ratón. Sin embargo, la estructura del receptor humano tiene mayor homología con el de rata⁵⁸.

II. 3.2 Ligandos del receptor LOX-1 y vías de señalización.

El principal ligando descrito para este receptor es la partícula de baja densidad oxidada, LDLox, también conocida como el colesterol malo. Sin embargo, ha sido descrito que las LDL con otras modificaciones (carbamilaciones, electronegatividad) también se pueden unir a este receptor^{59,60}. Más aun, el HDL, también conocido como colesterol bueno, otro tipo de lipoproteína se ha descrito que al ser modificado por la 15-lipoxigenasa a 15LO-modificada HDL es capaz de unirse a LOX-1 e inducir su expresión⁶¹. Otros de sus ligandos son fibronectina, HP70, células apoptóticas, fosfolípidos y polianiones⁶¹⁻⁶³

La expresión de LOX-1 puede ser inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF- α), ROS, interleuquina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), aldosterona, angiotensina II (Ang-II), endotelina-1 (ET-1) y el propio ligando LDLox⁶⁴⁻⁶⁶. Esta sobreexpresión aumenta la internalización de LOX-1 mediado generalmente por caveolas en varios tipos celulares^{67,68}. Posterior a su internalización la partícula de LDLox es degradada vía lisosomal y el receptor es reciclado a la membrana celular⁶⁹. A su vez, la unión de LDLox a LOX-1 induce la activación de una serie de vías de señalización⁶⁶. La vía canónica activa a la enzima NADPH oxidasa-2 (NOX-2) y se asocia al aumento de ROS^{66,70}. También se ha descrito que LDLox activa la vía NF κ B asociada a procesos inflamatorios, la vía intrínseca de la apoptosis (**Figura 4**)^{66,71}.

II.3.4 LOX-1 en enfermedades cardiovasculares.

LOX-1 fue descrito por primera vez por Sawamura y cols., en células endoteliales de aorta bovina⁴⁸. Estos investigadores clonaron el receptor y describieron que es responsable de unir, internalizar y degradar LDLox⁴⁸. En 1999 se estableció que LOX-1 se expresa en placas de ateroma humanas y que participa en su formación⁷². Varios trabajos han mostrado que este receptor se expresa en varios tipos celulares como macrófagos, células endoteliales, células lisas vasculares, plaquetas y fibroblastos cardíacos (FC)^{19,48,73-75}. En nuestro laboratorio se ha demostrado que LOX-1 aumenta su expresión durante proceso de diferenciación *in vitro* de FC a MFC de rata adulta⁷⁶. La expresión de este receptor es inducida por TNF- α , Ang-II, TGF- β 1 y LDLox en distintos tipos celulares⁶⁴. Chen y cols., en el año 2005 describieron que en FC de rata adulta que sobreexpresaban LOX-1 y que fueron tratados con LDLox se inducía la expresión de proteínas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1⁷⁷. Estos mismos autores describieron que el proceso de isquemia/reperfusión induce la expresión de LOX-1 en el corazón de ratones⁷⁸. Adicionalmente, se ha descrito que los FC de ratones *knockout* (KO) para LOX-1 disminuyen su capacidad proliferativa y esta era recuperada al sobre-expresar este receptor.^{75,77}

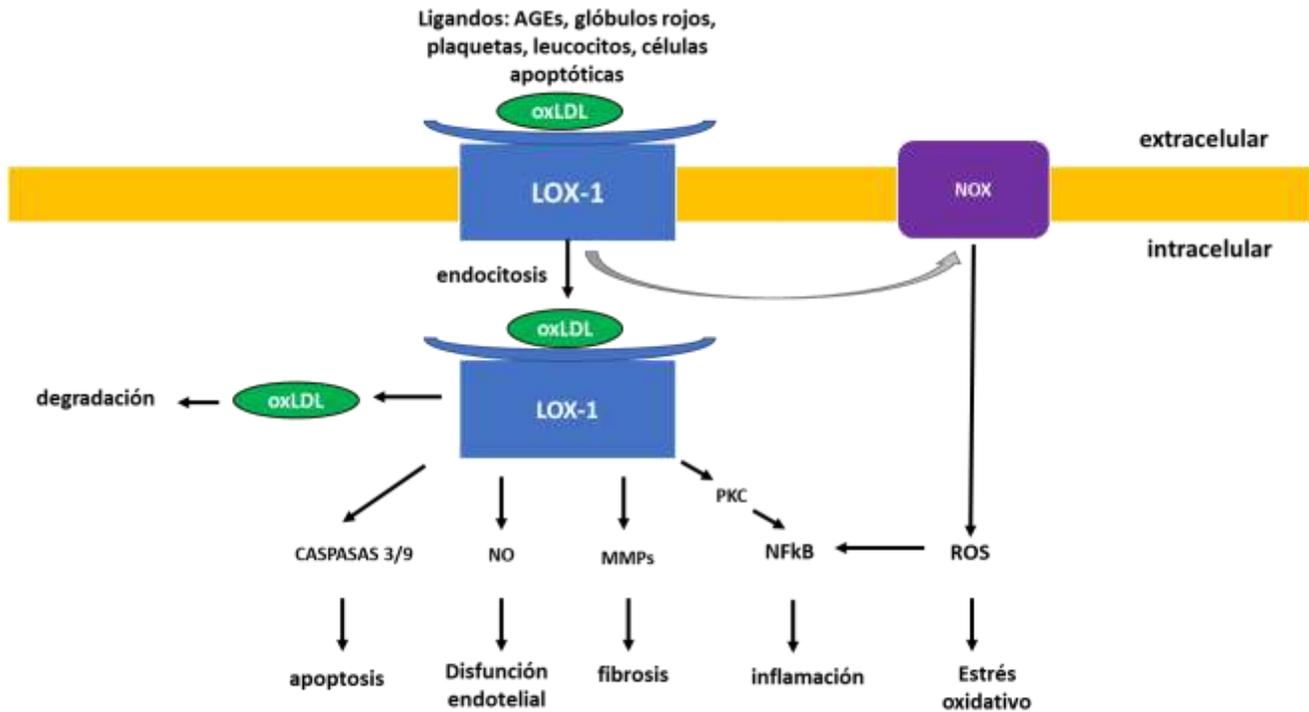


Figura 4. Vías de señalización activadas por los distintos ligandos de LOX-1⁶⁶. LOX-1 al unir LDLox puede ser internalizado por endocitosis y activar vías que llevan a degradación de proteínas, apoptosis (caspasa3/9), disfunción endotelial (NO), fibrosis (MMPs), inflamación (NFkB) e inducción de estrés oxidativo por activación de NOXs y producción de ROS.

II.4. Fibrosis cardíaca.

II.4.1 Nociones generales de la fibrosis.

El daño en cualquier órgano produce destrucción de células epiteliales y/o endoteliales residentes y la liberación de mediadores pro-inflamatorios como citoquinas y quimioquinas, las que inducen el reclutamiento de una serie de células asociadas a la respuesta inmune, tales como monocitos y neutrófilos, entre otros⁷⁹. Estas células también producen y secretan citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, etc), quimioquinas (CCL2, CCL8, CXCL5,etc) y factores de crecimiento (FGF, PDGF, VEGF) que activan algunas células efectoras que conducen el proceso fibrogénico⁹. El principal factor involucrado en el inicio de este proceso es el TGF- β , que activa a los fibroblastos y los diferencia a miofibroblastos, siendo estos últimas las principales células efectoras en la fibrosis⁸⁰.

Una de las características de la fibrosis es la acumulación de MEC en el órgano afectado, matriz que es producida principalmente por los miofibroblastos. Inicialmente, la respuesta fibrogénica tiene una función reparativa a corto plazo, pero debido a razones no comprendidas a la fecha esta respuesta se perpetúa en el tiempo y genera pérdida de funcionalidad del órgano afectado ^{81,82}.

Existen varios órganos que pueden desarrollar fibrosis patológica, tales como piel, hígado, pulmón, riñón y corazón, en los que hay participación de una serie de vías de señalización y procesos celulares en común. Las principales vías de señalización involucradas son: **a)** TGF- β 1/Receptor serina-treonina quinasa ALK (TGFRI y II)/Smad; **b)** Integrinas/ Quinasas asociadas a integrinas; **c)** Factores de crecimiento (PDGF, CTGF); **d)** Citoquinas/MAPKs y Rho-ROCK y **e)** Péptidos vasoactivos (Ang-II, ET-1)⁸³.

Estas vías llevan al aumento de la expresión de proteínas de MEC, entre estas, se encuentran el colágeno tipo I y III (COL-I y III), fibronectina-EDA (FN-EDA) y proteínas de membrana basal como laminina, además, los miofibroblastos expresan actina de musculo liso alfa (α -SMA) que además de un carácter secretor a estas células le dan un fenotipo contráctil^{46,84}

II.4.2 Fibrosis cardíaca.

La fibrosis cardíaca o acumulación patológica MEC en el miocardio forma parte del proceso de remodelado cardíaco que se origina tras una injuria en el corazón (**Figura 5**)⁸⁵. Existen dos tipos de fibrosis miocárdica: **a)** reactiva, que se desarrolla en el espacio perivascular y está asociada a una sobrecarga de presión y **b)** de reemplazo, que se lleva a cabo en el lugar de muerte de cardiomiocitos posterior a un daño por isquemia⁸⁶. Un 70% de las células que componen el corazón humano son fibroblastos y es por ello que se considera que estas células son las más relevantes en el proceso de fibrosis cardíaca⁸⁷.

Posterior a un daño en el corazón, al igual como ocurre en otros órganos, los FC se activan y diferencian a MFC como parte del proceso de reparativo. Este proceso es inducido principalmente por la señalización de la citoquina TGF- β 1 que es secretada por macrófagos y FC posterior el daño⁸⁸(**Figura 5**). La molécula de TGF- β 1 señala a través de los receptores TGFRI y TGFR2. La unión del ligando induce la dimerización de los receptores y su activación por autofosforilación. El receptor activo, fosforila a las proteínas Smad2/3 la cual se unirá a Smad4 y formaran un complejo que se transloca al núcleo y se une a factores de transcripción que regulan la expresión de una serie de genes que llevan a la diferenciación a MFC. Además de esta vía canónica se ha descrito que se activan las vías de las MAPKs, Rho quinasa y AKT.

Los MFC se caracterizan por expresar α -SMA o actina de musculo liso, que no se expresa en FC y le confiere a estas células una característica contráctil. Además, los miofibroblastos aumentan la síntesis y secreción de COL-I y FN-EDA e inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) las que en su conjunto incrementan la acumulación de proteínas de MEC y le confieren a estas células una funcionalidad secretora⁸⁹. Una vez finalizado el proceso reparativo, los MFC normalmente mueren por un mecanismo aún no descrito, sin embargo, hay evidencias que señalan que estas células pueden persistir en el corazón 17 años después de ocurrido un infarto y con ello producción crónica de MEC, lo que a largo plazo puede llevar al desarrollo de arritmias y finalmente a IC⁹⁰. Los MFC son capaces de responder a Ang-II, producir factores TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α y péptidos de angiotensina *de novo*^{68,88,91,92}. En la actualidad, no son totalmente comprendidos los mecanismos que llevan a la perpetuación de los MFC y, por lo tanto, su estudio es relevante para entender este proceso y desarrollar fármacos adecuados para su tratamiento.

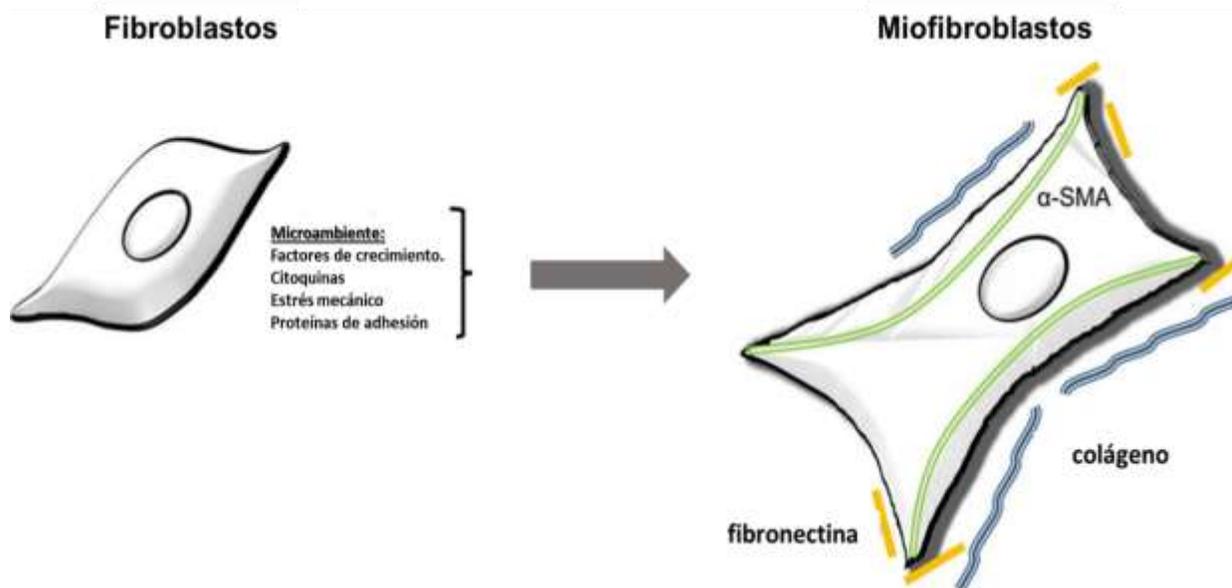


Figura 5. Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos cardíacos.

II.4.3 Blancos terapéuticos actuales en fibrosis cardíaca

Debido a que se sabe que hay una directa relación entre la progresión de la IC y el desarrollo de arritmias con el desarrollo de la fibrosis cardíaca, actualmente la búsqueda de blancos terapéuticos para detener esta respuesta patológica ha tomado interés⁹³⁻⁹⁵.

A la fecha no existe ningún fármaco anti-fibrótico que esté en uso en la clínica de las ECVs. Sin embargo, se ha propuesto que inhibir el proceso de diferenciación de FC a MFC (**Figura 5**) y todas las vías implicadas en él podrían ser un buen blanco terapéutico. Los resultados no son alentadores debido a que las pruebas en animales demuestran que inhibir las vías de señalización de TGF- β 1, Ang-II, PDGF o CTGF afecta una serie de otros procesos biológicos regulados por estos factores, teniendo una serie de efectos secundarios nocivos que no permite su intervención terapéutica⁹⁶. Se ha propuesto que mejorar la entrega de estos fármacos para evitar la distribución sistémica podría ayudar a su posible uso^{93,97}. Pero no hay que olvidar que, si bien el MFC se puede considerar la célula responsable de la perpetuación de acumulación de MEC en el corazón, esta célula cumple un rol reparativo fundamental posterior a una injuria y por lo tanto, impedir que ocurra el proceso de diferenciación puede producir fallas en la reparación cardíaca^{98,99}. Es así como la búsqueda de blancos terapéuticos a nivel del MFC que disminuyan la secreción de proteínas de MEC o impidan la perpetuación de esta célula en el tejido cardíaco, podría ser una estrategia prometedora para evaluar. Algunos antecedentes en esta línea indican que la vía LDLox/LOX-1 podría ser un nuevo blanco terapéutico para tratar fibrosis cardíaca.

II.4.4 LDLox y LOX-1 en fibrosis.

La evidencia indica que LOX-1 participa en el desarrollo de fibrosis cardíaca, al respecto, en un modelo de ratón KO para el gen de LOX-1 sometidos a isquemia/reperfusión, se observó mayor sobrevivencia de estos animales en comparación con los *wild type* (wt) con reducida hipertrofia cardíaca asociada a disminución en la acumulación de colágeno¹⁰⁰. También, se ha descrito que la síntesis de colágeno gatillada por la señal de TGF- β 1 en FC de ratón es dependiente de la presencia de LOX-1¹⁰¹. Wang y cols., observaron que FC de ratones KO para LOX-1 mostraron una dramática reducción en la proliferación celular *in vitro*⁷⁵.

Existen algunos antecedentes que vinculan a LDLox en la patogenia de la fibrosis hepática y renal^{102,103}. Sin embargo, interesantemente, LDLox, el principal ligando de LOX-1, no ha sido implicado en la fisiopatología de la fibrosis cardíaca. Aunque existen evidencias que permiten especular que podría contribuir en este proceso patológico, por ejemplo, ratones hipercolesterolémicos muestran aumento de los niveles del receptor LOX-1 e hipertrofia cardíaca asociada a aumento en la deposición de colágeno en el corazón de estos ratones¹⁰⁴. Más aún, en pacientes que han sufrido a un infarto se han encontrado elevados los niveles de LDLox en el sitio del daño¹⁰⁵. Como también ha sido descrito que los niveles de LDLox en la sangre ventricular de individuos con IC son elevados en relación a los niveles observados en de sangre periférica¹⁰⁶. El 2002 Tsutsui y cols., demostraron que elevados niveles plasmáticos de LDLox se correlacionan con la severidad y mortalidad de la IC¹⁰⁷.

Adicionalmente se sabe que TGF- β 1 induce la expresión de LOX-1 en distintos tipos celulares^{74,108,109} y que durante el proceso de diferenciación *in vitro* de FC a MFC inducido por el tratamiento con TGF- β 1 hay un aumento en la expresión de LOX-1⁷⁶. En contra parte, se ha observado que el tratamiento de células endoteliales con anticuerpos anti-LOX disminuye la síntesis de TGF- β 1 y atenúa la expresión de TGFR1 inducida por LDLox⁷³. Estos resultados dan cuenta de una regulación positiva entre LDLox/LOX-1/TGF- β 1, el principal inductor del remodelado cardíaco. Resultados del laboratorio demuestran que el tratamiento dosis respuesta con TGF- β 1 en MFC no induce aumento en los niveles de COL-I, FN-EDA y TGFR. Pero sí produce aumento de LOX-1 y de TGF- β 1 endógeno. El tratamiento con de MFC con LDLox no induce la expresión del receptor de TGFR en MFC (datos anexos).

Si efectivamente LDLox vía su receptor LOX-1 participan en fibrosis cardíaca sería posible usar este receptor como blanco terapéutico. A la fecha se han descrito 3 tipos de inhibidores para LOX-1. En el 2011, Nishizuka describió que varios extractos ricos en procianidinas eran capaces de inhibir la interacción de LDLox/LOX-1, y probó que *in vitro* los trómeros de procianidina, en especial el C1 presentaban un potente efecto inhibitorio de la internalización de LDLox vía LOX-1 en células CHO, similar el efecto observado al usar el pre-tratamiento con anticuerpo anti-LOX-1, el IC₅₀ descrito fue de 51 ng/mL¹¹⁰. Un segundo tipo de moléculas diseñadas *in vitro* y que presentaban una estructura similar a LDLox son una serie de fosfolípidos modificados oxidados, el con mejor resultado en células COS que sobre-expresaban, PLAzPC, fue capaz de reducir en más de 50% la unión de LDLox/LOX-1 a 5 μ M de concentración¹¹¹. El tercer tipo de inhibidores descritos para LOX-1, fueron las estatinas¹¹². Según análisis de *docking* estas moléculas se unen al túnel hidrofóbico del receptor establemente e impide la unión de LDLox¹¹². Ensayos de unión en presencia de diversas estatinas, demostraron que la lovastatina presenta el menor IC₅₀ (2 μ M) y se propuso el tratamiento con estos fármacos podría evitar directamente

el desarrollo de la placa de ateroma al inhibir LOX-1, más allá de su conocido rol de disminuir el colesterol circulante debido a la directa inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa¹¹².

II.5. Caveolina-1 y fibrosis

II.5.1 Generalidades de caveolina-1.

Caveolina-1 (CAV1), también conocida como VIP21, es una proteína de 22 kDa con dos isoformas α (178 aa) y β (147 aa) codificadas por el gen CAV1 de 36401 bp presente en el cromosoma 7 humano (NP_001744.2)¹¹³. Se expresa en varios tejidos, pero los más altos niveles han sido encontrados en pulmón, corazón, colon^{114,115}. Pertenece a una familia de proteínas llamadas caveolinas cuyos otros miembros son CAV2 y CAV3¹¹⁴. CAV1 y CAV3 forman oligómeros y participan en la biogénesis de las caveolas en asociación con otras proteínas llamadas cavininas¹¹⁶. En la **Figura 6** se muestra la estructura de la CAV1.

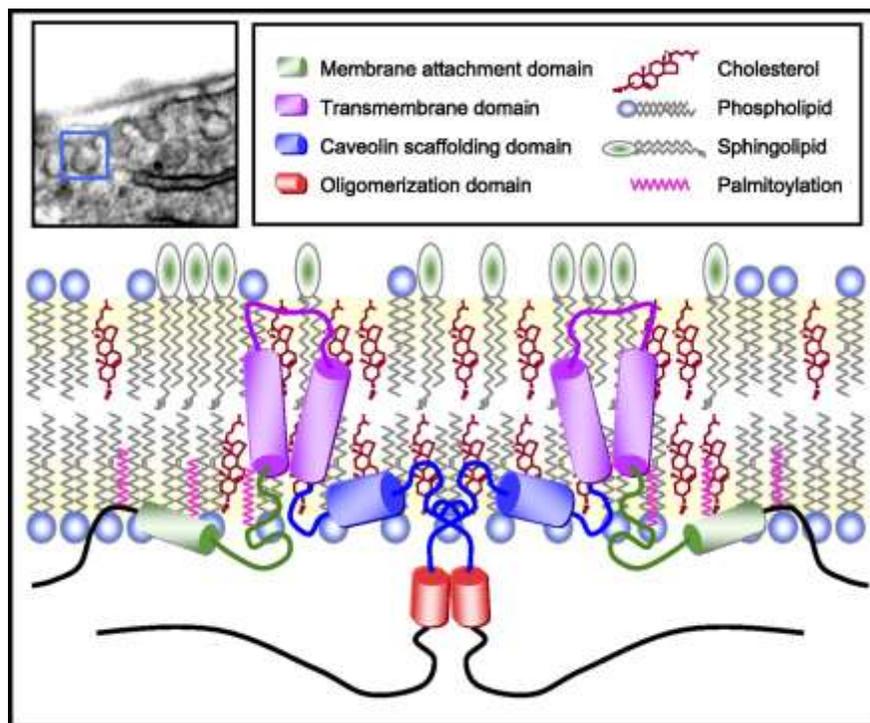


Figura 6. Estructura de la proteína caveolina-1. Esta proteína tiene un dominio hidrofóbico central que se inserta en la membrana interna adoptando una conformación tipo horquilla y que deja expuesto el dominio amino y carboxilo terminal hacia el citoplasma. CAV1 puede homo y heterodimerizar a través de su dominio de oligomerización con otros monómeros de CAV. Entre estos dominios se encuentra la región entre los residuos 82-101 que corresponde al dominio *scaffold* requerido para la oligomerización como para su interacción con otras proteínas de señalización. En el carboxilo terminal tienen tres residuos de cisteínas palmitoiladas requeridas para la oligomerización, que no necesariamente forman parte de las caveolas¹¹⁷.

La isoforma α de CAV1 tiene una tirosina en la posición 14, que puede ser fosforilada como consecuencia de distintos estímulos como ROS, LPS, VEGF¹¹⁸⁻¹²⁰. La fosforilación de CAV1 también ha mostrado ser importante en el proceso de migración celular y metástasis¹²¹. Los ratones KO de CAV1 aumentan la habilidad de reparar tejidos como hígado y corneas, a su vez existen antecedentes que

indican que esta proteína regula la proliferación celular y senescencia^{122–124}.. Una serie de vías de señales pueden ser reguladas por caveolina-1 (TGF- β 1, PDGF, ET-1, EGF, PI3K) por su directa interacción a través de su dominio *scaffold* o debido a que forman parte de las caveolas que actúan como plataformas de señalización que pueden por ejemplo hacer más fácil la interacción de su receptor con su ligando. Debido a estas múltiples funciones se ha relacionado a esta proteína con una serie de patologías entre las que cabe destacar cáncer, lipodistrofia, diabetes, ECVs y fibrosis ^{78,96,125–129}.

A la fecha no se conoce acabadamente como se regula la expresión de CAV1 en MFC, aunque por datos en otros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales, células de tumorales de próstata. En este proceso han sido involucradas las vías ROS/PI3K/AKT/FOXO-1, también la vía MAPKp38, JNK, ERK, Myc. ^{125,130–132}

II. 5.2 Fibrosis y CAV1.

Se ha establecido en varios tipos de fibrosis el rol anti-fibrótico de CAV1. En fibrosis pulmonar se ha descrito que en fibroblastos pulmonares de personas sanas los niveles de CAV1 son altos en comparación con los fibroblastos de individuos con escleroderma o fibrosis pulmonar idiopática, que se correlaciona con un aumento de las vías de las MAPKs y aumento en los niveles de COL-1¹³³ Más aun cultivos de fibroblastos pulmonares de pacientes con escleroderma tratados con el dominio *scaffold* de CAV1 disminuyen la secreción de colágeno¹³⁴. La administración intraperitoneal del dominio *scaffold* de CAV1 en ratones previo a la administración de bleomicina previene el desarrollo de fibrosis pulmonar¹³⁴. Se ha observado que CAV1 puede llevar a degradación el receptor de TGF- β 1 vía caveolas, su unión al receptor de TGF- β 1 impide la fosforilación de Smad2/3¹³⁵. Interfiere con la activación de TGF- β 1 latente¹³⁵. En modelo de ratones con lipodistrofia, la fibrosis del tejido adiposo aumenta en los animales deficientes en CAV1¹³⁶. Sin embargo, en fibrosis hepática y renal los niveles de CAV1 aumentan durante procesos fibróticos y se ha establecido que en estos órganos caveolina-1 tendría un rol pro-fibrótico¹³⁷. En fibroblastos de piel de pacientes sanos y con escleroderma se observaron elevados niveles de CAV1 el tratamiento de estas células con TGF- β 1 aumentó la unión de este ligando con el receptor ALK1 y la activación de Smad1¹³⁸.

II.5.3 CAV1 y su rol en fibrosis cardíaca

En relación a CAV1 en fibrosis cardíaca, Miyasato y cols., describieron que ratones KO para CAV1 sometidos a crio-injuria en el ventrículo derecho para inducir remodelado cardíaco, mostraron una mayor activación de la señalización de TGF- β 1/Smad, aumento de deposición de colágeno y finalmente fibrosis en la zona que rodea el daño, a los 14 días post injuria¹³⁹. A los ratones KO CAV1 se les administró el dominio *scaffold* de CAV1 y mostraron una reversión del fenotipo fibrótico (Miyasato y cols., 2011)¹³⁹. Este resultado permite especular que CAV1 podría tener una función anti-fibrótica en el corazón, sin embargo, si esta proteína regula el proceso de diferenciación o si regula la perpetuación del MFC no ha sido investigado a la fecha. Datos de nuestro laboratorio indican que durante el proceso de diferenciación *in vitro* de FC a MFC con TGF- β 1 disminuyen los niveles de CAV1, similar a lo observado en el proceso de diferenciación *in vitro* de MFC pulmonares descrito el 2015 por Sanders, donde se observó que la vía de señalización que controla esta disminución es la MAPKp38 ¹²⁵. Por otra

parte, una publicación del año 2016 de Shivshankar y cols., en ratones KO para CAV1 mostraron aumento de macrófagos tipo M2 posterior a tres días de un infarto cardíaco¹⁴⁰. Adicionalmente, observaron que la administración del dominio *scaffold* de CAV1 en ratones wt previno la acumulación de macrófagos M2 y el desarrollo de fibrosis a los 14 días posterior al infarto¹⁴⁰. Más aún, al realizar transferencia de macrófagos de ratones CAV1 KO a ratones wt de 3 días post-infarto, se encontró exacerbación de remodelado cardíaco¹⁴⁰. La incógnita que queda por develar es si CAV1 cumple una función anti-fibrótica en MFC.

II.5.4 Relación de CAV1 y la vía LDLox/LOX-1

Se ha descrito que el receptor LOX-1 es internalizado junto a su ligando LDLox por endocitosis mediada por caveolas, y que LDLox induce en células HUVEC la expresión de LOX-1 y CAV1, de manera dosis dependiente, con disminución gradual de la expresión a medida que se procesa LDLox en estas células⁶⁸. A la fecha, aún no se ha descrito si en MFC, LDLox regula la expresión de CAV1 y si esta regulación pudiera tener una función asociada a fibrosis cardíaca.

Interesantemente, se ha descrito en modelo de células NIH-3T3 que la proteína CAV1 actúa como un represor maestro de la expresión y la actividad del receptor de TGF- β 1¹⁴¹. En fibroblastos de pulmón diferenciados *in vitro* con TGF- β 1 a miofibroblastos se observó disminución en la expresión de CAV1, gatillada por la vía de TGF- β 1/p38 MAPK, ya la activación de esta vía fue necesaria para aumentar la resistencia a la apoptosis de los miofibroblastos pulmonares. Estos resultados interesantes explicarían, en parte, el mecanismo por el cual los miofibroblastos de pulmón se perpetúan durante el proceso fibrótico¹²⁵.

II.6. El estado del arte indica que:

- La fibrosis cardíaca es un proceso patológico común en varias enfermedades como hipertensión, remodelado posterior a infarto al corazón, arritmias e IC, entre otras patologías. En la actualidad no existe ningún tratamiento farmacológico en el mercado para el tratamiento de la fibrosis cardíaca.
- En general los tratamientos actuales buscan disminuir la activación de FC y su posterior diferenciación a MFC. Para esto se busca inhibir la señalización de la principal citoquina implicada en este proceso, TGF- β 1. Sin embargo, para el proceso de reparación fisiológico posterior al daño en el tejido cardíaco los MFC son de gran importancia. El problema es que por razones desconocidas estas células se perpetúan y la acumulación excesiva de MEC impide el correcto funcionamiento del corazón. Por esta razón es relevante entender los mecanismos que regulan la persistencia de estas células.
- El receptor LOX-1, central en el desarrollo de la placa de ateroma, también ha sido descrito que participa en el desarrollo de fibrosis cardíaca. En ratones KO para este receptor, disminuye la acumulación de MEC posterior a daño por isquemia y reperfusión. El principal ligando de este receptor, LDLox, aumenta ROS vía activación de NADPH oxidasa. A nivel de tejido cardíaco

existe evidencia de que posterior a un daño las ROS pueden activar la señalización de factores pro-fibróticos como TGF- β 1 y Ang-II. Adicionalmente, se ha descrito que bajas dosis de LDLox pueden estimular la proliferación y síntesis de proteínas como colágeno, MMPs y CAV1 de distintos tipos celulares. En modelos de fibrosis renal y hepática se ha evidenciado que LDLox actúa como una señal que estimula fibrogénesis en estos órganos.

- La internalización del receptor posterior a la unión de LDLox, se ha descrito dependiente de caveolas. La principal proteína de estas balsas lipídicas, CAV1, se ha encontrado que participa como señal anti-fibrótica en varios modelos de fibrosis. Sin embargo, en fibrosis hepática se ha descrito como pro-fibrótica y en corazón la evidencia apunta a que actúa como una proteína anti-fibrótica, regulando la respuesta inmune. Pero no se ha estudiado si cumple alguna función en MFCs.

En razón al estado del arte el modelo de trabajo que se postuló y originó la hipótesis de esta tesis fue el siguiente:

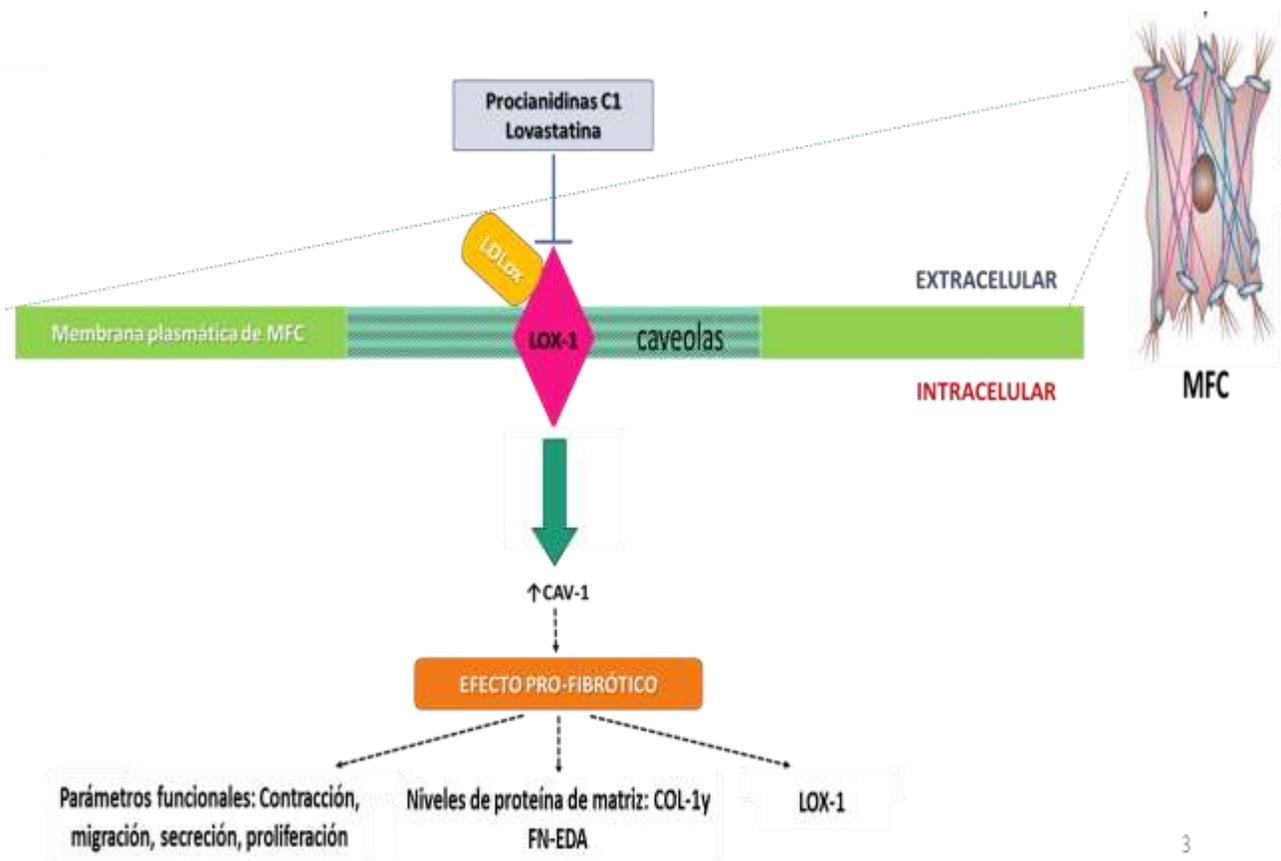


Figura 7. Modelo pro-fibrótico de LDLox en MFC de rata adulta. La molécula de LDLox se une al receptor LOX-1 presente en la membrana de MFC y lo activaría. Este estímulo aumentaría los niveles de COL-I/FN-EDA, activaría la proliferación de MFCs y modificaría algunos parámetros funcionales característicos de los MFC (Contracción, secreción de colágeno y migración). Esta señal sería dependiente del aumento de la expresión de LOX-1 y CAV1. El uso de inhibidores del receptor, inhibirían la respuesta pro-fibrótica gatillada por el estímulo de LDLox.

III. HIPÓTESIS

“En miofibroblastos cardiacos de rata adulta, la vía LDLox/LOX-1 induce un efecto pro-fibrótico dependiente de CAV1. Inhibidores del receptor LOX-1 previenen este efecto.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general:

Determinar si la vía LDL/LOX-1 induce un efecto pro-fibrótico dependiente de CAV-1 en MFC de rata adulta y evaluar si el uso de inhibidores del receptor LOX-1 previene este efecto.

IV. 2 Objetivos específicos.

Para validar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos específicos en MFC de rata adulta:

IV.1.1. Determinar el efecto pro-fibrótico de LDLox.

IV.1.2. Analizar si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente del receptor LOX-1.

IV.1.3 Dilucidar si el uso de inhibidores del receptor LOX-1 (lovastatina y procianidina C1) previenen el efecto pro-fibrótico inducido por LDLox.

IV.1.4. Conocer si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente de los niveles de CAV1.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 1 Materiales.

V.1.1 Animales

Se trabajó con ratas Sprague-Dawley machos (230 a 270 gramos, las que fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios fueron realizados según lo indicado en la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, 1996), y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética local.

V.1.2 Material quirúrgico.

Para la toracotomía se utilizó tijera de disección modelo Metzenbaum recta 18 cm, tijera de disección 9 cm, pinza hemostática modelo Kelly curva 14 cm, pinza de disección anatómica 18 cm, todas de marca HA – WERKE (Alemania); hojas de afeitar Addendorf de acero inoxidable 43 x 22 x 0,10 mm (LB-0420.0100) y jeringa de tuberculina (BD Plastipak: 990214).

V 1.3 Material de cultivo celular.

El cultivo celular se hizo en placas de cultivo de 100, 60, 35 mm (Falcón®: 3530003, 3530001, 3530002); placas de cultivo celular 12, 24, 48 (Costar®: 3512, 3524, 35,48). Para el conteo de células se empleó cámara de Neubauer 0,1 mm de profundidad 0,0025 mm² de superficie (Hirschmann EM Technicolor: 8100203).

V.1.4 Insumos y reactivos.

V.1.4.1 Trabajo con animales:

En el manejo de animales previo a la toracotomía se empleó ketamina clorhidrato solución inyectable 115 mg/mL (n° cat: 131243); xilacina clorhidrato 2% solución inyectable (n°cat: XI-51131002); etanol al 95% (Hes Ltda); povidona yodada 10% (Difem pharma); eglezyme (Egle S.A)

V.1.4.2 Cultivo celular:

Para el cultivo celular se utilizó: colagenasa tipo II (Gibco®: 17101-015); medio DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific®: 12400-024); suero fetal bovino (SBF, Biological industries: 04-001-1A-US); tripsina/EDTA 10X (Biological industries: 03-051-5B); solución de penicilina, estreptomicina, anfotericina B (Biological industries: 03-033-1B); Tampón Gérard (NaCl 128 mM, Winkler: SO-145; KCl 4 mM, Winkler: PO-1260; NaH₂PO₄ 0,19 mM , Winkler: PO-1290; Na₂HPO₄ 1,39 mM, Winkler: PO-1285; MgSO₄•7H₂O 1,39 mM, Winkler: MA-0980; HEPES ácido libre 1mM, Winkler: BM-0855; (D)-(+)-Glucosa 1,5 mM, Sigma®: G8270; Piruvato de sodio 1,01 mM, Merck Millipore®: 6619); Dulbecco Buffer fosfato salino (Sigma: D8537)

V.1.4.3 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR a tiempo real:

Para la extracción de RNA total se empleó Trizol (Life Technologie: 15596018); cloroformo grado análisis (Fisher Scientific: S25248); isopropanol grado análisis (Fisher Scientific: A415-4); etanol grado análisis (Fisher Scientific: AC615090010) y agua grado biología molecular (MO BIO laboratorios: 17012-200). La síntesis de cDNA se realizó con el kit iScript™ (Bio-Rad:1708891) y la reacción de qPCR con el kit Power Up (Thermo Fisher Scientific: A25742).

V.1.4.4 Extracción y cuantificación de proteínas.

Para la extracción de proteínas se utilizó Tampón Ripa 1X (25mM Tris-HCl, Winkler: BM-2000; 150 mM NaCl, Winkler: SO-1455; 1% NP-40, Winkler: BM-1225; 1% Desoxicolato de sodio, Winkler: BM-0035, 0.1% SDS, Winkler: BM-1650, cocktail inhibidor de proteasas en tabletas Complete Mini, Roche Diagnostics:11836153001; Cocktail inhibidor de fosfatasa PhosSTOP en tabletas, Roche Diagnostics: 04906845001). La cuantificación de proteína fue realizada con kit micro-BCA™ (Thermo Fisher Scientific: 23235).

V.1.4.5 Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección.

Para realizar y correr el gel de electroforesis se utilizó acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Winkler: BM-0070 y MB-0280); Tampón de corrida 10X (Tris 35 mM, BM-2000; 250 mM SDS, Winkler: BM-1650 y Glicina 1.92 M (Winkler: BM-1820), Estándar de peso molecular PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific®:26616). Para realizar la electrotransferencia se empleó tampón de transferencia 10X (Tris 35 mM, BM-2000; Glicina 1,92 M, BM: 1820); Membranas de PVDF *protean-blot* tamaño de poro 0,2 µm (Macherey-Nagel®: 741260); En la inmunodetección se empleó Tampón TBS-T (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, Winkler: BM-2000; 150 mM NaCl, Winkler: SO-1455); Leche descremada Svelty; Kit de detección quimioluminiscente para HRP, EZ-ECL, (Biological industrie, Cat. No.: 20-500-120). Los anticuerpos utilizados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos usados en esta tesis.

Proteína (MM)	Número de catalogo	Marca	Dilución
LOX-1 (42 kDa)	AB60178	Abcam	1:2500
GAPDH (37 kDa)	SC-32233	Santa Cruz	1:5000
TUB (52 kDa)	R6026	Sigma	1:5000
CAV1 (25 kDa)	BD610060	BD Biosciences	1:2000
α-SMA (42 kDa)	AB7817	Sigma	1:6000
COL-I (135 kDa)	AB34710	Abcam	1:2000
FN-EDA (220 kDa)	AB6328	Abcam	1:1000
Smad3-T (50 kDa)	#9520	Cell Signaling	1:1000
Smad3-P (50kDa)	#9523	Cell Signaling	1:1000
p47-T (47 kDa)	SC-74514	Santa cruz	1:1000
p47-P (47kDa)	SC-86190	Santa cruz	1:1000
Anti-rabbit HRP	111-035-003	Jackson Inmunoresearch	1:5000
Anti-mouse-HRP	115-005-003	Jackson Inmunoresearch	1:5000

V.1.4.6 Inmunocitoquímica:

Para esta técnica se utilizó PFA 16% (Electron Microscopy Sciences: 15710), PBS (Sigma: D8537); Tritón X-100 (Merck Millipore®: 108643) al 0,1% en PBS; Tween-20 (Winkler: TW-1652) al 1% en PBS; albúmina sérica bovina (BM-0150) al 3% en PBS. Los anticuerpos primarios utilizados fueron para α -SMA (Sigma: A5228), LOX-1 (Abcam: 60178), CAV1 (BD biosciences: 610406). Los anticuerpos secundarios empleados fueron: (Jackson Inmunoresearch: 711-195-152, 711-205-152, 711-215-152); Medio montaje para fluorescencia (DAKO: S3023).

V.1.4.7 Ensayos de proliferación celular y geles de contracción:

Para la proliferación celular se utilizó azul de Tripán (Merck Millipore®: 111732); Ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo® Luminescent (Promega: G7571); Kit-1 de proliferación celular MTT (Roche: 11465007001); anticuerpo Ki67 (Cell signaling: #9129). En los ensayos de contracción se empleó colágeno de cola de rata tipo-1 (Millipore: 08-115).

V.1.4.8 Silenciamiento de la expresión de LOX-1, TGF- β 1 y CAV1:

Para los ensayos de silenciamiento se utilizó, agente de transfección Lipofectamina RNAiMAX (ThermoFisher Scientific: 13778030), Mission siRNA pre-diseñados para LOX-1 (Sigma: SASI_Rn01_00106751; SASI_Rn02_00267601), TGFR1 (SIGMA: SASI_Rn01_00038290; SASI_Rn02_00260174) y CAV1 (SIGMA: SASI_Rn02_00264757; SASI_Rn01_00109244); Medio Opti-mem reducido en suero (Gibco: 31985070)

V.2 Métodos.

V.2.1. Cultivo primario de FC y diferenciación a MFC.

V.2.1.1 Cultivo de FC.

Se trabajó con ratas machos Sprague-Dawley de 230-270 g, según el protocolo descrito por Aránguiz-Urroz y cols., 2011¹⁴². Brevemente, las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina-xilacina (2:1). Los corazones se extrajeron por toracotomía y se digirieron con colagenasa tipo I. El producto de la digestión se sometió a agitación por 1 hr a 37°C y 200 rpm, posteriormente se centrifugó a 750 rcf por 2 min, se eliminó el pellet y el sobrenadante se volvió a centrifugar por 10 min a 1750 rcf. El pellet celular obtenido fue resuspendido en medio DMEM-F12 al 10% en SBF suplementado con antibióticos (penicilina, estreptomycin, anfotericina B). Se sembraron en placas de cultivo celular de 100 mm y se cultivaron toda la noche a 37°C al 5% en CO₂. En la mañana siguiente se les cambio el medio, y los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia.

V.2.1.2 Diferenciación a MFC.

Las placas de FC confluentes se lavaron dos veces con 5 mL de PBS 1X. Las células se despegaron de las placas de 100 mm con 1 mL de tripsina (0,25% v/v en PBS 1X), se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron en número según estímulos y técnica a utilizar y se diferenciaron a MFC por 96 h con 5 ng/mL de TGF- β 1 en medio DMEM-F12 con 2% de SFB.

Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS y se les adiciono medio DMEM-F12 (2% SBF) fresco, se estabilizaron por al menos 4 h antes de hacer los estímulos.

V.2.2 Preparación de partículas LDLox.

Las partículas de LDLox se prepararon en colaboración con el grupo del Dr. Jorge Toledo del Laboratorio de Biotecnología y Biofarmacia de la Universidad de Concepción. Brevemente, las partículas de LDL nativas se prepararon a partir de muestras de sangre obtenidas de individuos sanos. Para su aislamiento desde el plasma sanguíneo se realizaron ultracentrifugaciones secuenciales a 4°C. Las partículas de LDL fueron dializadas 3 veces durante 36 hrs a 4°C. Posteriormente se realizó la oxidación de las partículas purificadas con CuSO₄ (7 mM) durante 3 h a 37°C. La modificación de las LDL se monitoreó por espectroscopía a través de la generación de dienos conjugados a 243 nm y por electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar el cambio en la migración electroforética entre LDL nativa y las LDLox.

V.2.3. Cinética de Tratamiento de MFC con LDLox.

Con el fin de evaluar el efecto pro-fibrótico de LDLox se trataron los MFC con medio DMEM/F12 al 2% en SFB con y sin LDLox 10 µg/mL en presencia de TGF-β1 por distintos tiempos: 0, 15, 30 min y 1, 3, 6, 24, 48, 72 y 96 h. Cada punto experimental correspondió a un n≥3.

V.2.4. Extracción y cuantificación de proteínas.

Las placas de 35 mm con 2*10⁵ MFC post tratamiento fueron lavadas dos veces con PBS 1X y tratadas por 30 min en hielo con 60 µL de buffer RIPA. Terminado el tiempo se recuperaron los 60 µL y se sonicaron por 5 min a 4 °C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13800 rcf por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron por micro-BSA (Thermo) según condiciones establecidas por el proveedor.

V.2.5. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección.

- i. Electroforesis: Se cargaron 20 µg de proteína de cada uno de los tratamientos a los distintos tiempos en geles de poliacrilamida desnaturantes al 12%. Se corrieron a 100 mV por 2 h en tampón de corrida 1X.
- ii. Electrotransferencia: Posteriormente se transfirieron las proteínas durante 12 h a 50 mA a membranas de PDVF que fueron previamente activadas con metanol por 30 seg.
- iii. Inmunodetección: Las membranas se bloquearon en solución TBS-T al 5% en leche descremada y se incubaron con anticuerpo primario (en la dilución señalada por cada proveedor, **Tabla 3**) toda la noche en agitación. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario-HRP por 1 h y se lavaron con TTBS 1X y luego reveladas con EZ-EC en un transiluminador Syngene XT4. Las imágenes fueron cuantificadas usando UN-SCANT-IT gel 6.1 y se normalizaron con respecto al control de carga (GAPDH, actina o tubulina). Las proteínas que fueron evaluadas y la dilución de anticuerpos fueron empleados son presentados en la **Tabla 3**.

V.2.6. Inmunocitoquímica.

Las células fueron cultivadas y sometidas a los distintos tratamientos antes descritos por 24 y 72 h, fueron lavadas con PBS 1X y posteriormente permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1% y fijadas con PFA al 4%. Luego fueron bloqueadas con TTBS al 2,5% en BSA por 2 h a temperatura ambiente, incubadas con anticuerpo primario de interés toda la noche a 4°C y lavadas con PBS 1X, para posteriormente incubar con anticuerpo secundario marcado con fluorescencia por 3 h. Se lavaron nuevamente los cubreobjetos con PBS 1X y se marcaron los núcleos por 5 min con Hoechst dilución 1:5000. Finalmente, se montaron los cubre objetos en porta objetos con 10 µL de DACO (Invitrogen) y se almacenaron en oscuridad hasta la obtención de las imágenes. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de fluorescencia y analizadas por ImageJ.

V.2.7 Ensayos de proliferación.

V.2.7.1. Conteo con azul del Tripán.

Se sembró 2×10^5 células en placas de 35 mm para cada uno de los tratamientos, por 24 y 72 h en medio DMEM-F12 al 2%. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y se lavaron las células dos veces con 200 µL de PBS (también fueron recuperados) y se incubaron las células con 200 µL de tripsina (0,25% v/v en PBS) por 5 min. Luego se neutralizó la tripsina con suero bovino fetal (100 µL) y tanto los medios sobrenadantes como el PBS utilizado en los lavados y las células tripsinizadas fueron centrifugas a 3800 rcf por 5 min. Posteriormente fueron lavadas dos veces con 200 µL de PBS y recuperadas las células por centrifugaciones de 5 min. Las células fueron resuspendidas en 300 µL de medio DMEM-F12 al 2% en suero y se tomaron 10 µL de la suspensión de células y se mezcló con 10 µL de azul de Tripán. Posteriormente se contó en cámara de Neubauer en microscopio óptico en aumento de 4X las células totales (vivas y muertas) en los 4 cuadrantes de las esquinas y además se contó las células azules (muertas). El conteo se repitió dos veces para cada condición evaluada.

V.2.7.2. Ensayo de viabilidad MTT.

En placas de 12 pocillos se sembraron 1×10^5 células y se incubaron por 72 h con los respectivos tratamientos. Posteriormente se adicionó 50 µL de la solución de MTT y se incubaron por 18 h a 37°C al 5% CO₂. Luego se retiró el medio y se agregaron 600 µL de solvente para MTT y se incubó por 15 min la placa en agitación suave (protegida de la luz). Pasado este tiempo se tomaron 200 µL de solución de cada pocillo y se traspasaron a pocillos de placas de 96 y se midió la absorbancia a 590 nm. Este ensayo se realizó en triplicado para cada determinación y como control de la técnica de uso pocillos sin células, pero con medio usado como blanco.

V.2.7.3. Nivel de Ki67 por inmunocitoquímica.

En placas de 12 pocillos se sembró 4×10^4 células sobre cubreobjetos de 13 mm. Posteriormente se diferenció según las condiciones antes mencionadas y al término de las 96 h se lavaron dos veces con PBS 1X y se les adicionó medio DMEM-F12 fresco al 5% en SBF. Se esperó 18 h y se realizaron los tratamientos por 72 h con LDLox, TGF-β1 y el co-tratamiento. Posterior a ese tiempo se lavaron las células con PBS 1X dos veces. Luego se fijaron por 15 min en PFA el 4%

en PBS a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces por 5 min con PBS 1X. Se bloqueó por 90 min con BSA al 3% en PBS a temperatura ambiente. Luego se realizó tres nuevos lavados de 5 min cada uno y se incubaron las células toda la noche en humedad a 4°C con anticuerpo Ki67 hecho en conejo (cell signaling) dilución 1:100 preparado en solución de BSA al 1,5% en PBS. Luego de ese tiempo se lavó tres veces con PBS-1X y se incubó por 3 h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario Alexa fluor 488 anti-conejo dilución 1:1000. Se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS y se incubó los cubreobjetos por 5 min en solución de hoescht 1:10000 en tampón TE para marcar los núcleos. Posteriormente se lavó 3 veces los cubreobjetos con PBS-1X y se montaron sobre los portaobjetos con solución de montaje de inmunofluorescencia (DAKO) y se almacenaron a 4°C. Finalmente se sacó fotos en microscopia confocal a 10X y luego se contó células totales (marca azul) y células en proliferación (marca verde) y se calculó el porcentaje de proliferación con la siguiente formula:

$$\% \text{ de proliferación: } \frac{\text{Células en proliferación (verde)}}{\text{Células totales (azul)}}$$

V.2.8. Ensayo de herida.

Se sembraron $2,5 \cdot 10^5$ células por placa de 35 mm y se diferenciaron por 96 h con TGF- β 1. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS-1X y se les adicionó medio DMEM-F12 al 2% en SBF con bromo-deoxiuridina. Posteriormente se realizó los tratamientos con LDLox, TGF- β 1 y co-tratamiento. Inmediatamente con una punta amarilla se les realizó una herida y se le sacó fotos al tiempo cero y al tiempo final de 24 h a cada placa con una cámara asociada al microscopio óptico con contraste de fase con aumento de 10X y se determinó el tamaño de la herida a tiempo final e inicial. Y se calculó el porcentaje de cierre de la herida para cada placa.

V.2.9. Ensayo de geles de contracción.

Placas de 60 mm con 600000 células diferenciadas con TGF- β 1 por 96 h se les cambio medio y se estabilizaron por 18 h y se les trató por 24 h con LDLox. Terminado el tiempo de tratamiento las células fueron disgregadas por 5 min con 200 μ L de tripsina (0,25% v/v en PBS) y bloqueadas con 100 μ L de SBF. Posteriormente se centrifugaron las células a 3800 rcf por 5 min y el pellet celular se lavó dos veces con PBS-1X. Luego las células fueron resuspendidas en 0.8 mL de medio DMEM-F12 al 2%. En un tubo de polipropileno de 1.5 mL se colocó 0.4 mL de células, 0.2 mL de solución de colágeno 3 mg/mL en ácido acético al 0,1% y 6 μ L de NaOH 1M, posteriormente se mezcló por pipeteo y se colocó 0.5 mL de la solución de células en placas de 24 pocillos y se incubó por 30 min a 37°C. Posteriormente con una punta amarilla se soltaron suavemente los geles de la pared de cada pocillo y se incubaron por 48 h. Se midió el tamaño del gel al inicio y al final del tiempo y se determinó el porcentaje de contracción del gel.

V.2.10 Ensayo de detección de colágeno.

Los medios recién recolectados de los MFC tratados con LDLox por 24 y 72 h y sus respectivos controles sin tratamiento a cada tiempo fueron recolectadas (500 μ L) y se precipitaron las proteínas con dos volúmenes de sulfato de amonio al 50% P/V por 24 h a 4°C. Terminado ese tiempo las muestras fueron centrifugadas por 90 min a 4°C a 15800 rcf. Los pellets fueron resuspendidos en 900 μ L de

solución *sirius red* y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo las células se centrifugaron por 15800 rcf por 90 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos en 400 µL con solución de ácido acético 0,5M. En paralelo se realizará una curva de estándar de colágeno-1, haciendo diluciones seriadas a partir de una solución de 3 mg/mL. Las muestras y las curvas se midieron por absorbancia a 590 nm

V.2.11 Evaluación actividad MMP-2 y MMP-9.

Para la evaluación de la actividad metaloproteinasas los medios de los MFC tratados con LDLox por 24-96 horas y sus respectivos controles sin tratamiento a cada tiempo fueron recolectados, alicuotados y almacenados a -80°C. Para realizar el ensayo las muestras fueron preparadas con tampón de cargas sin agentes reductores. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida al 8% y se corrieron a 70 mV hasta la caída del frente. Posteriormente el gel fue sumergido en buffer de renaturalización por 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se lavó e incubó en buffer de desarrollo a 37°C por 24 h. Posteriormente se lavó 3 veces con agua y se tiñeron por 1 h, con solución de tinción. Terminado el tiempo los geles se lavaron con agua destilada hasta visualizar claramente la digestión del gel y se capturaron las imágenes. Posteriormente las bandas se cuantificaron con el programa UN-SCAN-IT 6.0.

V.2.12. Silenciamiento de LOX-1, CAV1 y FOXO-1.

Placas con 2×10^5 diferenciadas por 90 h, fueron lavadas dos veces con PBS-1X. Luego se les adicionó 250 µL de medio Opti-MEM y se dejaron incubando a 37°C. Luego se preparó una mezcla de reacción A en tubos de polipropileno de 1.5 mL a la cual se le adicionó 0,5 µL de siRNA-1+0.5 µL de siRNA-2+ 150 µL de Opti-MEM. Adicionalmente se preparó una segunda mezcla de reacción, denominada B, en tubos de propileno de 1.5 mL la que se preparó con 125 µL de Opti-MEM + 7.5 µL de solución RNAiMAX y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla A se le adicionó suavemente a la mezcla B y se esperó por 5 min. Finalmente, esta nueva mezcla fue adicionada a cada placa y se incubó las células tratadas por 18 h a 37°C. Posterior a esto se hicieron los estímulos con LDLox y el co-tratamiento y se esperó 24 h.

V.2.13. Ensayo de citotoxicidad en MFC.

El ensayo de toxicidad se realizó tratando por 96 h 2×10^5 células cultivadas en placas de 35 mm con LDLox (10-80 µg/mL); Procianidina C1 (10-1000 ng/mL), Lovastatina (1,25-10 µg/mL). Como control se usó células sin tratamiento. Posteriormente se lavaron, tripsinizaron y contaron células vivas/muertas mezclando 10 µL de azul de Tripán con 10 µL de la solución de células. Las células fueron observadas por microscopía óptica de contraste de fase y contadas en cámara de Neubauer.

V.2.14. Inhibición del receptor LOX-1 con lovastatina y procianidina C1.

Con el fin de evaluar si el efecto pro-fibrótico del LDLox es vía el receptor LOX-1, se evaluó la inhibición del receptor LOX-1 con los dos inhibidores conocidos y de venta comercial: lovastatina con un IC_{50} de 2 µM (Biocca y cols. 2015) y con Procianidinas-C1 con un IC_{50} de 49 µg/mL. Para esto se incubó 2×10^5 MFC con la concentración de ambos inhibidores de LOX-1 descrita anteriormente por 30 min. Posteriormente se trató las células con LDLox (10 µg/mL) por 24 y 72 h. Finalmente se determinó por western blot los niveles de COL-I, α -SMA y FN-EDA

V.2.15. Inhibición de la vía canónica de LOX-1 con apocinina.

El efecto de la inhibición de la vía canónica del receptor LOX-1 en la señalización pro-fibrótica de LDLox fue evaluada inhibiendo con apocinina la NOX-2. Para esto se incubó 2×10^5 MFC con $40 \mu\text{M}$ de apocinina (IC_{50} : $10 \mu\text{M}$) por 30 min. Posteriormente se trató las células con LDLox ($10 \mu\text{g/ml}$) por 24 y 72 h. Finalmente se determinaron por western blot los niveles de COL-I, α -SMA y FN-EDA

V.2.16. Curva dosis respuesta de TGF- β 1 en MFC.

Los MFC estabilizados por 24 h con medio DMEM-F12 al 2%, fueron tratados con TGF- β 1 a 0, 2.5, 5, 10 y $20 \mu\text{g/mL}$ por 24 h y posteriormente se extrajeron proteínas y se realizaron *western blot* para medir parámetros fibróticos.

V.2.17. Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como promedio \pm error estándar (SEM). Con el fin de determinar la existencia o no de diferencia significativa entre los grupos estudiados se utilizó t-test, ANOVA de una vía (con post test de Dunnet) o ANOVA de 2 vías (con post test de Bonferroni). Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$ y se utilizó el programa GraphPad Prism 6.

VI. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados para cada uno de los objetivos específicos propuestos en esta tesis.

VI.1 Determinar el efecto pro-fibrótico de LDLox en MFC de rata adulta.

VI.1.1 Viabilidad de MFC tratados con LDLox.

Con el fin de determinar la concentración de LDLox que no induzca muerte, se trataron los MFC con 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de esta lipoproteína por 96 h, que corresponde al tiempo máximo de estímulo que se planteó en esta investigación. Terminado el tiempo las células se tiñeron con azul de Tripán, se contó el número de células muertas (de color azul), totales y se calculó el % de células muertas para cada grupo experimental. Como se puede observar en la **Figura 8**, solo la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no fue tóxica para las células al tiempo evaluado. La interrogante que surgió es si esta cantidad de LDLox puede activar la vía canónica de este receptor LOX-1 en MFC de rata adulta.

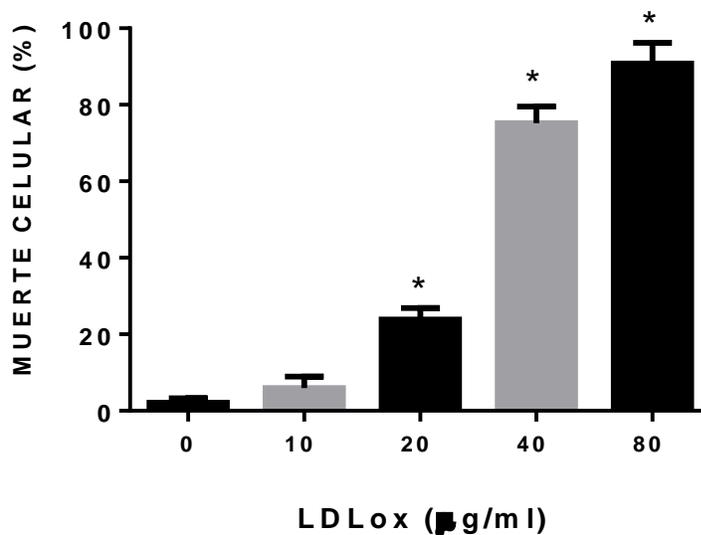


Figura 8. Viabilidad de MFC tratados por 96 h con LDLox. MFC de rata adulta se trataron con 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox por 96 h y luego se realizó el ensayo con azul de Tripán. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, post test de Dunnet, se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. (*) indica diferencia significativa entre el grupo tratado y el control no estimulado. (n=5 para cada grupo experimental)

VI.1.2 Activación de NOX-2 en MFC tratados con LDLox.

La vía clásica de señalización de LDLox a través de su receptor LOX-1 activa la enzima NOX-2. Esta activación produce la fosforilación de una de sus subunidades y se cuantifica como la razón entre p47 fosforilada y p47 total ($p47^{\text{Phos}}/p47^{\text{total}}$). Debido a que en esta tesis se trabajó con una concentración baja de LDLox (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y que resultados previos de nuestro laboratorio indicaban que era la mínima concentración necesaria para activar esta vía, se propuso corroborar la activación de NOX-2 por LDLox

10 µg/mL. Los tiempos que se usaron para evaluar la fosforilación de la subunidad p47 fueron 0, 15, 30, 60, 180 min y se compararon con los niveles basales (tiempo cero) de MFC sin tratar. El resultado se de la **Figura 9** muestra que la activación de NOX-2 por LDLox ocurre a partir de los 60 min.

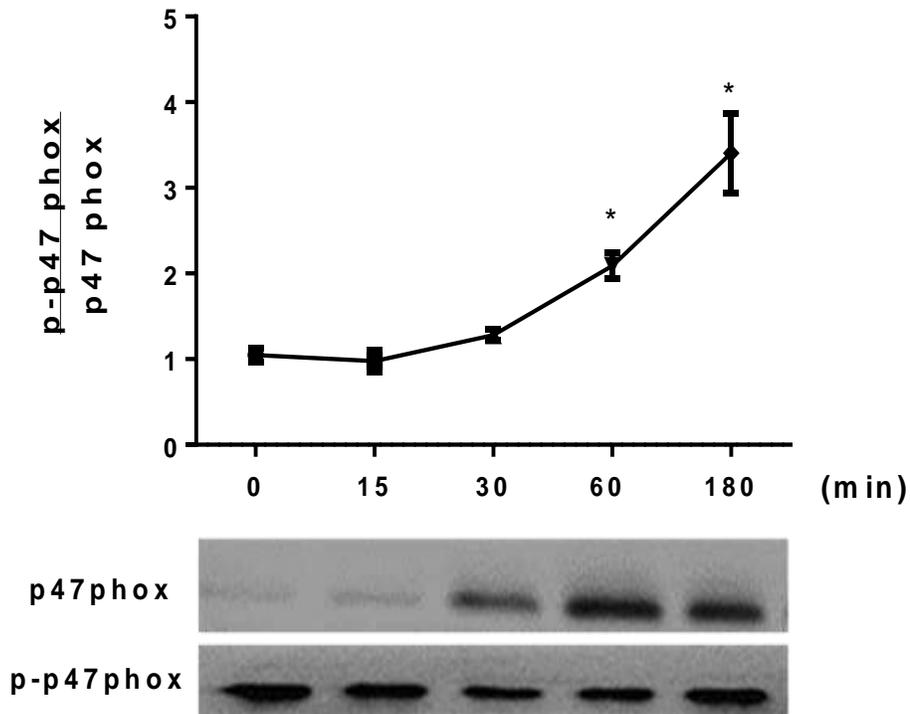


Figura 9. Cinética de activación de NOX-2 ($p47^{Fosf}/p47^{total}$) en MFC tratados con LDLox. Los MFC fueron tratados por 0, 15, 30, 60, 180 min. EL gráfico muestra la razón de $p47^{Fosf}/p47^{total}$ en el tiempo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, con post test de Dunnet. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. (*) indica diferencia significativa entre MFC a tiempo cero y el tratamiento indicado en el gráfico. (n=4 para cada grupo experimental)

VI.1.3 El tratamiento de MFC con LDLox aumenta los niveles de LOX-1.

Adicionalmente, se evaluó si el tratamiento con LDLox 10 µg/mL induce aumento de los niveles del receptor LOX-1 tal como ha sido reportado en células endoteliales (**Figura 10**)¹⁴³. Lo que se observó es que a 24 y 48 h la lipoproteína indujo significativamente el aumento de los niveles de su propio receptor comparado con sus respectivos controles sin tratamiento. Esta inducción no se mantuvo a los tiempos de 72 y 96 h.

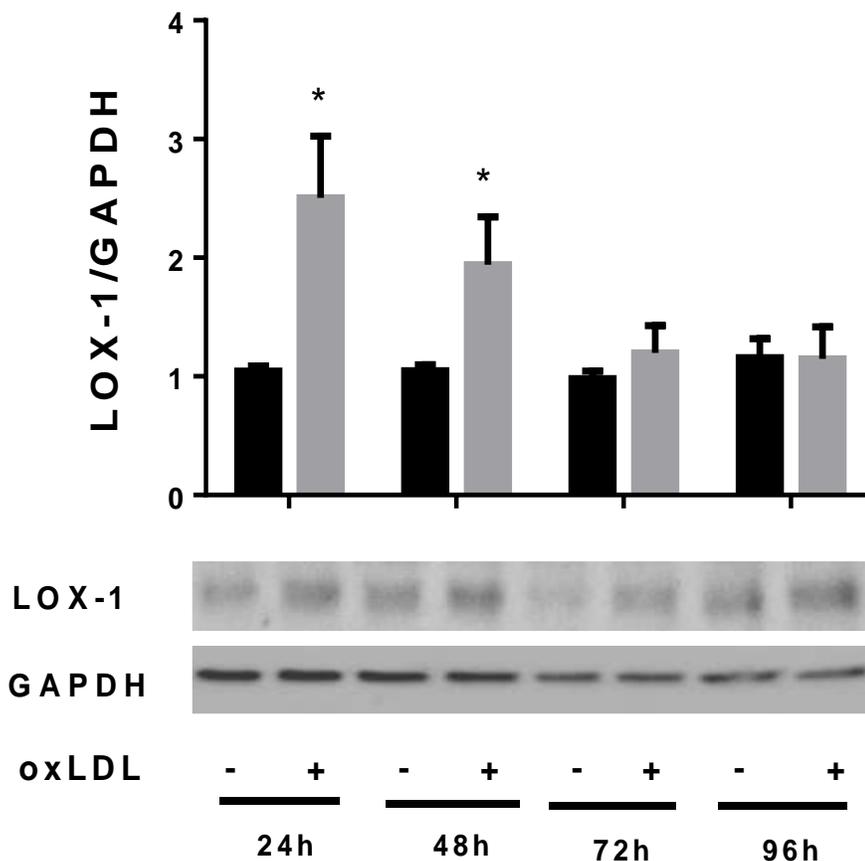


Figura 10. El tratamiento con LDLox aumenta los niveles de LOX-1 en MFC. Se muestra los niveles de LOX-1 normalizados por GAPDH y su *western blot* representativo a las 24, 48, 72 Y 96 h. Las barras negras corresponden a los controles sin tratamiento y en gris las células tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox. Análisis estadístico: t-test para cada tiempo y se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento. (n=4 para cada grupo experimental)

VI.1.4 Evaluación de los niveles de marcadores pro-fibróticos en MFC.

Con el fin de determinar si el tratamiento de LDLox producía un efecto pro-fibrótico en MFC, se evaluaron los niveles de tres proteínas que se encuentran elevadas en fibrosis cardíaca: α -SMA (marcador de MFC), COL-I (proteína de MEC) y FN-EDA (proteína de MEC). Para esto se incubaron MFC estabilizados por 18 h con medio DMEM-F12 al 2%, con LDLox a concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y su respectivo control sin tratamiento por 0, 24, 48, 72 y 96 h.

Como se observa en la **Figura 11** los niveles de α -SMA no variaron a ninguno de los tiempos evaluados, es decir, estas células siguen siendo MFC posterior a los tratamientos con LDLox. Aunque como se puede observar en la **Figura 19**, la morfología de los MFC es significativamente más pequeña tanto a 24 como a 72 h post-tratamiento.

El efecto del tratamiento de LDLox sobre los niveles de proteínas de MEC (COL-I y FN-EDA) se muestran en la **Figura 12** y en la **Figura 13**. Ambas proteínas son producidas principalmente por los miofibroblastos durante procesos fibróticos y se acumulan en los sitios de fibrosis. Lo que se puede observar es que el tratamiento aumentó los niveles de COL-I, tanto a las 24, 48 y 72 h posterior al estímulo. En el caso de FN-EDA (**Figura 13**), que ha sido descrita como esencial en el proceso de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos se observó que sus niveles solo se encontraron significativamente elevados a las 72 y 96 h posterior al estímulo con LDLox. En resumen, si bien LDLox es capaz de aumentar los niveles de ambas proteínas en estas células, la temporalidad en la que se pudo observar estos cambios es distinta, posiblemente porque las vías de señales que regulan su expresión y/o degradación son distintas.

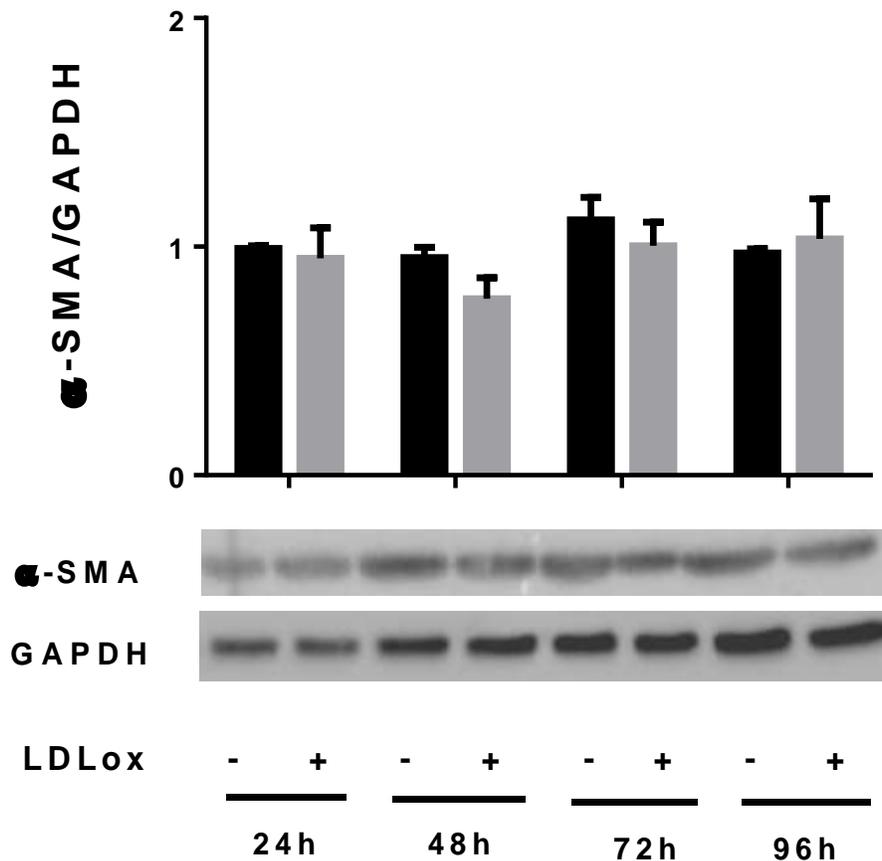


Figura 11. El tratamiento con LDLox no tiene efecto en los niveles de α-SMA. Se muestra los niveles de α-SMA normalizados contra GAPDH y su *western blot* representativo a las 24, 48, 72 Y 96 h. En todos los tiempos se usó como control una muestra de MFC sin estimular con el fin de saber los niveles basales α-SMA a cada tiempo evaluado. Análisis estadístico: t-test para cada tiempo. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento. (n=4 para cada grupo experimental)

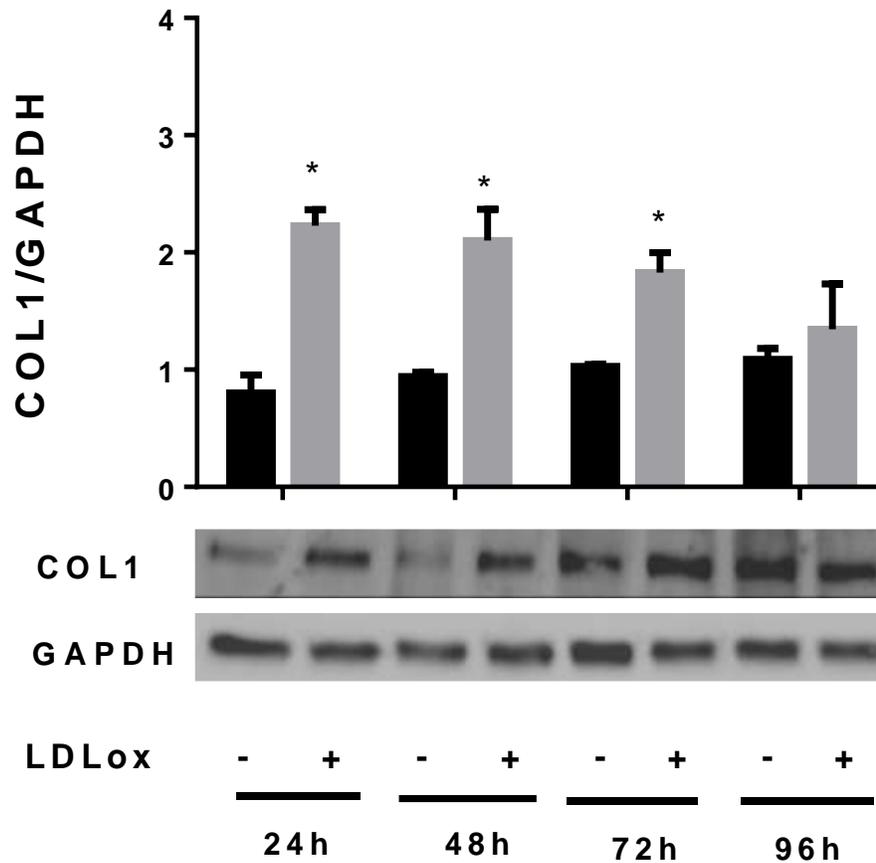


Figura 12. MFC estimulados con LDLox aumentan los niveles de COL1 hasta las 72 h post-tratamiento. Se muestra los niveles de COL-I normalizados por GAPDH y su *western blot* representativo a las 24, 48, 72 Y 96 h. En todos los tiempos se usó como control una muestra de MFC sin estimular con el fin de saber los niveles basales COL-I a cada tiempo evaluado. Análisis estadístico: t-test para cada tiempo. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento. (n=5 para cada grupo experimental)

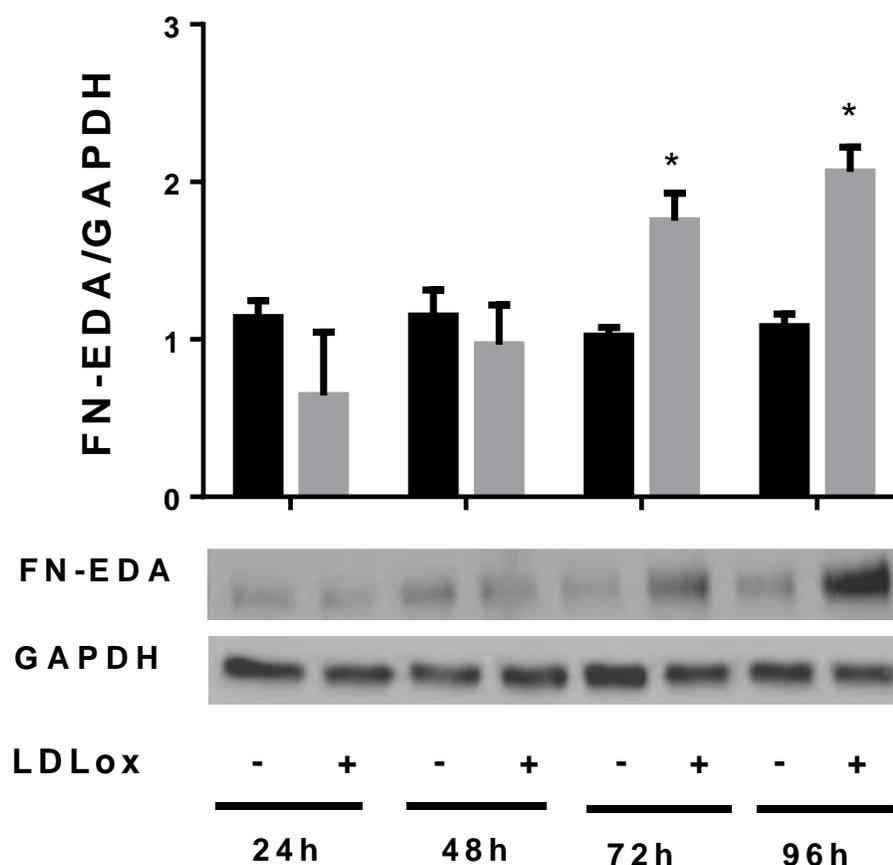


Figura 13. Los niveles de FN-EDA aumentan en MFC a las 72 y 96 h posterior al tratamiento con LDLox. Se muestra los niveles de FN-EDA normalizados contra GAPDH y su *western blot* representativo a las 24, 48, 72 Y 96 h. En todos los tiempos se usó como control una muestra de MFC sin estimular con el fin de saber los niveles basales FN-EDA a cada tiempo evaluado. Análisis estadístico: t-test para cada tiempo. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento. (n=5 para cada grupo experimental)

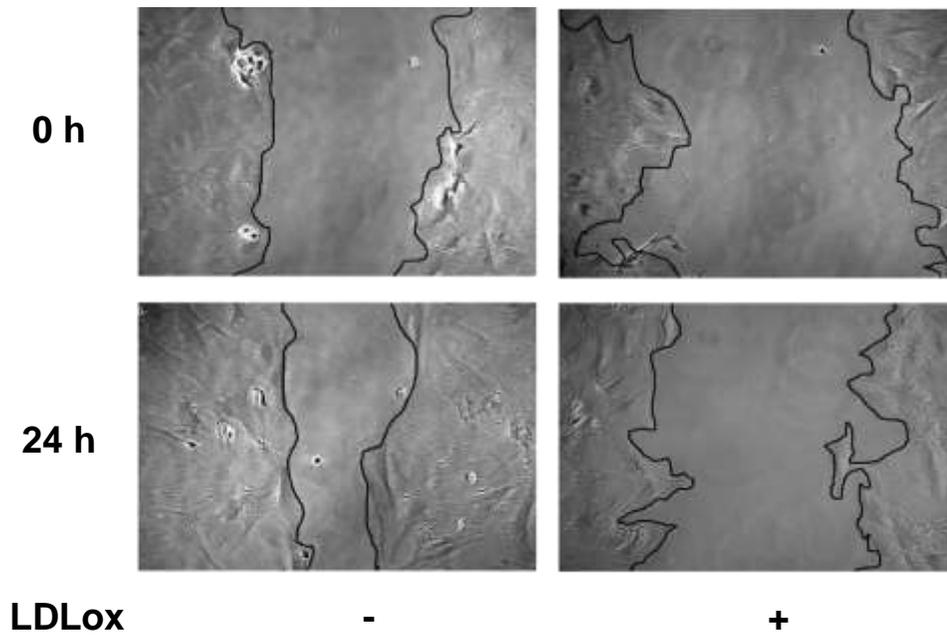
VI.1.5 Evaluación de parámetros funcionales en MFC tratados con LDLox.

Debido a que los MFC tratados con LDLox aumentaron los niveles de COL-I y FN-EDA, se consideró importante evaluar algunos parámetros funcionales como migración, contracción, proliferación, actividad MMP y secreción de colágeno en estas células.

VI.1.5.1 Ensayo de migración por herida.

El primer ensayo funcional que se realizó fue el ensayo de migración. Para esto los MFC de rata adulta se cultivaron a confluencia y se les cambio medio. Al día siguiente las células se trataron con LDLox por 24 h (como control se usaron células sin tratamiento). Posteriormente se les realizó una herida y se les cambio medio al 2% en suero con bromodeoxiuridina para evitar la proliferación. Inmediatamente se obtuvieron imágenes a tiempo cero a las cuales se les determinó el área de la herida. Luego de 24 horas se sacaron nuevamente fotos a las heridas y se les cuantificó.

A



B

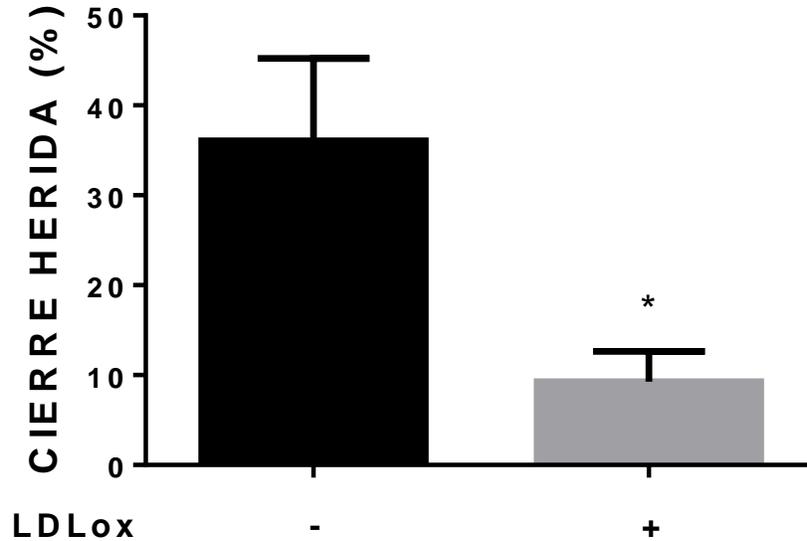


Figura 14. MFC tratados con LDLox disminuyen su capacidad de migración. A: Imagen representativa del ensayo de herida de los MFC cultivados a confluencia y tratados con LDLox por 24 h previo a la realización de la herida. Como control negativo se utilizaron células sin tratar. Para evitar la proliferación ambas condiciones se realizaron en presencia de bromodeoxiuridina. **B:** Gráfico del porcentaje de cierre de herida en cada una de las condiciones anteriormente señaladas. Análisis estadístico: t-test. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento. (n=5 para cada grupo experimental)

Los resultados presentados en la **Figura 14**, muestran que los MFC tratados por 24 h con LDLox presentan menor capacidad de migración que las células controles (aproximadamente 10% v/s 40%, respectivamente). Esto se puede correlacionar con los niveles de proteína de la MEC, las células para migrar necesitan degradar la MEC, si estas células aumentan los niveles de COL-1 y FN-EDA podría ser la explicación de por qué las células tratadas con LDLox migran menos.

VI.1.5.2 Ensayo de contracción.

El segundo parámetro funcional determinado fue la capacidad de contracción de los MFC de rata adulta embebidos en geles de colágeno. Para esto MFC de rata adulta fueron tratados con LDLox por 24 h, con su respectivo control sin tratamiento. Luego de terminado el tiempo estas células se mezclaron con el colágeno y se incubaron por 48 h en medio DMEM-F12 al 2%, a 37°C al 5% de CO₂ en placas de 24 pocillos. Se midió el diámetro de gel al tiempo final de 48 h y se graficó como la razón: diámetro de los MFC tratados con LDLox/diámetro del control sin tratamiento. En la **Figura 15** se observa que el tratamiento de los MFC por 24 h con LDLox, disminuyó significativamente la capacidad contráctil de los MFC, lo que visualiza como un mayor diámetro del gel en el que se encuentran embebidos los MFC tratados con LDLox. Esto puede relacionarse directamente con el hecho de que si bien en estas células se ven las fibras de estrés producidas por la expresión de α -SMA, al ser de menor tamaño las células tratadas con LDLox (**Figura 19**), estas probablemente son menos contráctiles.

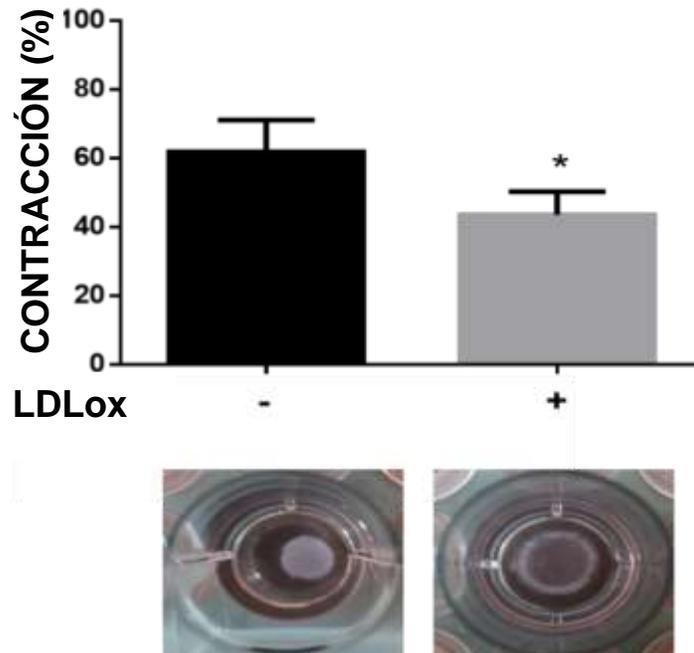


Figura 15. El tratamiento con LDLox disminuye la capacidad contráctil de MFC de rata adulta. Los MFC de rata adulta fueron tratados por 24 h con LDLox y luego mezclados e incubados con colágeno de cola de rata por 48 h en medio DMEM-F12 al 2% en SBF. El % de contracción corresponde a la razón entre el diámetro del gel de los MFC tratados con LDLox y el diámetro de los MFC sin tratamiento. Análisis estadístico: t-test. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento. (n=5 para cada grupo experimental)

VI.1.5.3 Proliferación de MFC.

El tercer parámetro funcional que se determinó fue la capacidad de proliferación de los MFC tratados con LDLox. Existen antecedentes que los macrófagos tratados con bajas concentraciones de LDLox aumentan su capacidad de proliferación¹⁴⁴. Para evaluar si el tratamiento con LDLox puede regular la proliferación en este tipo celular se utilizaron tres ensayos: conteo celular, MTT y Ki67. Se evaluó la capacidad de proliferación a las 72 h posterior al tratamiento.

En la **Figura 16A**, se observa que el tratamiento con LDLox aumentó significativamente el número de células comparado con el control sin estimular. Con el fin de reafirmar este resultado se utilizó un ensayo indirecto para evaluar proliferación celular. Este se basa en que las células que proliferan son metabólicamente activas y pueden convertir rápidamente el MTT en formazán, que es un producto coloreado que se determina por absorbancia a 590 nm. En la **Figura 16B**, se observa que las células tratadas con LDLox aumentaron significativamente la proliferación.

El tercer método que se usó para confirmar que las células proliferan en presencia del estímulo con LDLox fue la inmunofluorescencia de los MFC contra la proteína usada como marcador de proliferación celular Ki67, esta proteína se encuentra ausente en células en arresto celular. Como se puede observar en la **Figura 16C**, prácticamente en el control sin estímulo no se observan células Ki67 positivas, sin embargo, los MFC tratados con LDLox presentan un aumento en la marca positiva de Ki67 y por lo tanto confirma que el tratamiento con LDLox, estimula la proliferación de MFC. Este resultado podría explicar un mecanismo mediante el cual los MFC persisten posterior a la reparación de un daño en el corazón.

VI.1.5.4 Actividad de MMP-2 y MMP-9 en medios de cultivo de MFC tratados con LDLox.

Según datos de literatura las MMPs son enzimas capaces de degradar una serie de proteínas de la MEC y son claves en el proceso fibrótico⁸⁹. Algunas como la MMP-2 (gelatinasa A) se les ha descrito una actividad anti-fibrótica¹⁴⁵. Por el contrario, otras como la MMP-9 (gelatinasa B) se les confiere una actividad pro-fibrótica que se asocia a una disminución en la contractilidad celular. Ambas enzimas son secretadas por fibroblastos cardíacos^{146,147}

Debido a que se observó un efecto en la inhibición de la capacidad contráctil de MFC tratados con LDLox (**Figura. 17**), se evaluó por zimografías la actividad gelatinasa de las MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de los MFC tratados con LDLox por 0, 24, 48, 72 y 96 h y sus respectivos controles a casa tiempo. Tanto los niveles de proMMP-2 como MMP-2 activa y proMMP-9 aumentaron en el tiempo tanto en los MFC tratados con LDLox y los sin tratar. Sin embargo, los niveles de proMMP-9 aumentaron en forma más marcada en los medios de los MFC tratados por 48 y 72 h con LDLox.

VI. 1.5.5 Secreción de colágeno en medio extracelular.

La fibrosis cardíaca se caracteriza por una acumulación excesiva de colágeno en el corazón. Como se observa en la **Figura 12**, los MFC tratados con LDLox aumentaron los niveles de COL-I hasta las 72 h posterior al estímulo. Pero queda la interrogante si dicho aumento se relaciona

directamente con los niveles de secreción de esta proteína. Para responder esta pregunta, se recolectaron los medios de las células tratadas 24 y 72 h y se determinó por ensayo colorimétrico los niveles de colágeno. Como se puede observar en la **Figura 18**, el tratamiento con LDLox aumenta significativamente los niveles de colágeno extracelular en los medios de cultivo de los MFC tratados por 24 y 72 h en comparación con su control sin tratamiento.

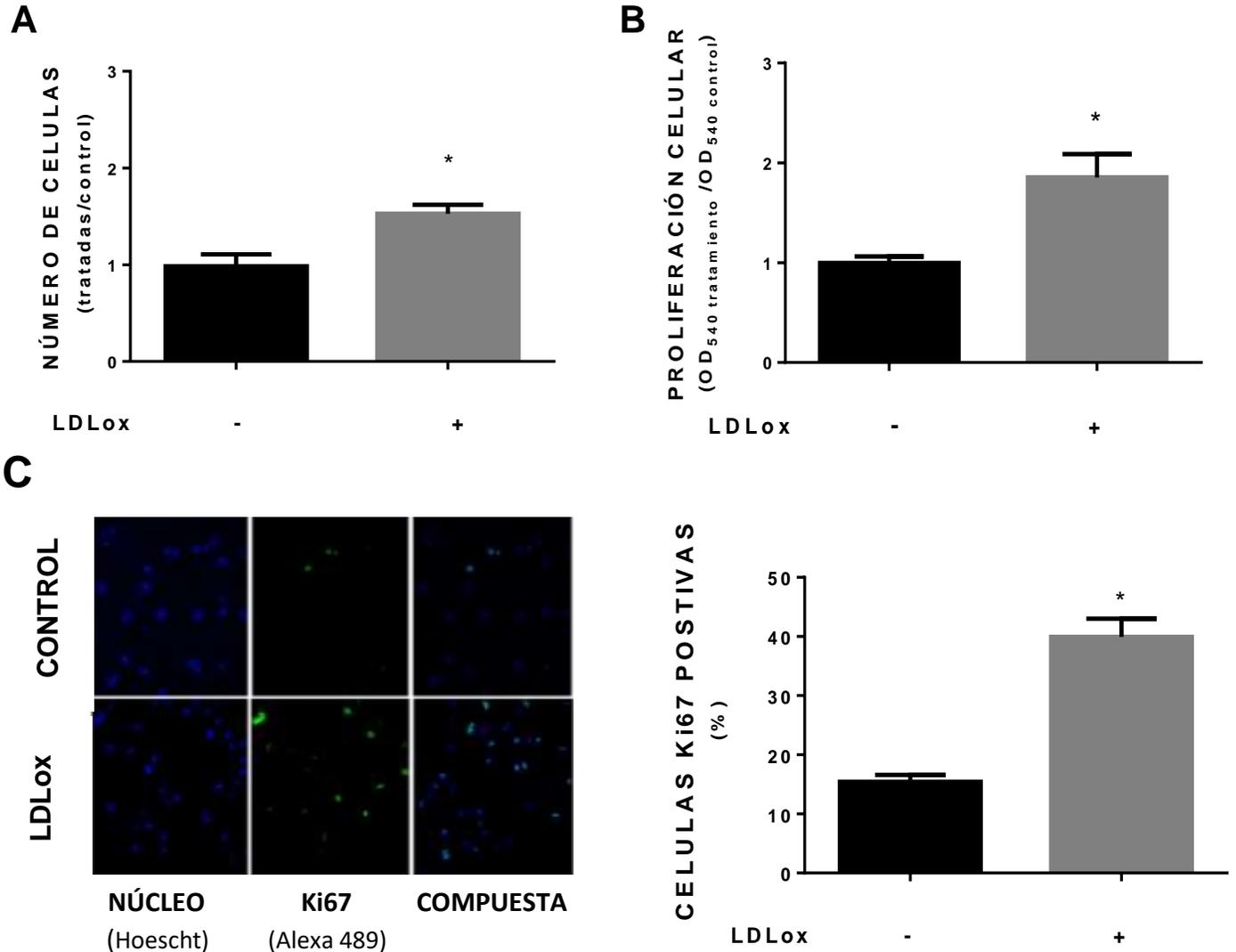


Figura 16. Inducción de la proliferación de MFC tratados con LDLox. Los MFC de rata adulta fueron tratados con LDLox por 72 h en presencia de DMEM-F12 al 5%. **A:** Conteo celular, placas de 35 mm con 2×10^5 células fueron tratadas con LDLox por 72 h. Luego se contaron células por cámara neubauer y se graficó la razón entre las células tratadas y las células control; **B:** Ensayo por MTT se realizó en placa de 12 pocillos, la absorbancia se determinó a 590 nm, se graficó la razón absorbancia del tratamiento por la del control; **C:** Imagen representativa de inmunofluorescencia de Ki67 (marcador de proliferación), 3×10^4 MFC se cultivaron sobre cubreobjetos en placas de 12 pocillos y se trataron con LDLox. Las células fueron fijadas con PFA al 4%, permeabilizadas con tritón al 0,1% en PBS, bloqueadas con BSA al 5% y marcadas con el anticuerpo Ki67-rabbit en asociación con anticuerpo secundario Alexa 489 (verde), los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul) por 5 min. La imagen compuesta muestra la sobreposición de la marca verde y azul. El gráfico de la figura C, muestra el porcentaje de células Ki67 positivas en ambos tratamientos en relación con el total de células contadas. Análisis estadístico: t-test. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento. (n=5 para cada grupo experimental)

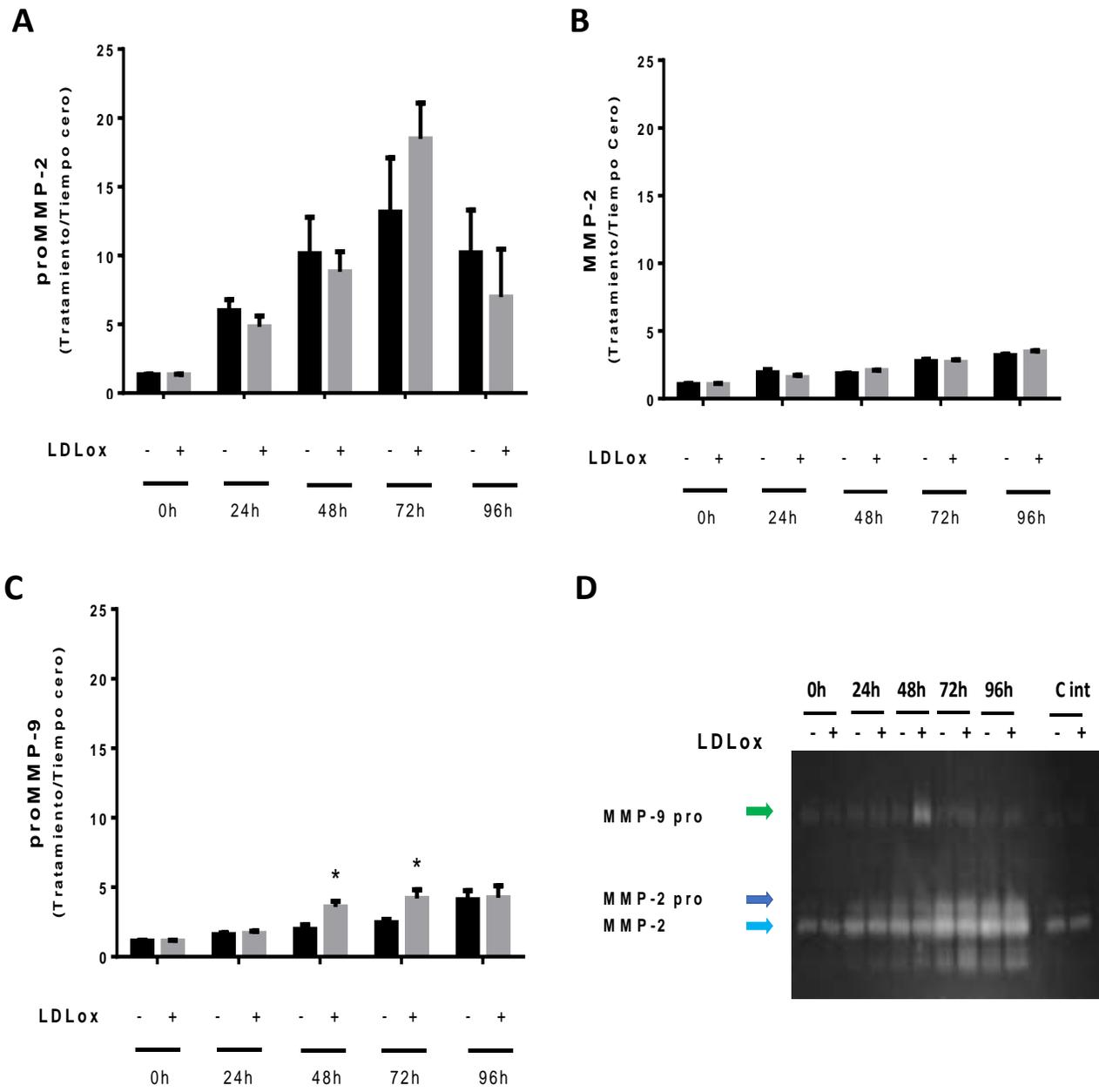


Figura 17. Actividad de la MMP-2 pro, MMP-2 activa y MMP-9 pro en los medios de cultivo de MFC de rata adulta tratados a distintos tiempos con LDLox. La actividad de las metaloproteinasas se realizó por zimografía en geles de gelatina, según lo descrito en la sección Metodología. Las MMPs de cada muestra se normalizaron a un único control interno cargado en cada gel y posteriormente se relativizó por el promedio del control a tiempo 0 de cada experimento. A: MMP-2 pro; B: MMP-2 activa; C: MMP-9 y en D: Gel de zimografía representativo teñido con Azul de Comassie. Los análisis estadísticos fueron realizados con ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento a cada tiempo. (n=5 para cada grupo experimental)

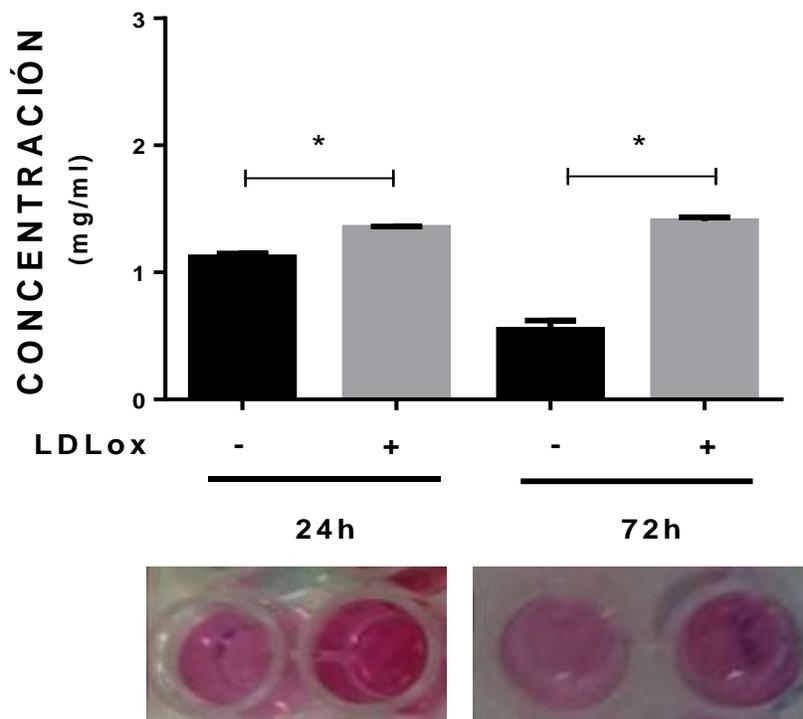


Figura 18. Aumento de la secreción de colágeno en MFC de rata adulta tratados con LDLox por 24 y 72 h. El contenido de colágeno secretado por los MFC de rata adulta tratados por 24 y 72 h con LDLox se cuantificó siguiendo el protocolo descrito en la sección Metodología. Análisis estadístico: t-test. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento a cada tiempo. (n=5 para cada grupo experimental)

VI.1.6 Morfología de los MFC tratados con LDLox.

Debido a los cambios funcionales observados en los MFC tratados con LDLox, se planteó analizar si existen cambios morfológicos por el tratamiento con lipoproteínas de baja densidad altamente oxidadas en estas células. En la **Figura 19**, se observa que las células que fueron tratadas con LDLox por 24 y 72 h presentaron aproximadamente la mitad del área promedio que la de las células. Estos resultados mostraron que el cambio funcional observado a nivel de contracción, proliferación, síntesis de MMP-9 y secreción de colágeno en MFC tratados con LDLox se asoció con un cambio en la morfología característica de estas células.

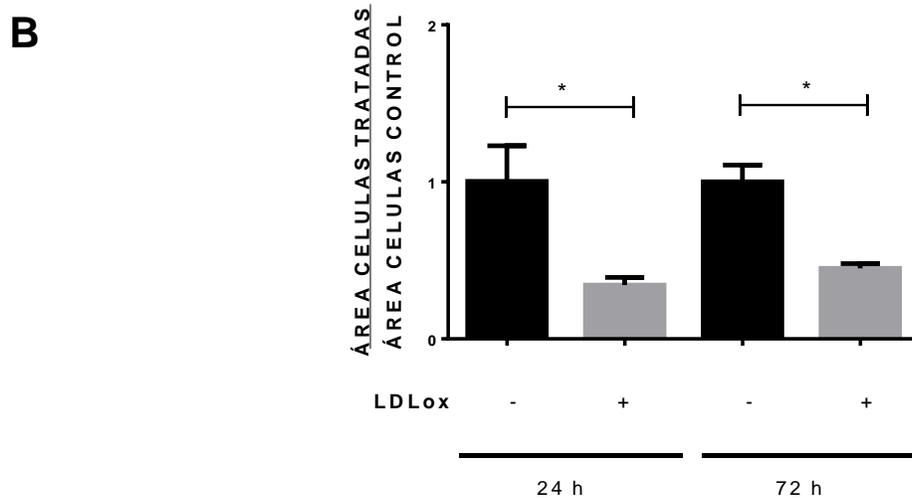
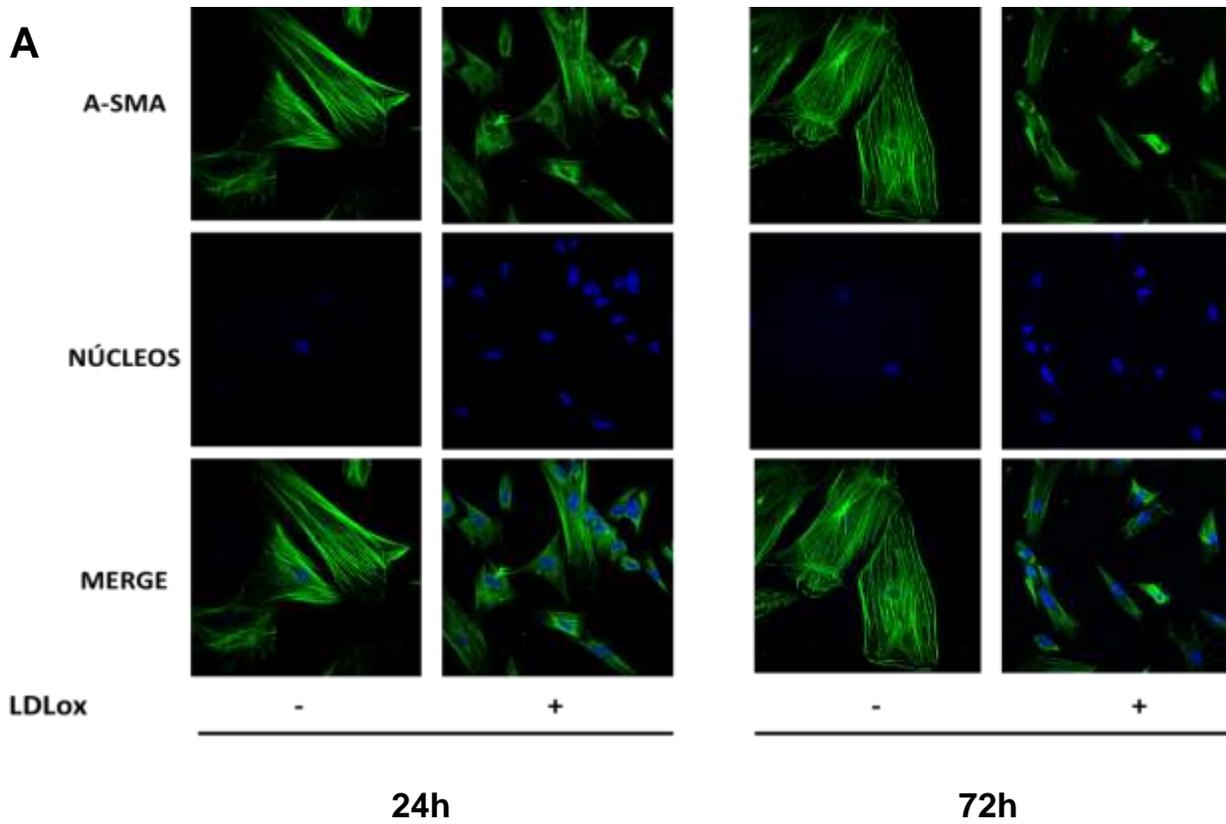


Figura 19. El tratamiento de MFC con LDLox induce cambios en la morfología y tamaño de los MFC. **A:** Inmunofluorescencia de MFC tratados por 24 y 72 h con LDLox 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un aumento final de 20X. **B:** El gráfico representa la razón del área de las células tratadas en relación con su control sin tratamiento a cada uno de los tiempos evaluados (para cada tratamiento y tiempo se determinó el área de al menos 50 células con el programa ImageJ. Análisis estadístico: t-test. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento a cada tiempo. (n=5 para cada grupo experimental)

VI.1.7 Niveles de COL-I, FN-EDA y LOX-1 en corazón de ratones sometidos por 5 meses en dieta alta en grasa.

Para realizar una prueba de conceptos se evaluaron los niveles de proteínas de matriz extracelular y el receptor LOX-1 en corazones de ratones alimentados por 5 meses con una dieta alta en grasa. Se ha descrito que esta dieta aumenta los niveles de colesterol y de LDLox en el plasma de estos ratones y según nuestros resultados esto debería aumentar los niveles de LOX-1 en estos corazones. En la **Figura 20**, se observa que los ratones alimentados con una dieta alta en grasa aumentan los niveles del receptor LOX-1 en el corazón, al igual que los niveles de COL-I y FN-EDA.

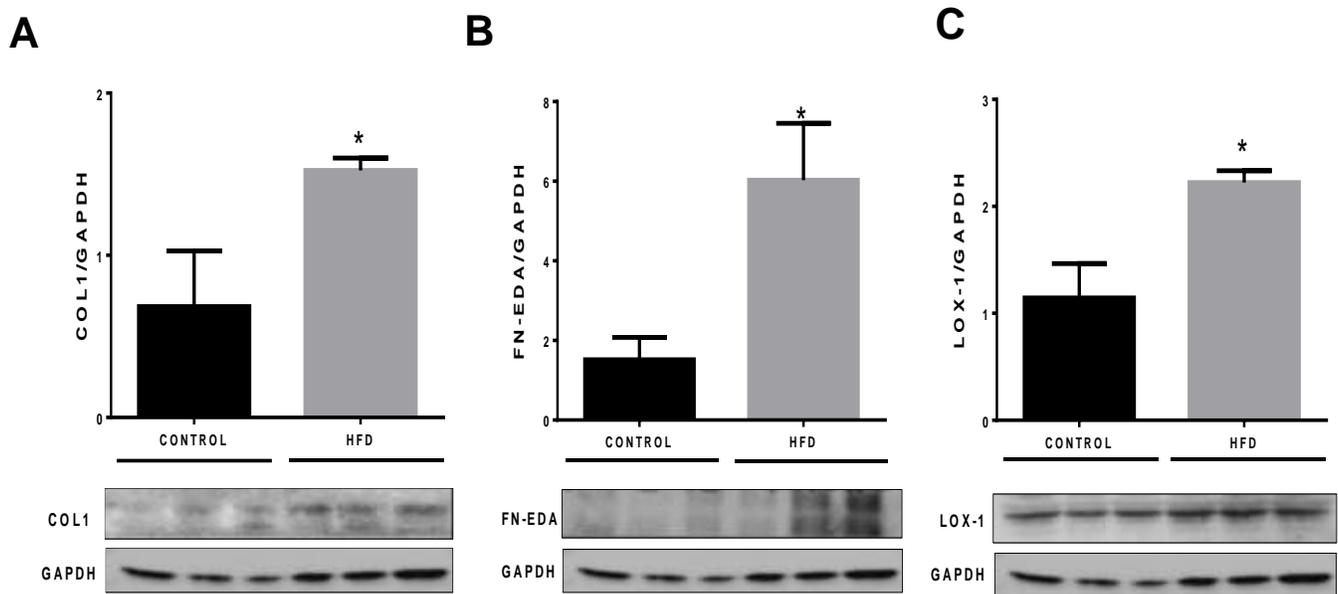


Figura 20. Aumento de los niveles de COL-I, FN-EDA y LOX-1 en corazones de ratones alimentados con dieta alta en grasa. Los corazones de ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) por 5 meses (n=3) y su respectivo grupo control (n=3) fueron homogenizados en amortiguador RIPA y se extrajeron proteínas totales. Se realizó un SDS-PAGE y posterior electrotransferencia e inmunodetección. **A:** Niveles de COL-I en corazones de ratones HFD comparados con el control. **B:** Niveles de FN-EDA en corazones de ratones HFD comparados con el control. **C:** Niveles de LOX-1 en corazones de ratones HFD comparados con el control. Análisis estadístico: t-test. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el grupo control y el grupo HFD. (n=3 para cada grupo experimental)

VI. 2. Analizar si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente del receptor LOX-1

VI.2.1 Efecto del silenciamiento del receptor LOX-1 en la señal pro-fibrótica de LDLox.

Con el fin de determinar si el efecto pro-fibrótico del LDLox es dependiente del receptor LOX-1. Se silenció el receptor con siRNA del receptor de LOX-1 y se estimuló con LDLox por 24 h.

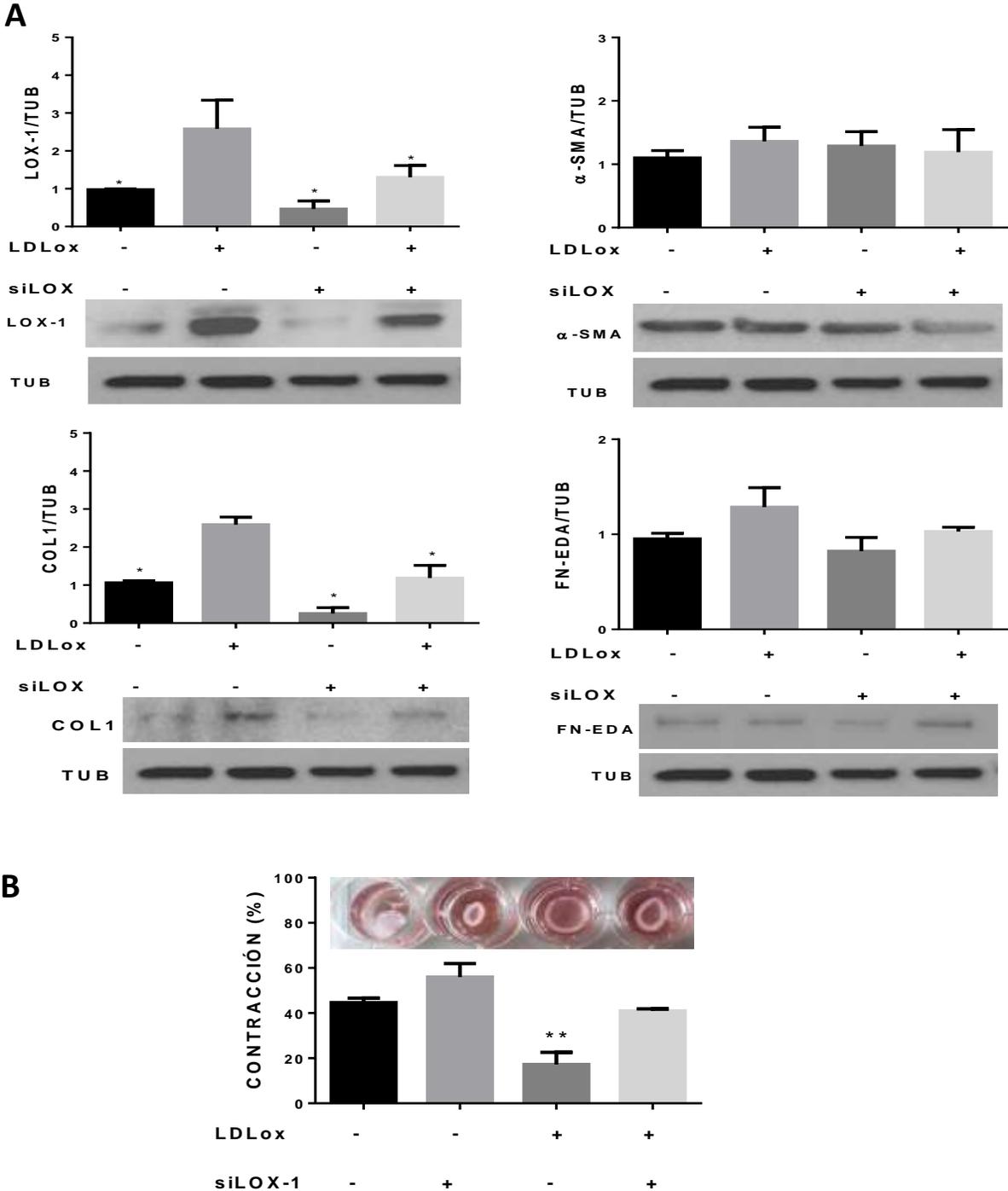


Figura 21. Dependencia de LOX-1 en la señal pro-fibrótica de LDLox en MFC de rata adulta. MFC de rata adulta fueron silenciados con siRNA de LOX-1 por 18 h. Como control se usaron células sin tratamiento y control tratado solo con lipofectamina (no se muestra en la figura). Los MFC control y siLOX-1 fueron tratados por 24 h con LDLox (10 μ g/mL). **A:** En los gráficos se presentan los niveles de α -SMA, LOX-1, COL-1 y FN-EDA determinados por *western blot* a partir de las proteínas totales extraídas de MFC sometidos a los distintos tratamientos mencionados. **B:** Efecto del silenciamiento de LOX-1 sobre la capacidad contractil de los MFC tratados con LDLox por 24 h y embebidas en geles de colágeno-1 por 48 h. Para cada condición se midió el diámetro de gel y relativizó por el diámetro de control sin tratamiento. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías conpost test de Bonferoni. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el grupo sin tratamiento y los tratados. (n=4 para cada grupo experimental)

Posteriormente se observó el efecto en los niveles de α -SMA, COL1 y FN (**Figura 21.A**). Además del efecto en el parámetro funcional de la contracción celular (**Figura 21.B**). Como se observa los MFC tratados con LDLox por 24 h aumentaron los niveles de COL-I y LOX-1 y disminuyeron la contractilidad de las células. Pero esto no afecta a los niveles de α -SMA y FN-EDA. Además, los MFC-siLOX1 disminuyeron significativamente los niveles de COL-I a las 24 h, pero no los niveles de α -SMA y FN-EDA. Los MFC-siLOX-1 tratados con LDLox no muestran el característico aumento de COL-I y no se observó la disminución de la contractilidad observada en MFC tratados con LDLox.

VI.2.2 El efecto pro-fibrótico de la vía LDLox/LOX-1 es dependiente de la actividad de las NOXs.

La vía canónica del receptor LOX-1 activa NOX-2 con la consecuente producción de ROS en macrófagos y en células endoteliales. En la **Figura 11** se demostró que existe activación de esta vía a tiempos tempranos, ya que LDLox induce la fosforilación de la subunidad p47 de NOX-2). Adicionalmente resultados previos del laboratorio muestran que MFC tratados con LDLox aumentan la producción de ROS. Por lo que se planteó demostrar si esta vía está implicada en los efectos pro-fibróticos de LDLox en MFC, para ellos estas células fueron tratadas con apocinina (40 μ M) por 1 h previo al tratamiento con LDLox por 24 h. La apocinina es un inhibidor de las NADPH oxidasas y a su vez un potente anti-oxidante. En la **Figura 22**, se puede observar que el tratamiento de MFC con LDLox aumenta los niveles de COL-I y LOX-1 y que la apocinina inhibe este efecto. Los niveles de α -SMA permanecen constantes al igual que los de FN a las 24 h.

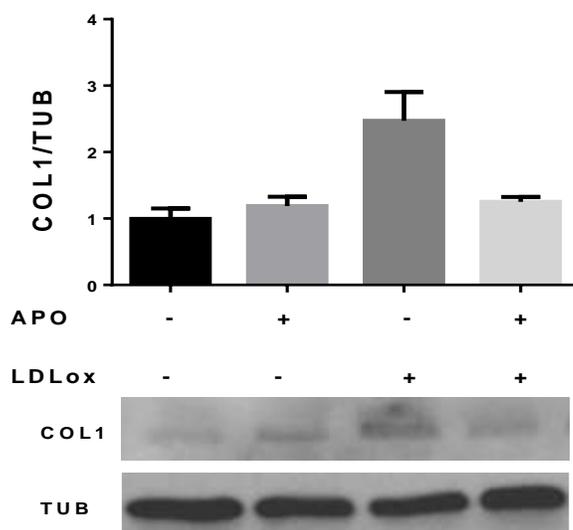


Figura 22. Apocinina inhibe el efecto pro-fibrótico de LDLox en MFC. Los MFC de rata adulta fueron pretratados por 30 min con apocinina y posteriormente se adicionó LDLox y se incubaron por 24 h. Se evaluaron los niveles de α -SMA, LOX-1, FN-EDA y COL-I por *western blot*. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con post test de Bonferoni. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el grupo sin tratamiento y los tratados. (n=4 para cada grupo experimental).

VI.3 Determinar si el uso de inhibidores del receptor LOX-1 (lovastatina y procianidina C1) previene el efecto pro-fibrótico inducido por LDLox.

VI 3.1 Usó de inhibidores químicos del receptor LOX-1 y su efecto en la señal pro-fibrótica de LDLox

Existen dos familias de inhibidores descritos en literatura que pueden ser empleados para inhibir la vía LDLox/LOX-1. Los primeros fueron publicado el año 2011 por Nishizuka y corresponden a las procianidinas, la con mayor efecto de las estudiadas la procianidina C1 con un IC_{50} : 61 ng/mL¹¹⁰. La segunda familia de inhibidores son las estatinas, que se ha demostrado por modelamiento molecular y ensayos de competencia que son capaces de desplazar el LDLox de LOX-1 y estabiliza la forma dimérica del receptor. La lovastatina fue el que presento el IC_{50} (2 μ M) más bajo y el que se empleó junto con las procianidinas C1 para evaluar si la señal pro-fibrótica del LDLox en MFC era dependiente del receptor LOX-1

VI.3.1.1 Procianidinas C1.

VI.3.1.1.a Toxicidad de MFC tratados por 24 h con procianidinas C1.

Los MFC fueron tratados por 24 h con concentraciones crecientes de procianidinas C1 (10, 100, 500 y 1000 ng/mL) por 24 h y se determinó el porcentaje de células muertas por el ensayo de azul de Tripán. Como controles se emplearon células sin estímulo y células estimuladas con etanol (vehículo de las procianidinas). Los resultados de la **Figura 23**, muestran que ninguna de las concentraciones tuvo efecto citotóxico.

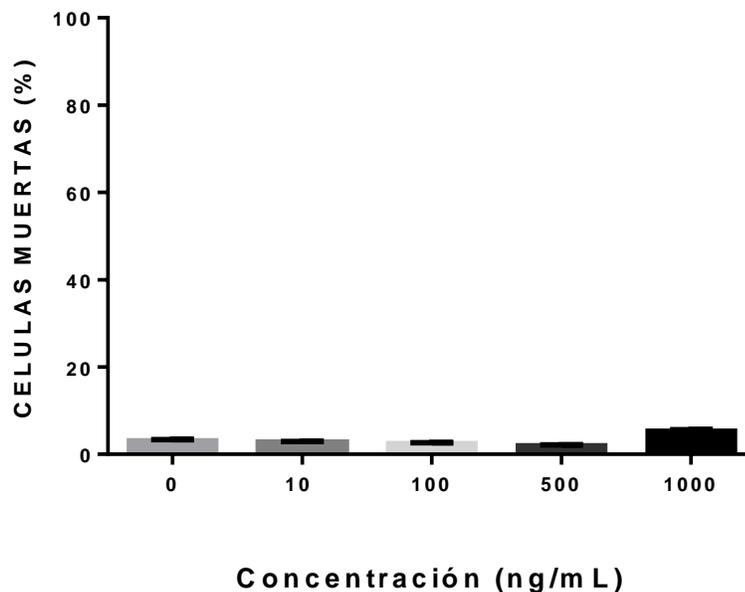


Figura 23. Citotoxicidad de MFC tratados con procianidinas C1 por 24 h. MFC de rata adulta fueron tratados con 10, 100, 500 y 1000 ng/mL de procianidinas por 24 h usando como control el medio sin tratamiento. Las células muertas fueron determinadas por conteo de azul de Tripán. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y post test de Dunnet. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. ($n=4$ para cada grupo experimental).

VI.3.1.1.b Efecto de la inhibición del receptor LOX-1 con procianidinas C1 en la señal pro-fibrótica de LDLox en MFC.

Los MFC de rata adulta fueron tratados por 30 min con 250 ng/mL de procianidinas C1. Posteriormente se estimularon con 10 µg/mL de LDLox por 24 h y se evaluó los niveles de COL-I y α-SMA. Como era de esperar, esta lipoproteína indujo aumento de los niveles de COL-I pero no de α-SMA. El uso de procianidinas inhibió el efecto pro-fibrótico de LDLox sobre los niveles de COL-I (**Figura 24 A**) y previno el efecto sobre la contracción de MFC tratados con LDLox (**Figura 24 B**).

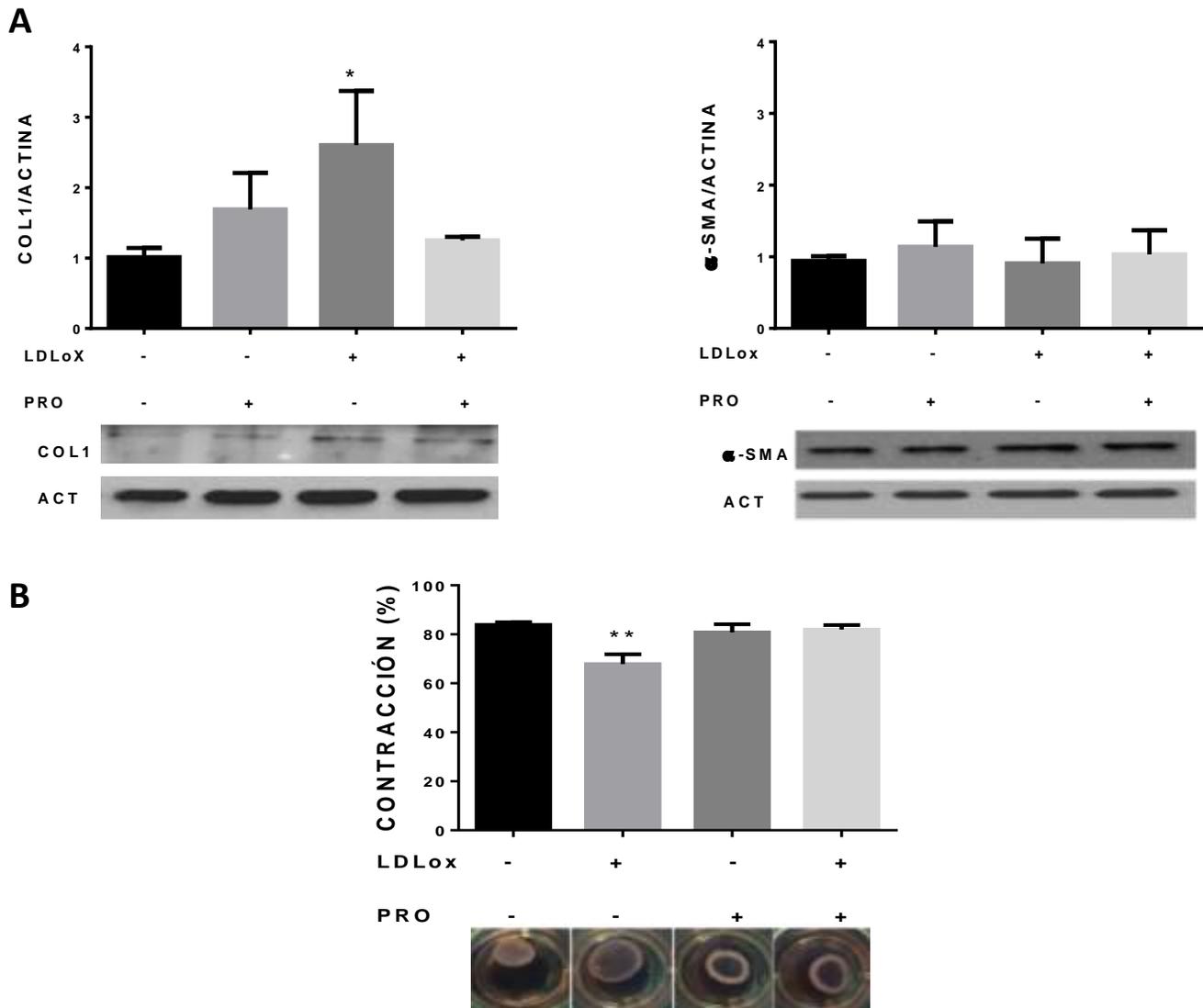


Figura 24. Efecto del pre-tratamiento de MFC con procianidinas C1 en la señal pro-fibrótica del LDLox sobre los Niveles de COL-I, α-SMA y contractilidad celular. Los MFC de rata adulta fueron pretratados por 30 min con procianidinas C1 (PRO) y posteriormente se adicionó LDLox y se incubaron por 24 h en medio de cultivo o en geles de colágeno. **A:** En los gráficos se presentan los niveles de α-SMA y COL1 determinados por *western blot* para las distintas condiciones experimentales. **B:** En la gráfica se presenta el porcentaje de contracción de los fibroblastos embebidos en geles de colágeno bajo las distintas condiciones de tratamiento. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. Se consideró diferencia

significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el grupo sin tratamiento y los tratados. ($n=4$ para cada grupo experimental).

VI.3.1.2 Lovastatina

VI.3.1.2.a. Toxicidad de MFC tratados por 24 h con lovastatina.

Los MFC fueron tratados por 24 h con concentraciones crecientes de lovastatina (0 - 1,25 - 2,5 - 5,0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h y se determinó el porcentaje de células muertas por el ensayo de azul de Tripán. Como control se usó células sin estímulo. Los resultados presentados en la **Figura 25** muestran que la concentración de 4 veces el IC_{50} (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produce cerca de un 12% de muerte, lo que es estadísticamente significativo. Debido a esto se decidió utilizar 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lovastatina para inhibir el receptor LOX-1.

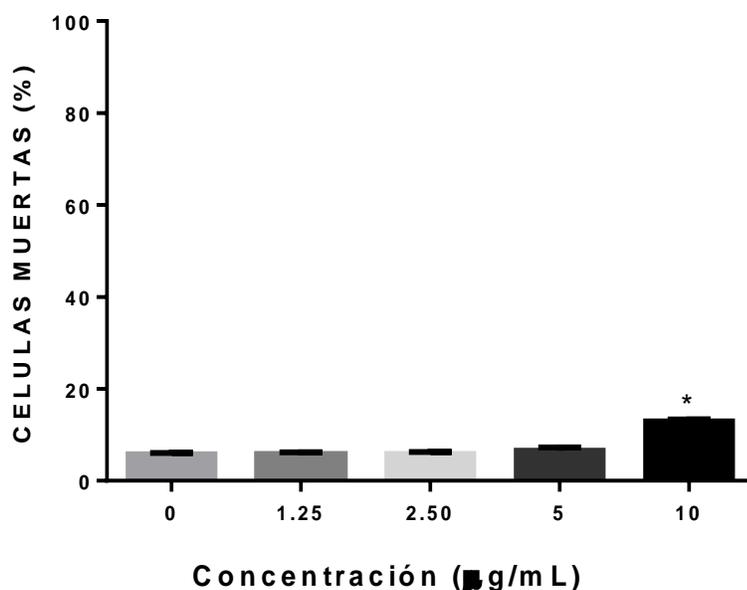


Figura 25. Citotoxicidad de MFC tratados con lovastatina por 24 h. MFC de rata adulta fueron tratados con 0; 1,25; 2,5; 5,0 y 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lovastatina por 24 h usando como control el medio sin tratamiento. Las células muertas fueron determinadas por conteo de azul de Tripán. El porcentaje de células muertas se determinó en relación a las células totales. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post test de Dunnet. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el sin tratamiento y las células tratadas con lovastatina. ($n=5$ para cada grupo experimental)

VI.3.1.2.b. Efecto de la inhibición del receptor LOX-1 con lovastatina en la señal pro-fibrótica de LDLox en MFC.

Los MFC de rata adulta fueron pretratados por 30 min con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lovastatina y luego fueron estimulados con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox por 24 h. Se evaluaron los niveles de COL-I y α -SMA. Como era de esperar, LDLox fue capaz de estimular aumento del nivel de COL-I pero no de α -SMA. El uso de procianidinas inhibe el efecto pro-fibrótico de LDLox sobre los niveles de COL-I (**Figura 26A**). La contractilidad de los MFC pretratados con lovastatina no mostró recuperación de la capacidad contráctil al nivel del control sin tratamiento (**Figura 26B**).

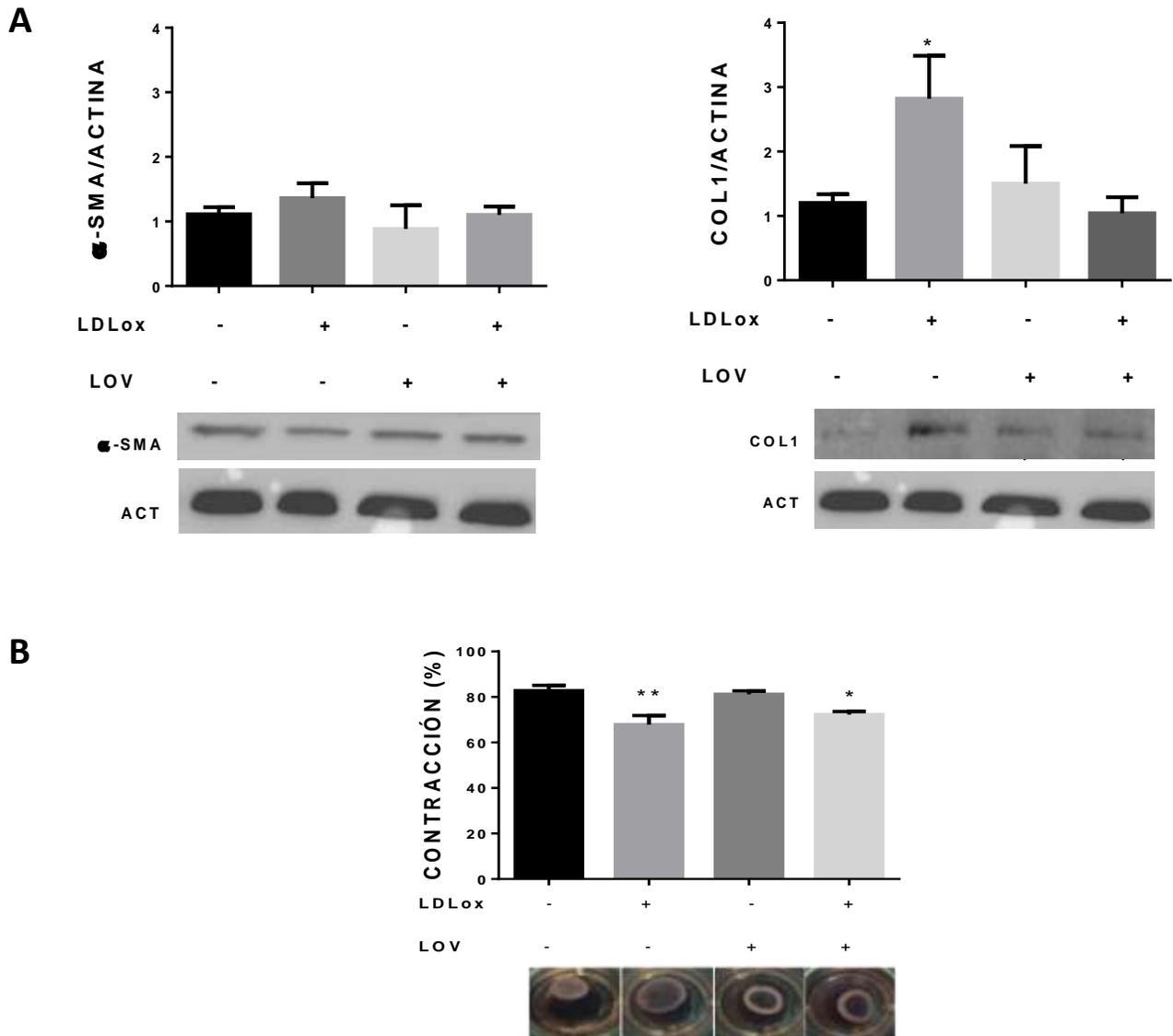


Figura 26. Efecto del pre-tratamiento de MFC con lovastatina en la señal pro-fibrótica del LDLox sobre los niveles de COL-I, α -SMA y contractilidad. Los MFC de rata adulta fueron pretratados por 30 min con lovastatina y posteriormente se adicionó LDLox y se incubaron por 24 h en medio de cultivo o en geles de colágeno. **A:** En los gráficos se presentan los niveles de α -SMA y COL1 determinados por *western blot* para las distintas condiciones experimentales. **B:** En el gráfico se presenta el porcentaje de contracción de los fibroblastos embebidos en geles de colágeno bajo las distintas condiciones de tratamiento. Análisis estadístico: Anova de dos vías con post test de Dunnet. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el grupo control y el tratado con LDLox ($n=5$ para cada grupo experimental).

VI.4. Evaluar si el efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente de los niveles de CAV1.

VI.4.1 El tratamiento de MFC con LDLox induce el aumento de CAV1.

Durante el proceso de fibrosis cardíaca varios autores describen que existe disminución significativa de los niveles de CAV1 en el corazón. Esta proteína se ha definido como un regulador negativo de la señalización de TGF- β 1 y se considera como una proteína anti-fibrótica. Inicialmente en esta tesis se propuso que LDLox potenciaba el efecto de TGF β 1 en MFC y por lo tanto se planteó que ésta disminuiría sus niveles posteriores al co-tratamiento de TGF- β 1/LDLox, lo que no fue observado en los MFC de rata adulta sometidos a este tratamiento (resultados primer avance). Pero si se logró evidenciar que los niveles de CAV1 en los MFC tratados con LDLox por 24 y 48 h aumentaban significativamente (**Figura 27**) similar a lo observado en macrófagos y células endoteliales estimulados con LDLox. En tiempos de 72 y 96 h el efecto estimulador no se observó (**Figura 27**).

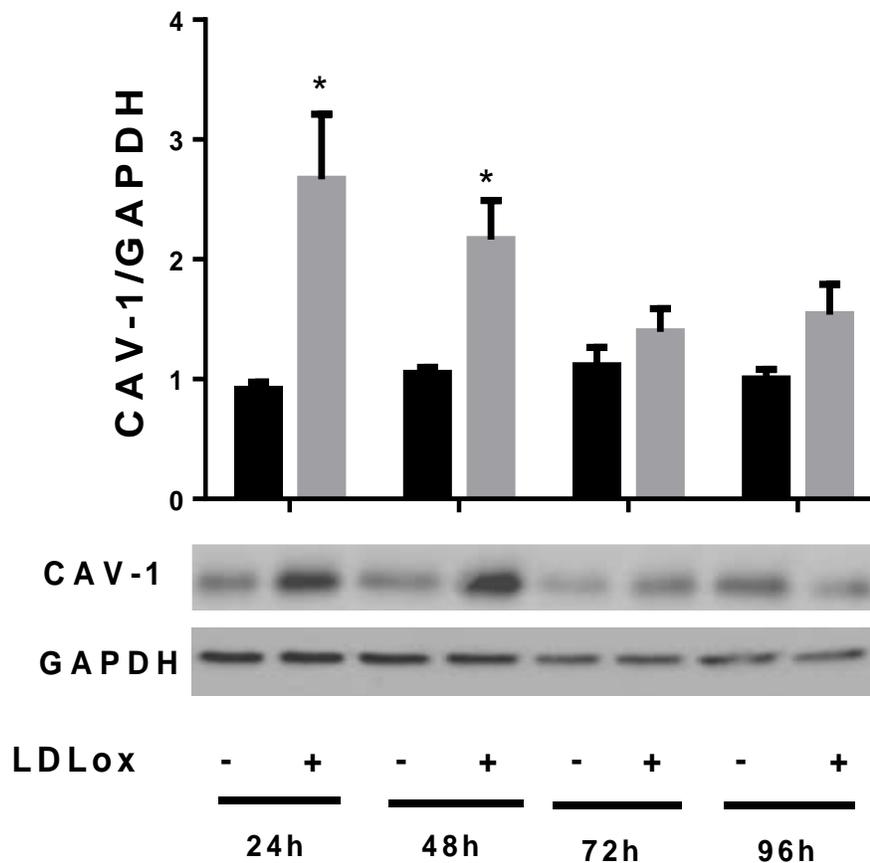


Figura 27. Niveles de CAV1 en MFC tratados a distintos tiempos con LDLox. Los MFC de rata adulta fueron tratados con LDLox por 24, 48, 72 y 96 h. El gráfico muestra los niveles de CAV1 de MFC tratados y sin tratar con LDLox a cada uno de los tiempos antes descritos. Los niveles de CAV-1 a cada tiempo fueron normalizados por GAPDH. En la parte inferior del gráfico se presenta el *western blot* representativo. En todos los tiempos se usó como control una muestra de MFC sin estimular con el fin de saber los niveles basales de las proteínas a evaluar. Análisis estadístico: t-test. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control sin tratamiento (n=5 para cada grupo experimental).

VI.4.2 El silenciamiento de CAV1 previene el efecto pro-fibrótico de LDLox.

Con el fin de determinar si la proteína CAV1 es parte de la vía de señalización pro-fibrótica de LDLox en MFC se silenció la expresión de esta proteína en MFC de rata adulta y posteriormente se trató con LDLox estas células por 24 h y se determinaron los niveles de COL-I, α -SMA, LOX-1. Se ha descrito que en células endoteliales en las caveolas (dominios ricos en CAV-1) se concentra el receptor LOX-1 y que la internalización de LDLox con la consecuente activación de vías de señales como la NF κ B que es mediada por este receptor puede ser inhibida con el uso de inhibidores de las caveolas como carragenanos y nocodazol⁶⁸.

El silenciamiento de CAV1 en MFC (**Figura 28**) produjo disminución de los niveles de LOX-1 y COL-I, lo que indica que esta proteína en si misma es importante en la regulación de los niveles basales de ambos marcadores. Además, las células silenciadas y tratadas con LDLox no fueron capaces de aumentar los niveles de LOX-1 y COL-I como se observó en los MFC tratados con LDLox.

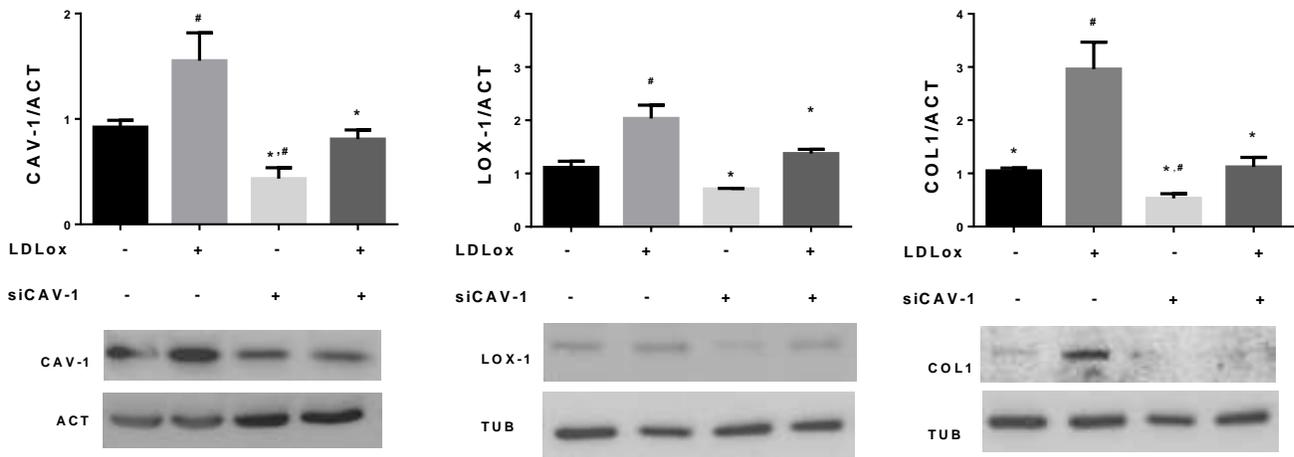


Figura 28. El silenciamiento de CAV1 inhibe la señal pro-fibrótica de la vía LDLox/LOX-1 en MFC de rata adulta. Los MFC de rata adulta fueron silenciados por 18 h con siRNA de CAV1 y posteriormente tratados con LDLox (10 μ g/mL) por 24 h. Los niveles de CAV1, LOX-1 y COL1 se determinaron por *western blot*. (Se observa una imagen representativa inmediatamente a bajo de cada gráfico) Análisis estadístico: ANOVA de dos vías y post test de Bonferoni. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el grupo sin tratamiento y los tratados. (n=5 para cada grupo experimental)

CAV-1 es una proteína regula la proliferación celular tanto positiva como negativamente y en esta tesis se demostró que el tratamiento con LDLox induce su expresión en MFC (**Figura 27**). Se evaluó si el silenciamiento de CAV-1 en MFC revertía el efecto proliferativo de LDLox en estas células. Lo que se puede observar en **Figura 28**, es que lo MFC-siCAV1 no proliferaron a las 24 h posterior al tratamiento con LDLox, opuesto a lo que sucede con los MFC controles tratados. Este resultado se obtuvo por conteo celular (**Figura 29A**) y las diferencias fueron estadísticamente significativas. Si bien, en la **Figura 29B** se observan que las inmunocitofluorescencia para el marcador de proliferación Ki67 muestran el mismo comportamiento, no se realizaron análisis estadísticos de este ensayo debido a que solo se realizaron dos experimentos independientes.

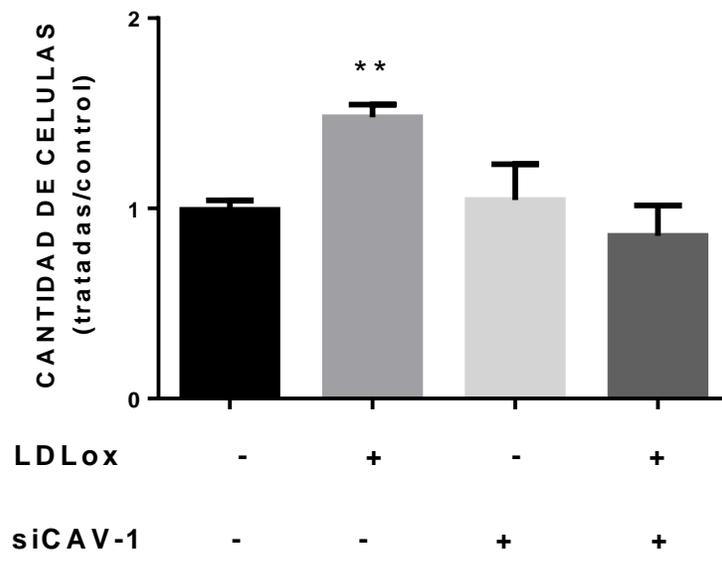
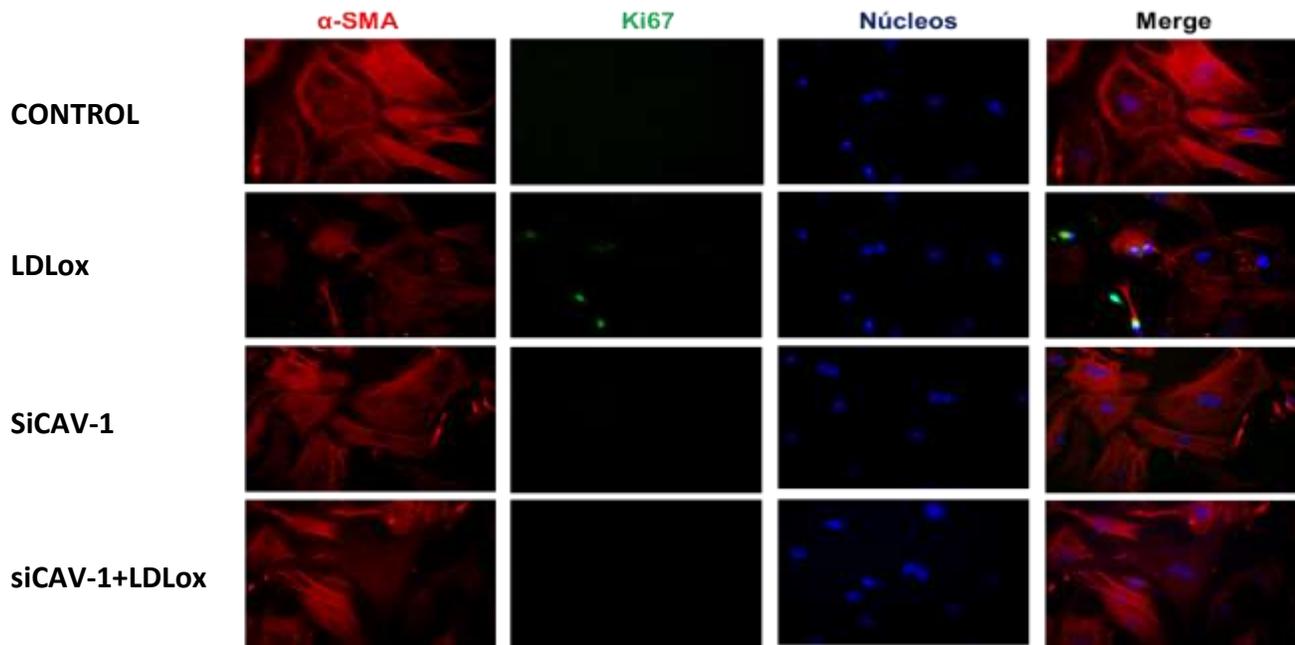
A**B**

Figura 29. El silenciamiento de CAV1 previene la proliferación inducida por LDLox. **A:** El gráfico representa la cantidad de células en razón al control en cada condición (conteo celular). **B:** Inmunocitofluorescencia que muestra la morfología de los MFC marcados con α -SMA y las células de Ki67 positivas para cada condición, las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia con aumento de 40X. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías y post test de Bonferoni. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre el grupo sin tratamiento y los tratados. (n=4 para cada grupo experimental)

VI.4.3 La regulación de CAV-1 por LDLox es dependiente del factor de transcripción FOXO-1

Estudiando la literatura se encontró que uno de los principales factores de transcripción para la proteína CAV1 es el factor FOXO-1, por lo que se planteó estudiar si este factor estaba implicado en la regulación de CAV1. Para esto MFC de rata adulta fueron silenciados por 16 h con el siFOXO-1 y posteriormente se trataron por 24 horas con LDLox. Terminado ese tiempo se evaluaron los niveles de CAV1 y de FOXO-1. Lo primero que observamos en la **Figura 30** es que el tratamiento de MFC controles tratados con LDLox aumentó los niveles totales de FOXO-1, similar a lo observado con CAV1. En las células que se silenció FOXO-1 en más de un 80% se puede observar que disminuyó significativamente los niveles de CAV1. El tratamiento de los MFC-siFOX-1 con LDLox no se observa aumento de la proteína CAV1. Sin embargo, al observar el efecto del silenciamiento de FOXO-1 sobre el receptor LOX-1 no se ve una disminución de los niveles del receptor, esto quiere decir que este factor es capaz de regular los niveles basales de CAV1, pero no los de LOX-1. Adicionalmente se observa que el aumento del receptor LOX-1 inducido por LDLox es revertido en las células si-FOXO-1. Los niveles de α -SMA no se ven afectados por el silenciamiento de FOXO-1.

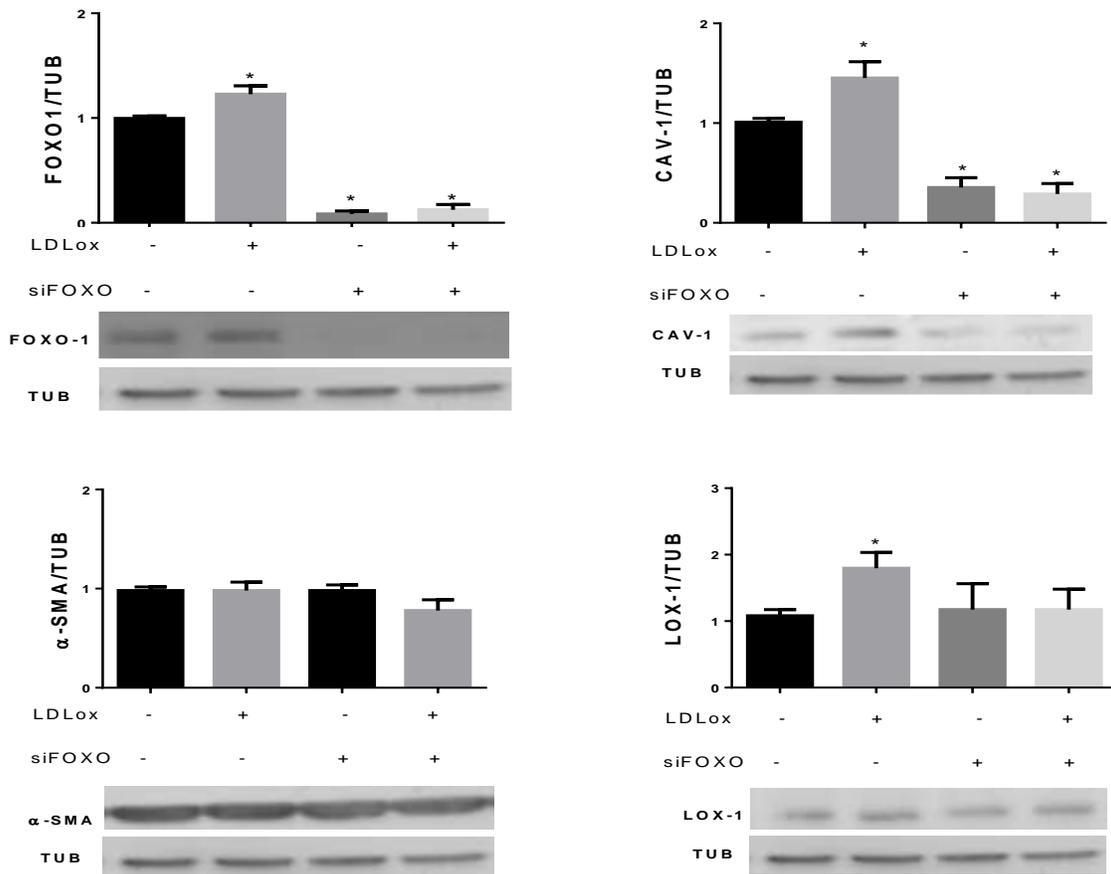


Figura 30. EL silenciamiento de FOXO-1 previene el aumento de CAV1 inducido por LDLox en MFC. Se determinaron los niveles de FOXO-1, CAV1, α -SMA y COL1 mediante *western blot* en MFC de rata adulta silenciados por 18 h con siRNA de FOXO-1 y posteriormente tratados con LDLox (10 μ g/m) por 24 h. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post test de Dunnet. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con LDLox y su respectivo control. (n=4 para cada grupo experimental)

VII. DISCUSIÓN

Aunque el conocimiento sobre los mecanismos que participan en el desarrollo de la fibrosis cardiaca ha avanzado en la última década, todavía no se comprende como este proceso inicialmente reparativo se torna patológico⁹, lo que ha traído como consecuencia que a la fecha no exista ningún tratamiento farmacológico en uso que prevenga, revierta o detenga su progresión¹⁴⁸.

Por otra parte, existe consenso de que el factor de crecimiento transformante TGF- β 1 es la señal que comanda la fibrosis en distintos órganos, incluyendo el corazón y se ha propuesto que la intervención de las vías de señalización activadas por este ligando podrían funcionar como terapia para prevención de la fibrosis¹⁴⁹. El problema radica en que este factor de crecimiento es clave en muchos otros procesos biológicos y su intervención tendría múltiples efectos secundarios peligrosos, lo que hace que se descarte la posibilidad de utilizar esta vía como potencial blanco farmacológico¹⁵⁰. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas vías de señalización involucradas en el efecto pro-fibrótico es relevante y necesaria para encontrar nuevos blancos terapéuticos con proyección de generar fármacos para su tratamiento.

Los MFC son células que no están presentes en el corazón en condiciones fisiológicas posterior a un daño agudo de este órgano, como el producido por un infarto del miocardio, son necesarios para la reparación del tejido debido a su alta capacidad de secreción de proteínas de MEC y fenotipo contráctil⁸¹. Terminado el proceso reparativo estas células mueren por apoptosis^{10,151}. Sin embargo, hay evidencia de que se pueden perpetuar por años por razones desconocidas⁹⁰. En la actualidad los MFC son considerados como la principal célula responsable de la acumulación patológica de MEC en el tejido cardíaco y reportes señalan que son fundamentales en el desarrollo de la IC¹⁵². Estudiar estas células y las vías de señales que le confieren características que favorezcan la fibrosis cardiaca son de sumo interés para entender este proceso fisiopatológico y eventualmente para encontrar nuevos blancos terapéuticos para enfermedades que cursan con procesos fibróticos como la IC y las arritmias¹⁵³.

Hay antecedentes que indican que la LDLox estaría implicada en el desarrollo de fibrosis en hígado y riñón^{102,103}. Sin embargo, no hay estudios que atribuyan a esta partícula un rol en fibrosis cardíaca. Es reconocido que los altos niveles de LDLox plasmáticos aumentan el riesgo de accidentes coronarios y son un factor predictor de mortalidad en IC congestiva^{17,107}. Algunas investigaciones demuestran que el corazón de individuos con enfermedades coronarias tienen acumulación de LDLox tanto en el endocardio como el pericardio y que la sangre ventricular de pacientes con IC tiene niveles elevados de LDLox al comparar con la sangre periférica de los mismos individuos^{105,106}. Estos autores han propuesto que estas lipoproteínas posiblemente cumplen un rol patológico en el corazón. Más aún se ha descrito que puede activar la apoptosis y disminución de la función de cultivos primario de cardiomiocitos de rata adulta, pero el efecto sobre MFC nunca ha sido estudiado¹⁵⁴.

Adicionalmente, ha sido demostrado que en el corazón de ratones sometidos a I/R aumenta la expresión de LOX-1 (el principal receptor de las LDLox) comparado con los animales *sham*¹⁵⁵. Además, se ha observado que ratones KO para LOX-1 a los que se le realiza I/R o tratamiento con doxorubicina para inducir IC, muestran disminución del contenido de colágeno en comparación a lo observado en ratones WT^{50,156}. También resultados de nuestro laboratorio indican que durante el proceso de diferenciación *in vitro* de FC a MFC de rata adulta aumenta significativamente el nivel de LOX-1 a las 96 horas, es decir, en el MFC hay mayor nivel de LOX-1 que el fenotipo no diferenciado⁷⁶. Para que LOX-

1 sea funcional, este receptor se debe ubicar en caveolas, que son zonas ricas en colesterol y proteína CAV1 presente en la membrana plasmática⁶⁸. La expresión de esta proteína puede ser inducida por LDLox en distintos tipos celulares y el tratamiento de CE con esta lipoproteína aumenta el reclutamiento de NOX-2 en caveolas y genera producción de altos niveles de ROS con todos los efectos metabólicos y funcionales que tienen estas especies en las células^{132,157,158}.

Relación a los antecedentes mencionados es posible proponer que la vía LDLox/LOX-1 es una nueva vía pro-fibrotica presente en MFC que podría ser utilizada como blanco terapéutico para fibrosis cardiaca, y los resultados de esta tesis contribuyen a demostrar esta hipótesis. La discusión de resultados se presentará en dos grandes ítems. En el primero de ellos se discutirá el novedoso efecto pro-fibrótico de la vía LDLox/LOX-1 en MFC y el segundo como la proteína CAV1 es necesaria para el efecto pro-fibrótico de LDLox en este tipo celular y cómo esta es regulada por los niveles del factor transcripcional FOXO-1.

VII.1 Efecto pro-fibrótico de LDLox/LOX-1/NOX-2 en MFC.

Las interrogantes que surgen de los antecedentes mencionados y que dieron origen a la primera parte de esta tesis es si los MFC responden a la señal de LDLox vía el receptor de LOX-1 aumentando los niveles de proteínas de MEC. Y si este estímulo modifica la funcionalidad de estas células, lo que podría favorecer el desarrollo de fibrosis en el corazón. Para evaluar estas interrogantes la concentración de trabajo de LDLox seleccionada para todos los experimentos de esta tesis fue la de 10 µg/mL debido a que demostró ser no tóxica a las 96 h de tratamiento (**Figura 8**). Esta concentración ha sido descrita es capaz de producir disfunción endotelial en pacientes con enfermedad coronaria y por lo tanto es considerada patológica. Además, se ha descrito que puede estimular la proliferación de células endoteliales dependiente de la activación de la NADPH^{159,160}. En MFC se demostró la activación de NOXs a los 60 min posterior al tratamiento (**Figura 9**), lo que confirma que LDLox está uniéndose a su receptor y activando su vía canónica.

VII.1.1 LDLox aumenta los niveles de proteínas de MEC.

La MEC es una compleja red compuesta de agua, proteínas y polisacáridos con características funcionales y topológicas únicas de cada tejido, que regula procesos biológicos como la proliferación, migración, adhesión, polaridad, diferenciación y reparación celular¹⁶¹. Como ya fue mencionado la acumulación patológica de MEC en el corazón es llamada fibrosis cardiaca y produce una alteración tanto funcional como estructural del corazón⁸⁵. Existen más de 300 proteínas de MEC y se agrupan en 9 grupos: colágeno, fibronectina, proteoglicano, laminina, elastina, tenascinas, integrinas, factores de crecimiento y MMPs¹⁶². Dentro de estas proteínas cabe destacar el COL-I que es el mayor componente de la MEC y forma las fibras de colágeno que le confieren rigidez y resistencia al tejido cardiaco y la fibronectina-EDA, que es una glicoproteína de adhesión celular generada por *splicing* alternativo necesaria para la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos debido a que une con alta afinidad el TGF-β latente y permite su activación¹⁶³. La variante EDA de la FN es vital en la morfogénesis humana y en adultos su expresión se asocia a procesos patológicos como la fibrosis^{163,164}. Ambas proteínas son utilizadas como los principales marcadores fibróticos y fueron empleados en esta tesis con este fin.

VII.1.1.1 La vía LDLox/LOX-1/NOX-2 induce el aumento de los niveles COL-I:

En células SMC fue descrito que el tratamiento con LDLox aumenta la síntesis de COL-I¹⁶⁵. En MFC no existían antecedentes que LDLox regulara los niveles de esta proteína, aunque previamente había sido reportado que FC-KO para LOX-1 sintetizaban bajos niveles de COL-I al ser estimulados con TGF- β 1 en comparación a los FC-WT tratados con este factor de crecimiento. Debido a que los MFC presentan altos niveles de LOX-1 se evaluó si LDLox, su principal ligando, era capaz de inducir un aumento en los niveles de COL-I (**Figura 12**) y se observó que esta lipoproteína aumentó significativamente los niveles de COL-I entre los 24 y 72 h comparados con el control. Este aumento fue dependiente del receptor LOX-1, lo que se observa en la **Figura 21** donde los MFC siLOX-1 tratados con LDLox no aumentan significativamente los niveles de COL-I a las 24 h, es decir el efecto de LDLox es dependiente del receptor LOX-1.

Debido a que LDLox activa la fosforilación de la subunidad p47phox de NOX-2 en MFC (**Figura 9**) se demostró que la inhibición de esta enzima con apocinina, previo al estímulo con LDLox evitó el aumento de COL-I a las 24 h post-tratamiento (**Figura 22**). Es decir, el efecto de LDLox es dependiente de la vía canónica del receptor LOX-1, con la consecuente activación de NOX-2 y el probable aumento de la producción de ROS. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el tratamiento con estas lipoproteínas aumenta los niveles de ROS en MFC. Los ROS han demostrado ser indispensables para inducir la expresión de COL-I en FC tratados ANG-II y probablemente inducen la expresión de COL-I en MFC, esto en un futuro podría ser comprobado por qPCR¹⁶⁶. Adicionalmente el aumento de COL-I también se correlaciona con el aumento observado de la actividad proMMP-9 a las 48-72 h post tratamiento con LDLox (**Figura 17**). Las metaloproteinasas son enzimas con actividad colagenasa. La MMP-9 si bien a tiempo tempranos post daño disminuye su actividad y favorece el desarrollo de fibrosis. En tiempos tardíos se ha comprobado que la actividad pro-MMP-9 puede ser inducida por LDLox en varios tipos celulares y ha sido descrito que puede regular positivamente la síntesis de COL-I dependiente de ROS por un mecanismo independiente de su actividad colagenasa^{157,167-169}. Mas aún, en estudios *in vivo* se ha observado que ratones KO-MMP9 sometidos a infarto presentaron una menor acumulación de colágeno comparado con ratones WT¹⁶⁹ Esta característica dual se conoce como el efecto paradójico de la MMP-9.

VII.1.1.2 LDLox induce el aumento de FN-EDA:

El segundo marcador de MEC evaluado en MFC tratados con LDLox fue FN-EDA. No existen estudios que estas lipoproteínas puedan regular los niveles de esta variante de fibronectina en algún modelo celular o animal. Sin embargo, los resultados observados en la **Figura 13** indican que el estímulo con LDLox a tiempos largos (72-96 h) aumentó significativamente los niveles de esta proteína en MFC. El aumento de esta proteína es tardío en relación al aumento observado en COL-I. Esta diferencia podría indicar que la regulación de ambas proteínas está ocurriendo por mecanismo distintos. Por ejemplo, en un caso la LDLox podría estar aumentando la expresión de COL-I y disminuyendo la degradación de FN-EDA o el aumento de FN-EDA podría ocurrir por la activación de otro receptor que reconozca como ligando LDLox debido a que los experimentos con apocinina y silenciamiento de receptor LOX-1 no se realizaron a 72 o 96 h y por lo tanto no se puede asegurar que el aumento de FN-EDA sea dependiente de este receptor como si fue

demostrado en el caso de COL-I (**Figura 21**). En esta línea se ha observado en células endoteliales que el estímulo con LDLox aumentó la deposición de fibronectina, pero no de su expresión de manera dependiente de la integrina $\alpha 5\beta 1$ ¹⁷⁰. Además también ha sido descrito que LDLox puede activar una serie de receptores entre los que cabe destacar CD36, SR-1 y TLR4 los que podrían estar regulando los niveles de FN-EDA²⁵.

En células epiteliales glomerulares las LDLox aumentan la expresión de FN de manera dependiente de la acción de TGF- $\beta 1$, es decir estas células deben secretar TGF- $\beta 1$ para inducir el posterior aumento de FN-EDA¹⁷¹⁻¹⁷³. Algunos datos no mostrados de esta tesis indican que los MFC no responden a TGF- $\beta 1$ 10 ng/mL, probablemente por una desensibilización de la vía que ocurre durante el proceso de diferenciación *in vitro* de FC a MFC inducido por TGF- $\beta 1$, pero no fue evaluado si a las 48 o 72 h posterior de obtenidos los MFC, estas células recuperan su sensibilidad a este factor de crecimiento que puede ser eventualmente producido por estas mismas células y como consecuencia se observe tardíamente el aumento de los niveles de FN-EDA. En diferenciación del FC, el aumento de CTGF precede e induce el aumento de FN-EDA^{174,175}. Es posible que en MFC se necesite aumento de los niveles de CTGF previo al aumento de FN-EDA, en otros tipos celulares las ROS inducen la expresión de esta proteína, para demostrar esto sería interesante evaluar si LDLox es capaz de regular los niveles de CTGF entre las 24-96 h y evaluar si el MFC siCTGF tratados con LDLox pueden inducir el aumento de FN-EDA en MFC. Mas allá de cómo se regulen los niveles de FN-EDA la pregunta que surge ¿Cuál es el rol que cumpliría FN-EDA en el fenotipo pro-fibrótico de MFC tratados con LDLox? En células embrionarias se ha descrito que el dominio EDA de esta proteína promueve su proliferación y en condrocitos se ha demostrado que esta proteína regula positivamente la expresión de metaloproteasas, ambas funciones podrían promover el fenotipo fibrótico de los MFC observado en esta tesis y en un futuro mediante el silenciamiento de fibronectina-EDA se podría comprobar el rol de esta proteína en MFC tratados con LDLox.

VII.1.2 Cambio morfológico y funcional de MFC inducido por LDLox.

VII.1.2.1 Cambio morfológico de MFC inducido por LDLox.

Existen evidencias que la LDLox puede generar cambios morfológicos en células endoteliales e inducir aumento en los niveles de α -SMA en células SMC. Además, ha sido descrito que esta lipoproteína promueve la diferenciación de monocitos a células espumosas, inhibe la diferenciación de células madre de médula ósea a células endoteliales e induce la transición desde fenotipo quiescente contráctil a fenotipo proliferativo. Estos cambios se ven evidenciados tanto a nivel de morfología como de función^{31,41,176}. En los resultados presentados en esta tesis la LDLox a ninguno de los tiempos evaluados produjo alteración en los niveles de α -SMA (**Figura 11**). Debido a que esta proteína es usada como marcador de MFC, este resultado podría indicar que las LDLox no afectaron el fenotipo de estas células. Sin embargo, al observar la morfología de los MFC tratados con LDLox tanto a las 72 como a las 24 h (**Figura 19**), se apreció una aparente disminución de tamaño que fue acompañado con un mayor número de células por campo (primer indicio de que el tratamiento estaba promoviendo la proliferación de los MFCs). El cambio de tamaño debe ser analizado con cautela debido a que las imágenes utilizadas para estos análisis no fueron obtenidas con *z-stack* y por lo tanto no fue evaluado el volumen celular y probablemente los MFCs pueden parecer de menor tamaño, pero presentar un mayor volumen. Esto se correlaciona a que los MFC tratados con LDLox además pierden la distribución fibrilar

paralela de α -SMA y si bien la intensidad de la marca se mantiene la distribución es difusa en el citoplasma. Chouinard en el 2008 describió que la LDLox alteró la distribución de los filamentos de actina y vimentina lo que generó un cambio en la morfología de células endoteliales, similar a lo observado en los MFCs¹⁷⁷. En células SMC también se produce una desorganización de los filamentos de actina y miosina posterior al tratamiento con LDLox¹⁷⁸. Existe consenso que la reorganización del citoesqueleto de actina puede regular negativamente procesos como la migración, contractilidad y proliferación celular, parámetros que fueron evaluados en esta tesis¹⁷⁹.

VII.1.2.2 LDLox modifica los parámetros funcionales de MFC.

Debido a que los MFC respondieron al estímulo de LDLox aumentando los niveles de proteínas de matriz extracelular y cambiando la morfología de las células se planteó determinar si el tratamiento sería capaz de variar la funcionalidad de estas células. Para esto se realizaron 5 pruebas funcionales: migración por ensayo de herida (**Figura 14**), contracción (**Figura 15**), Determinación de la proliferación celular (**Figura 16**), Actividad MMP-2 y MMP-9 (**Figura 17**) y concentración de colágeno en el medio de cultivo (**Figura 18**).

Migración: Una de las principales características de los MFC es su capacidad de migración a la zona del daño. La disminución de esta característica provocaría que estas células no se movilizaran al sitio de la injuria y produjeran acumulación de proteínas de MEC en tejido cardíaco sano contribuyendo a la progresión de la fibrosis cardíaca. En el caso de los MFC tratados con LDLox por 24 h (**Figura 14**) la capacidad de cierre de herida fue aproximadamente 3 veces menor que en las células sin tratamiento, es decir, la capacidad de migración de estas células disminuyó significativamente y si esto ocurriera en el corazón favorecería la fibrosis de este órgano. Está documentado en células de musculo liso (SMC) y endoteliales (EC) que el tratamiento con LDLox es capaz de regular la migración^{144,180}. En el caso de las SMC esta lipoproteína regula positivamente la capacidad de migración y en el caso de las células endoteliales ha sido descrito que el aumento de ROS regula negativamente este proceso. Datos del laboratorio indican que el tratamiento de MFC con LDLox aumentan significativamente los niveles de ROS y en CE se ha descrito que el tratamiento con LDLox disminuye la migración celular dependiente del aumento de ROS, por lo tanto, es probable que esta vía que regule negativamente la migración de MFCs. También, ha sido descrito que la alteración del citoesqueleto como las observadas en miofibroblastos tratados con LDLox pueden alterar la migración de varios tipos celulares¹⁸⁰.

Contractilidad y actividad de metaloproteinasas: LDLox también disminuyó significativamente la capacidad contráctil de los MFC a las 24 h postratamiento (**Figura 15**). Esta capacidad facilita en la reparación del tejido cardíaco permitiendo la generación de la cicatriz⁸⁴. La disminución de la contractilidad extrapolado a lo que sucede en el corazón perjudicaría la reparación fisiológica inicial del tejido cardíaco posterior a un daño como por ejemplo un infarto. Previamente se ha descrito que en células SMC las LDLox producen desorganización del citoesqueleto y el tratamiento crónico con esta lipoproteína disminuye los niveles de α -actina y de miosina¹⁷⁸. Existe un antecedente que el LDLox puede disminuir la capacidad contráctil de cultivos primarios de cardiomiocitos de rata adulta vía PCSK9^{178,181,154}. Además, se ha evidenciado que el aumento de actividad MMP-9 regula positivamente la contracción de geles de colágeno, pero en este caso existe un aumento de la forma inactiva de la MMP-9 (proMMP-9) tanto a las 48 y 72 h posterior al tratamiento con LDLox (**Figura 17**), que podría estar regulando negativamente la contractilidad

de los MFC¹⁴⁶. Tanto la expresión como los niveles de MMP-9 deberían ser evaluados en una futura investigación este tema, tanto a nivel de proteínas como de ARNm para así resolver si el aumento de la forma proMMP9 es debido a la disminución de las TIMPs. Además, se demostró en los MFCs que la contractilidad es regulada vía receptor LOX-1 (**Figura 21**). Sin embargo, queda pendiente demostrar que este parámetro funcional sea dependiente de NOX-2. Para ello se podría silenciar la subunidad catalítica de esta enzima o usar inhibidores como la apocinina previo al tratamiento con LDLox para verificar que la regulación es vía LOX-1/NOX-2.

Proliferación: En este trabajo se encontró que LDLox induce proliferación celular a las 72 h posterior al tratamiento (**Figura 16**). El aumento de la proliferación de MFC por esta lipoproteína no ha sido descrito. Debido a que en el corazón de personas con ECVs se encuentran presente LDLox, es probable que lo observado in vitro pueda ocurrir en el tejido cardiaco y provoque que los MFC proliferen en el corazón y ser uno de los mecanismos que explique cómo los MFC se perpetúan en este órgano. Existe evidencia que LDLox puede aumentar directamente proteínas que inducen el ciclo celular (CDKs, ciclinas, PCNA) a la misma concentración en fibroblastos quiescentes humanos y SMC¹⁸¹. En células HUVEC y EC, también se ha descrito que las LDL oxidadas pueden inducir proliferación vía activación de RhoA^{182,183}. En esta tesis no se estudió el mecanismo por el cual LDLox induce proliferación de LDLox de MFC, pero sería interesante a futuro evaluar las vías antes mencionadas.

Colágeno soluble: El aumento de COL-I a las 24 y 72 h se correlaciona con el aumento significativo de colágeno soluble en los sobrenadantes de las células tratadas con LDLox a los mismos tiempos (**Figura 18**). Este resultado indica que la LDLox induce el aumento en la secreción de colágeno y probablemente esto se relacione con el aumento de expresión de esta proteína o con la disminución en la degradación. Esto podría ser resuelto cuantificando los niveles de ARNm de los principales colágenos involucrados en fibrosis (COL-I; COL-III y COL-IV). El aumento en la producción y acumulación de colágeno producido en MFC puede contribuir directamente al desarrollo y progresión del proceso fibrótico en el corazón.

En resumen, el tratamiento con LDLox aumenta las características sintéticas de los MFC, cambia la morfología de las células y varía los parámetros funcionales transformando estas células en un fenotipo aún más patológico que el inicial debido a que: (1) pierden características necesarias para que estas células cumplan su rol fisiológico inicial (contractilidad y migración), (2) aumentan la producción de proteínas de MEC (COL-I y FN-EDA) y (3) induce la proliferación celular. El efecto fue demostrado ser dependiente del receptor LOX-1 en el caso del aumento de los niveles de COL-I y la contractilidad a las 24 h. Sería interesante probar si la disminución de la migración, proliferación, secreción de colágeno, actividad MMP-9 y aumento de los niveles de FN-EDA son vía LOX-1 y en el caso de no ser el receptor responsable de alguno de los cambios producidos por LDLox investigar que receptor podría estar involucrado. A su vez se demostró que el aumento de COL-I a las 24 h fue dependiente de la activación de la NOX-2 y es probable esta sea la vía involucrada en gran parte de los efectos patológicos descritos por las LDLox en MFCs.

VII.1.3 ¿vía LDLox/LOX-1 un nuevo blanco terapéutico para fibrosis cardíaca?

VII.1.3.1 LDLox induce el aumento del receptor LOX-1 en MFC de rata adulta.

El efecto patológico de la vía LDLox/LOX-1 es potenciado en otros tipos celulares debido a que esta lipoproteína induce la expresión de LOX-1 y en el caso de estar presente el ligando constantemente tanto la vía como los efectos biológicos inducidos por la misma se mantendrían en el tiempo^{1,74,143}. Sin embargo, hasta fecha no existía evidencia previa que esto ocurriera en MFCs. En estas tesis se aprecia que el estímulo de LDLox aumenta a los niveles de LOX-1 a las 24 h y 48 h postratamiento (**Figura 10**). Si este resultado se llevara al tejido cardiaco de personas con ECVs donde existe presencia de LDLox, se podría inferir que este receptor sería inducido constantemente. Esto produciría una regulación positiva de la vía LDLox/LOX-1/NOX-2 en los MFC presentes en el corazón y gatillaría a largo plazo una perpetuación de los cambios funcionales descritos en la sección V.1.2.b que son inducidos por LDLox en los MFC que contribuirían activamente en la progresión de la fibrosis cardíaca y con ello de enfermedades como la IC. Interesantemente se ha observado que en modelo animales que desarrollan fibrosis cardíaca, la administración de una dieta alta en colesterol agrava este proceso independiente la presencia de diabetes, hipertensión u obesidad^{184,185,186,187}. Más aun, ratones alimentados con dieta alta en colesterol (HC) aumentan la expresión de LOX-1 y NADPH oxidasa a nivel de corazón y la administración de la rosuvastatina (Inhibidor del receptor LOX-1) disminuye la acumulación de COL-I e hipertrofia en los corazones de ratones HC¹⁰⁴. Adicionalmente se ha observado que individuos con hipercolesterolemia familiar presentan altos niveles de LDLox a nivel plasmático¹⁸⁸. Por lo tanto es altamente probable que esta vía este continuamente activa en el corazón y más específicamente en los MFCs de personas con altos niveles de colesterol.

VII.1.3.2 La intervención molecular y farmacológica del receptor LOX-1 previene del efecto pro-fibrótico de LDLox.

Debido a que LDLox modifica parámetros funcionales y secretores de los MFC que potenciarían la fibrosis cardiaca, se propuso intervenir el receptor LOX-1 en MFC a través del silenciamiento del receptor (interferencia a nivel de expresión) y mediante el pre-tratamiento con inhibidores químicos descritos y disponibles comercialmente para el receptor (procianidina C1 y lovastatina) los cuales se podrían utilizar en un futuro como terapia. Los ensayos elegidos para verificar que el pro-fibrótico de LDLox en MFC fuera vía LOX-1 son: Niveles de COL-I, LOX-1 y ensayo de contractilidad. El silenciamiento de LOX-1 en MFC previno el aumento de los niveles de COL-I, LOX-1 y la disminución de la contractilidad de estas células (**Figura 21**). Resultados similares fueron obtenidos para los dos inhibidores utilizados. Como se puede observar en la **Figura 24** y **Figura 26**. Excepto en el caso de la contractilidad donde la lovastatina no previno este efecto.

La diferencia en el efecto observado entre la procianidina C1 y la lovastatina se podría deber al mecanismo de acción de ambos compuestos. Las procianidinas si bien se sabe inhiben la internalización de LDLox no se ha definido si este efecto ocurre porque se unen a la molécula de LDLox e inhiben la unión de la molécula al receptor o por que inhiben directamente la activación del receptor¹¹⁰. A su vez se ha descrito que las procianidinas poseen una fuerte actividad antioxidante y además de inhibir el receptor podrían disminuir los niveles de ROS generados por la vía LDLox/LOX-1/NOX-2¹⁸⁹. En el caso de las estatinas, el 2015 se demostró que se unen en el sitio de activo de LOX-1 e impide la activación del receptor¹¹². Además disminuye la síntesis

de colesterol celular por inhibición de la HMG-CoA reductasa lo que disminuiría el número de balsas lipídicas (ricas en colesterol) donde se concentra la NADPH oxidasa y el receptor LOX-1 y por lo tanto también podrían apagar la señal por este mecanismo^{68,190}. Las estatinas además tienen como ventaja que al disminuir los niveles de LDL plasmáticos existe menos producción de LDLox en el organismo. Pero se ha descrito también que las estatinas inhiben la síntesis de geranilgeranilo necesario para la activación de Rho, Rac y CD42 generando desorganización del citoesqueleto y pérdida de la contractibilidad en células endoteliales⁶⁸. Esto podría ser la explicación de porque las células tratadas con LDLox y pre-tratadas con lovastatina presentan menos contractibilidad que las células control y no existe prevención sobre el efecto anti-contráctil que presentan los MFC tratados con LDLox.

Eventualmente, tanto las procianidinas como la lovastatina podrían ser utilizadas como una terapia para prevenir o atenuar la fibrosis. El 2014 Akahory y cols., describieron que el tratamiento con atorvastatina disminuye la fibrosis cardiaca en un modelo de ratas con IC hipertensiva, en este trabajo ellos describieron que esto se asocia con la disminución de la chaperona HP47 una de las principales proteínas que participan en el procesamiento de COL-I¹⁹¹. Se ha descrito que en las células SMC estimuladas con LDLox aumentan la expresión de HP47 y este podría ser un posible mecanismo por el cuál LDLox vía su receptor puede aumentar los niveles de COL-I en MFC⁴³. El 2016 se evaluó el efecto del tratamiento con atorvastatina por 12 semanas de pacientes con fibrosis cardiaca que presentaban hipertensión y aterosclerosis¹⁹². Los resultados mostraron una disminución de los marcadores de fibrosis y una evidente mejora en el tiempo de retraso CIBVS determinado por ultrasonido, lo que da cuenta de una disminución de la fibrosis presente en el tejido cardiaco que a su vez se correlacionó con una disminución en los niveles de LDL en los pacientes.¹⁹² Un estudio publicado en mayo del 2018, evidencio que paciente con HIV que presentan fibrosis cardiaca y que fueron tratados con estatinas disminuyen los marcadores plasmáticos de fibrosis, el posible mecanismo propuesto por estos autores es que estos fármacos disminuyen marcadores inflamatorios de estos pacientes y que actuarían como anti-fibrótico disminuyendo la inflamación sistémica¹⁹³. A la luz de los resultados de esta tesis es posible especular que la inhibición de la vía LDLox/LOX-1 sea responsable al menos en parte del efecto anti-fibrótico observados en ambos estudios clínicos.

En el caso de las procianidinas, se ha observado que en un modelo de fibrosis cardiaca de rata inducida con isoproterenol y tratadas simultáneamente con OPC (oligómeros de procianidinas) que los corazones de estos animales presenta menores niveles de COL-I, COL-III y ANG-II que el encontrado en los controles sin tratamiento⁸⁹. Este modelo es interesante debido a que el tratamiento con isoproterenol induce la oxidación de LDL y por lo tanto este efecto anti-fibrótico evidenciado en este modelo animal podría ser vía inhibición de la vía LDLox/LOX-1. No existen estudios clínicos donde alguna procianidina sea usada como terapia anti-fibrótica, pero si existen revisiones que proponen a estos compuestos como una posible terapia para este proceso patológico, debido a su actividad anti-oxidante¹⁹⁴. El gran problema de estos compuestos es su baja biodisponibilidad, más aún se ha descrito que las procianidinas triméricas, como lo son la procianidina C1 utilizadas en esta investigación) prácticamente no son absorbidas en el intestino delgado y a las 2 horas no son encontradas presentes en circulación¹⁹⁵. Por lo tanto para poder usar estos compuestos como terapia se debería evaluar la forma de administración de estos compuestos (Ej: intravenosa o intraperitoneal) y asociarlos a nuevos avances biotecnológicos

como son las nanopartículas que pueden mejorar su biodisponibilidad y también asegurar que lleguen al órgano blanco en este caso el corazón¹⁹⁵. En este punto existen avances importantes en el tema, debido a que existe una serie de trabajos donde cargan nanopartículas de oro y plata con OPC y han verificado que mejora su efecto antioxidante en cultivos celulares y además el 2018 se describió que proteína unidas a ácido tánico administrada vía venosa a las 6 h se acumulan preferentemente en el corazón posterior a 6 h en zonas ricas en colágeno y proteínas de matriz extracelular¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Adicionalmente nanopartículas funcionalizadas con ácido tánico también han sido sintetizadas¹⁹⁹. Es decir, se podrían producir nanopartículas cargadas con procianidinas y funcionalizadas con ácido tánico que irían directamente al corazón y se acumularían en este órgano en zonas ricas en colágeno y otras proteínas de MEC, que en el caso de pacientes con fibrosis son áreas donde están ubicados los MFC y podrían estas procianidinas inhibir la vía LDLox/LOX-1 con alta eficiencia y funcionar como terapia anti-fibrótica.

VII.1.3.3 Prueba de concepto: Ratones obesos (eventualmente con altos niveles de LDLox) deberían aumentar los niveles de LOX-1 y marcadores de fibrosis en tejido cardíaco.

Existen suficiente evidencia que indican que en personas con diabetes tipo 2, niños obesos, mujeres post-menopausia con obesidad presentan un estado inflamatorio crónico, que aumenta los niveles de LDL oxidadas en estos pacientes^{200,201}. Adicionalmente, se ha descrito en modelos de ratones alimentados con dieta alta en grasa que existe desarrollo de fibrosis cardíaca^{54,202}. Lo que también ha sido reportado en cerdos alimentados con dieta en alta en grasa donde se estableció que la progresión del proceso fibrótico fue dependiente del aumento del estrés oxidativo¹⁸⁴. (Li y cols. 2017). Pero la pregunta que surge es si efectivamente existe un aumento de los niveles del principal receptor de LDLox, LOX-1, en el corazón de individuos obesos, lo que nos entregaría indirectamente una prueba de conceptos del rol de LOX-1 en procesos que podrían generar fibrosis y que tenga asociado un aumento de las LDLox. Para esto se realizó un pequeño ensayo de prueba de concepto en ratones alimentados por 5 meses con una dieta alta en grasa y de se determinaron tanto los niveles de LOX-1 como de los marcadores de fibrosis FN-EDA y COL-I en relación con los ratones alimentados con una dieta normal (**Figura 20**). Lo que se observó es que efectivamente en los ratones HFD hubo un aumento significativo de todos los marcadores de fibrosis evaluados como también del receptor LOX-1. Los que nos permite especular que probablemente LDLox vía LOX-1 puede estimular el proceso de fibrosis cardíaca en individuos que presenten altos niveles de LDLox. El modelo de ratones HFD podría ser utilizado para determinar si el uso de lovastatina y procianidinas C1 puede disminuir los niveles de LOX-1 y COL-I en estos animales.

VII.2 Efecto pro-fibrótico de LDLox/LOX-1 es dependiente de proteína CAV1

Finalmente, se demostró que la vía LDLox vía LOX-1 es dependiente de la proteína CAV1 y como esta proteína es regulada por el factor transcripcional FOXO-1.

VII.2.1 LDLox aumenta los niveles de CAV-1 en MFC.

Lo primero que se observó fue que el estímulo de MFC con LDLox aumentó los niveles de la proteína CAV1 a las 24h y 48 h postratamiento (**Figura 27**), lo que se condice con el aumento de LOX-1 en esta

misma temporalidad (**Figura 10**) e indicaría que el efecto positivo de LDLox sobre su propia vía de señal (LOX-1 y CAV1) durarían 48 h y que existen efectos sobre los MFC inducidos por esta lipoproteína que se mantienen en el tiempo (aumento de COL-I, FN-EDA, proliferación y cambios morfológicos) que pueden dar cuenta de un proceso de cambio de fenotipo que debería ser estudiado. Este resultado a su vez sugirió que el efecto pro-fibrótico de la vía LDLox/LOX-1 en MFC podría depender del aumento de los niveles de CAV1. Para demostrar esto, se silenció la proteína CAV1 en MFC por 18 h y se trataron estas células con LDLox por 24 h. Como se puede observar en la **Figura 28**, el silenciamiento de CAV1 fue capaz de disminuir tanto los niveles basales de LOX-1 y COL-I. Y a su vez fue capaz de prevenir el aumento de estos marcadores inducidos por LDLox en MFC. Este resultado es bastante interesante debido a que CAV1 es una proteína que es reconocida por su rol anti-fibrótico tanto en el corazón como en otros órganos y se ha demostrado que en procesos de fibrosis cardíaca normalmente se encuentra disminuida debido a que CAV1 favorece la activación de macrófagos M1 que poseen un rol antiinflamatorio en el corazón y regula negativamente la vía de TGF- β 1 necesaria para la activación de fibroblastos y la diferenciación a MFC^{137,140}. Pero en el caso de los MFC esta proteína frente al estímulo con LDLox produce un aumento de sus niveles y un potencial efecto pro-fibrótico. Dado que el número de MFC es considerablemente menor que el de otras células cardíacas como cardiomiocitos y fibroblastos residentes es probable que el aumento de CAV1 inducido por LDLox sea imposible de visualizar aunque efectivamente así ocurra. Y se podría hablar de un efecto anti o pro-fibrótico de CAV1 célula específico.

VII.2.2 CAV-1 regula la proliferación de MFC inducida por LDLox.

Debido a CAV1 presenta dentro de sus principales funciones regular la proliferación celular, en especial en células tumorales^{127,203,204}. Se evaluó si el silenciamiento de CAV1 podría prevenir la proliferación celular inducida por los tratamientos con LDLox (**Figura 16**). Lo que se puede apreciar en la **Figura 28**, es que en las células siCAV1-MFC estimuladas con LDLox proliferaron a la misma tasa que los MFC controles, lo que indicaría que esta proteína regula este proceso. Si bien, gran parte de la evidencia indica que caveolina funciona como una proteína supresora de la proliferación, su función parece depender del tipo celular evaluado. Por ejemplo, en cáncer de células no pequeñas del pulmón, ésta proteína favorece la proliferación, mientras que en células pequeñas actúa como una proteína supresora de tumores, en líneas distintas de cáncer de mama se describe un comportamiento similar^{183,203,204}. En la regeneración hepática, los niveles de CAV1 están aumentados y se ha demostrado que en ratones KO-CAV1 este proceso es inhibido, además en hepatocarcinoma, se ha descrito que CAV1 posee un rol anti-apoptótico^{136,205,206}. No existen estudios del rol de CAV1 en MFC de rata adulta, pero a partir de los resultados de esta tesis, podemos decir que en presencia de las LDLox esta proteína actuaría como un regulador positivo de la proliferación celular. Sin embargo, las vías de señales que regularían este proceso deben ser estudiadas.

VII.2.3 FOXO-1 regula CAV-1 en MFC.

Un punto de inicio para estudiar la regulación de CAV-1 fue demostrar si uno de los principales factores transcripcionales reguladores de la expresión de CAV1, FOXO-1, estaría implicado en este proceso¹³⁰. Algunos antecedentes indicaban que las ROS aumentan la actividad de FOXO-1 por activación de JNK, el principal regulador positivo de la actividad transcripcional de FOXO-1²⁰⁷. Como se ha mencionado anteriormente la vía LDLox/LOX-1 activa la NOX-2 y aumenta la producción de ROS. Algunos resultados preliminares realizados en MFC de ratas neonatas nos indicaban que LDLox era capaz de inducir la

desfosforilación de FOXO-1 a tiempos cortos, es decir activación de esta vía, por lo que se planteó evaluar si este estímulo sería capaz de regular los niveles de FOXO-1 en MFC de rata adulta a las 24 h de tratamiento con LDLox (**Figura 30**). Lo que se observó que al igual que CAV1 y LOX-1, los niveles de FOXO-1 aumentaron a las 24 h posterior al estímulo con LDLox y que el silenciamiento de FOXO-1 (aproximadamente un 80%) produjo una disminución de los niveles basales de CAV1 e inhibió el aumento inducido por LDLox en MFC. En el caso del receptor LOX-1 el silenciamiento no afecta los niveles basales de esta proteína, sin embargo, el aumento de los niveles de LOX-1 por el estímulo de LDLox es prevenido en siFOXO-1-MFC. Probablemente lo que ocurre es que al estar silenciado CAV1, no se forman las caveolas y el receptor no se pueda ubicar en la membrana⁶⁸. Esto llevara que el estímulo (LDLox) sea incapaz de inducir la síntesis de LOX-1 y CAV-1 en MFC. Para comprobar esto es preciso verificar por microscopia que LOX-1 no está colocalizado en la membrana plasmática con CAV-1 en células siFOXO y que en las células tratadas con LDLox existe traslocación de FOXO-1 al núcleo.

En síntesis, la señal pro-fibrótica de LDLox/LOX-1 es dependiente de la vía canónica del receptor (NOX-2) y de la proteína CAV1. Los niveles de CAV1 y LOX-1 en presencia de LDLox son regulados por el factor transcripcional FOXO-1. No existen antecedentes bibliográficos de que las LDLox puedan activar al factor transcripcional FOXO-1 o regular sus niveles. Sin embargo, existen antecedentes que las ROS pueden regular la actividad de FOXO²⁰⁸. También Vivar y cols el 2016 establecieron que durante el proceso de diferenciación in vitro a MFC de ratas neonatas este factor de transcripción era de vital importancia²⁰⁹. Los resultados de esta tesis en relación a FOXO-1 son un hallazgo novedoso y los antecedentes bibliográficos sostienen los resultados. Con el fin de dilucidar este tema en un futuro se debería demostrar la fosforilación de FOXO-1 inducido por la señal de LDLox y que realizar ensayos para demostrar la presencia de este factor a nivel nuclear. Adicionalmente determinar si la sobreexpresión de FOXO-1 aumenta los niveles de CAV-1 en MFC.

VIII. CONCLUSIONES.

1. La partícula de LDLox induce un efecto pro-fibrótico en MFC.
2. El efecto pro-fibrótico de LDLox es dependiente del receptor LOX-1 y de la activación de NOXs.
3. El uso de procianidina C1 y lovastatina, inhibidores farmacológicos del receptor, previenen el efecto pro-fibrótico de LDLox en MFC.
4. La señal pro-fibrótica de LDLox es dependiente del aumento de los niveles de CAV1. Y los niveles de CAV1 son regulados por el factor transcripcional FOXO-1.

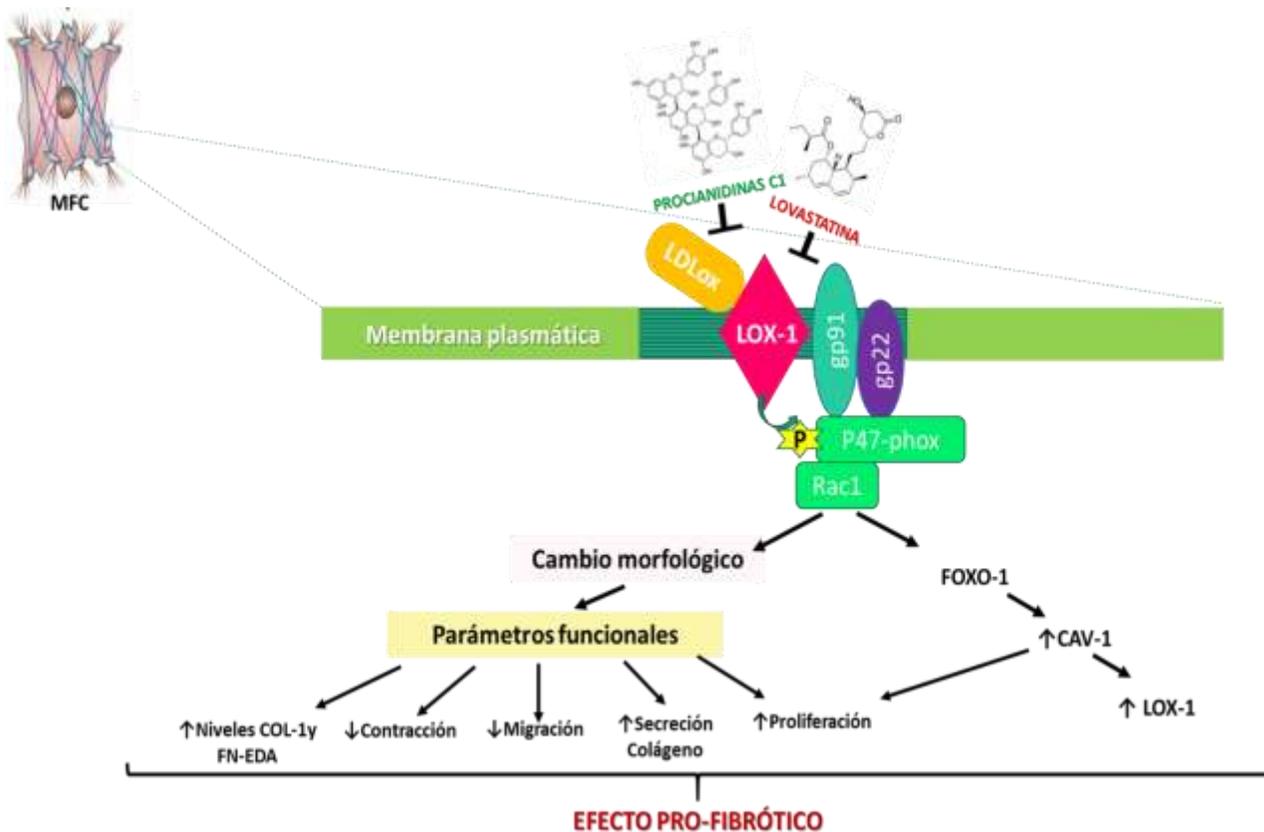


Figura 31. Modelo del mecanismo pro-fibrótico de la vía LDLox/LOX-1 en MFC. LDLox al unir el receptor LOX-1 activa la fosforilación de la subunidad p47 de la enzima NOX-2. Esto acción produciría la variación de los parámetros funcionales y los niveles de las principales proteínas de MEC involucradas en este proceso. La vía es dependiente de la proteína CAV1 debido a que el receptor se ubica en caveolas (regiones ricas en esta proteína y colesterol. Los niveles de CAV1 son regulados por el factor transcripcional FOXO-1.

IX. ANEXO

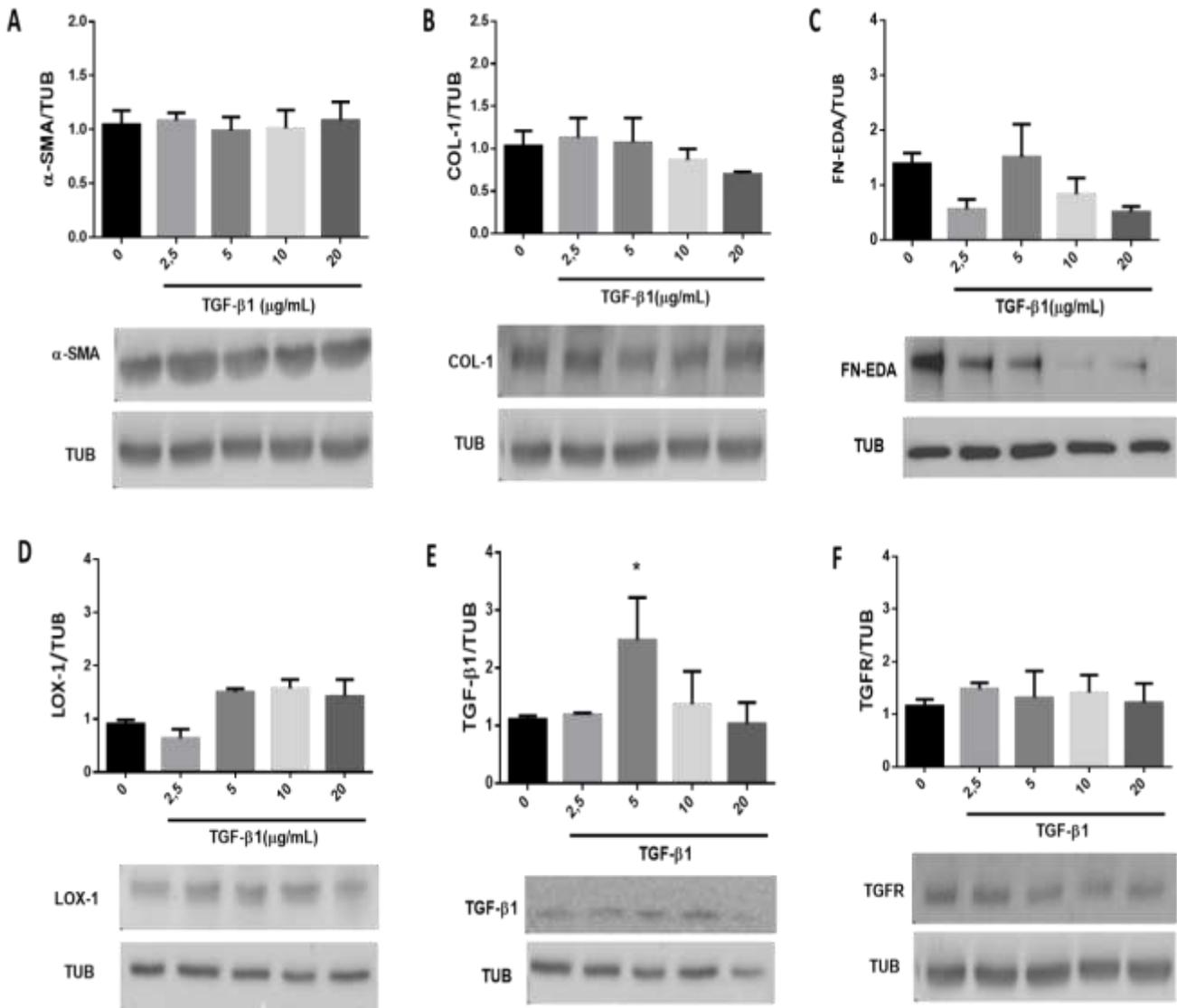


Figura S1. Niveles de α -SMA y FN-EDA en MFC tratados con distintas concentraciones de TGF- β 1 por 24 h. Los MFC fueron tratados con 2,5, 5, 10, 20 μ g/mL de TGF- β 1 por 24 h, como control se usaron MFC sin tratar. **A:** El gráfico muestra la razón entre α -SMA/tubulina. **B:** El gráfico muestra la razón entre COL-1/tubulina. **C:** El gráfico muestra la razón entre FN-EDA/tubulina. **D:** El gráfico muestra la razón entre LOX-1/tubulina. **E:** el gráfico muestra la razón entre TGF- β 1/tubulina. **F:** el gráfico muestra la razón entre TGFR/tubulina. Para cada condición los resultados obtenidos de la cuantificación fueron relativizado con respecto al control sin tratamiento. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con post test de Dunnet. (n=3-5). Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$. El (*) indica diferencia significativa entre los MFC tratados con TGF- β 1 y su respectivo control sin tratamiento (S/T).

X. REFERENCIAS.

1. Mendis, S. *et al.* World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int. J. Epidemiol.* **40**, 139–146 (2011).
2. WHO (World health organization). Cardiovascular disease: On World Heart Day WHO calls for accelerated action to prevent the world's leading global killer. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
3. DEIS (Departamento de Estadísticas e Información de Salud). *No Title.* (2013).
4. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569–582 (2000).
5. Burchfield, J. S., Xie, M. & Hill, J. A. Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation* **128**, 388–400 (2013).
6. Maskali, F. *et al.* Assessment of the early stage of cardiac remodeling of spontaneously hypertensive heart failure rats using the quantitative 3-dimensional analysis provided by acipimox-enhanced FDG-PET. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **30**, 449–456 (2014).
7. Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. R. & Zornoff, L. A. M. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq. Bras. Cardiol.* 62–69 (2016) doi:10.5935/abc.20160005.
8. Heusch, G. *et al.* Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet (London, England)* **383**, 1933–43 (2014).
9. Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E. & Burns, C. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. - PubMed - NCBI. **118**, 1021–1040 (2017).
10. O'Donnell, C. J. & Elosua, R. Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.)* **61**, 299–310 (2008).
11. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries in a case-control study based on the INTERHEART study. *Lancet* **364**, 937–952 (2004).
12. Ashman, J. J. & Beresovsky, V. Multiple Chronic Conditions Among US Adults Who Visited Physician Offices: Data From the National Ambulatory Medical Care Survey, 2009. *Prev. Chronic Dis.* **10**, 120308 (2013).
13. Nagasawa, S. *ya et al.* Relation between serum total cholesterol level and cardiovascular disease stratified by sex and age group: a pooled analysis of 65 594 individuals from 10 cohort studies in Japan. *J. Am. Heart Assoc.* **1**, 1–10 (2012).
14. Wadhera, R. K., Steen, D. L., Khan, I., Giugliano, R. P. & Foody, J. M. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *J. Clin. Lipidol.* **10**, 472–489 (2016).
15. Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 Primeros resultados. *Minist. Salud* (2018).
16. Nelson, R. H. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease Robert. *Prim. Care* **40**, 195–211 (2014).
17. Trpkovic, A. *et al.* Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **52**, 70–85 (2015).
18. Mitra, S., Goyal, T. & Mehta, J. L. Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **25**, 419–429 (2011).
19. Kita, T. *et al.* Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **947**, 199–205; discussion 205-

206 (2001).

20. Ehara, S. *et al.* Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. *J. Diabetes Complications* **16**, 60–64 (2002).
21. Yamashita, S. *et al.* Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients. *Mol. Cell. Biochem.* **299**, 19–22 (2007).
22. Meisinger, C., Baumert, J., Khuseyinova, N., Loewel, H. & Koenig, W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* **112**, 651–657 (2005).
23. Fraley, A. E. *et al.* Relationship of Oxidized Phospholipids and Biomarkers of Oxidized Low-Density Lipoprotein With Cardiovascular Risk Factors, Inflammatory Biomarkers, and Effect of Statin Therapy in Patients With Acute Coronary Syndromes. Results From the MIRACL (Myocardia). *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 2186–2196 (2009).
24. Rahilly-Tierney, C. R., Lawler, E. V., Scranton, R. E. & Michael Gaziano, J. Low-density lipoprotein reduction and magnitude of cardiovascular risk reduction. *Prev. Cardiol.* **12**, 80–87 (2009).
25. Levitan, I., Volkov, S. & Subbaiah, P. V. Oxidized LDL : **13**, (2010).
26. Itabe, H. Oxidized Low-density Lipoproteins : What Is Understood and. *Pathol. Mol. Sci. Pharm.* **26**, (2003).
27. Itabe, H., Obama, T. & Kato, R. The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis. *J. Lipids* **2011**, 1–9 (2011).
28. Henriksen, T., Evensen, S. A. & Carlander, B. Injury to human endothelial cells in culture induced by low density lipoproteins. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **39**, 361–368 (1979).
29. Steinberg, D. & Witztum, J. L. Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2311–2316 (2010).
30. NCBI. Busqueda en PUBMED de las publicaciones que contienen oxLDL en su titulo. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=oxldl>.
31. Frostegård, J. Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease. *Autoimmun. Rev.* **1**, 233–237 (2002).
32. Koenig, W. *et al.* Oxidized LDL and the Risk of Coronary Heart Disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *Clin. Chem.* **57**, 1196–1200 (2011).
33. Gao, S. & Liu, J. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and atherosclerotic cardiovascular disease. *Chronic Dis. Transl. Med.* **3**, 89–94 (2017).
34. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., & Santanam, N. Free Radicals and Antioxidant Protocols. **610**, 403–417 (2010).
35. Dugas, T. R., Morel, D. W. & Harrison, E. H. Impact of LDL carotenoid and alpha-tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture. *J. Lipid Res.* **39**, 999–1007 (1998).
36. Vitro, A. I. N. No Title. **103**, 162–163 (2017).
37. Noguchi, N. & Niki, E. Dynamics of vitamin E action against LDL oxidation. *Free Radic. Res.* **28**, 561–572 (1998).
38. Jessup, W. & Kritharides, L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 473–481 (2000).
39. Aviram, M. & Fuhrman, B. LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: Role of prooxidants vs. antioxidants. *Mol. Cell. Biochem.* **188**, 149–159

(1998).

40. Kruth, H. S., Huang, W., Ishii, I. & Zhang, W.-Y. Macrophage Foam Cell Formation with Native Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **277**, 34573–34580 (2002).
41. Seo, J. W., Yang, E. J., Yoo, K. H. & Choi, I. H. Macrophage differentiation from monocytes is influenced by the lipid oxidation degree of low density lipoprotein. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
42. Di Pietro, N., Formoso, G. & Pandolfi, A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* **84**, 1–7 (2016).
43. Kiyari, Y. *et al.* OxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **66**, 72–82 (2014).
44. Badrnya, S. *et al.* Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 571–580 (2014).
45. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. History of Discovery : The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb.* **29**, 431–438 (2010).
46. Moore, K. J. & Freeman, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1702–1711 (2006).
47. Zani, I. A. *et al.* Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells* **4**, 178–201 (2015).
48. Sawamura, T. *et al.* An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* vol. 386 73–77 (1997).
49. Ogura, S. *et al.* Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction. *Circ. J.* **73**, 1993–1999 (2009).
50. Yokoyama, C. *et al.* Deletion of LOX-1 protects against heart failure induced by doxorubicin. *PLoS One* **11**, 1–21 (2016).
51. Ohki, I. *et al.* Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL. *Structure* **13**, 905–917 (2005).
52. Xie, Q. *et al.* Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells. *DNA Cell Biol.* **23**, 111–117 (2004).
53. Falconi, M., Biocca, S., Novelli, G. & Desideri, A. Molecular dynamics simulation of human LOX-1 provides an explanation for the lack of OxLDL binding to the Trp150Ala mutant. *BMC Struct. Biol.* **7**, 1–11 (2007).
54. Thakkar, S. *et al.* Structure-based Design Targeted at LOX-1, a Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).
55. Knowles, J. W. *et al.* Failure to replicate an association of SNPs in the oxidized LDL receptor gene (OLR1) with CAD. *BMC Med. Genet.* **9**, 1–11 (2008).
56. Aoyama, T. *et al.* Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene. *Biochem. J.* **339** (Pt 1, 177–84 (1999).
57. NCBI. OLR1 oxidized low density lipoprotein receptor 1 Homo sapiens (human). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4973>.
58. Camus, V. Análisis bioinformático comparativo del gen que codifica para el receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas LOX-1 en rata, ratón y humano. (Universidad de Cgile, 2015).
59. Mehta, J. L. & Basnakian, A. G. Interaction of carbamylated LDL with LOX-1 in the induction of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **35**, 2996–2997 (2014).
60. Lee, A. S. *et al.* Human electronegative low-density lipoprotein modulates cardiac repolarization via LOX-

- 1-mediated alteration of sarcolemmal ion channels. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
61. Pirillo, A. *et al.* Upregulation of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human endothelial cells by modified high density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **428**, 230–233 (2012).
 62. Yoshimoto, R. *et al.* The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **25**, 379–391 (2011).
 63. Thériault, J. R., Mambula, S. S., Sawamura, T., Stevenson, M. A. & Calderwood, S. K. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.* **579**, 1951–1960 (2005).
 64. Xu, S. *et al.* LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. **70**, 2859–2872 (2013).
 65. Hofnagel, O. *et al.* Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1789–1795 (2004).
 66. Taye, A. & El-Sheikh, A. A. K. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 740–745 (2013).
 67. Kumano-Kuramochi, M. *et al.* Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is palmitoylated and internalizes ligands via caveolae/raft-dependent endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 594–599 (2013).
 68. Sun, S. W. *et al.* Caveolae and caveolin-1 mediate endocytosis and transcytosis of oxidized low density lipoprotein in endothelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **31**, 1336–1342 (2010).
 69. Murphy, J. E. *et al.* Oxidised LDL internalisation by the LOX-1 scavenger receptor is dependent on a novel cytoplasmic motif and is regulated by dynamin-2. *J. Cell Sci.* **121**, 2136–2147 (2008).
 70. Tsai, K. L. *et al.* Coenzyme Q10 suppresses oxLDL-induced endothelial oxidative injuries by the modulation of LOX-1-mediated ROS generation via the AMPK/PKC/NADPH oxidase signaling pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 227–240 (2011).
 71. Cominacini, L. *et al.* Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) Binding to ox-LDL Receptor-1 in Endothelial Cells Induces the Activation of NF-kappa B through an Increased Production of Intracellular Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **275**, 12633–12638 (2000).
 72. Kataoka, H. *et al.* Expression of Lectinlike Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Online* (1999) doi:10.1161/01.CIR.99.24.3110.
 73. Chen, M. *et al.* Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 153–158 (2001).
 74. Kume, N. *et al.* Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **902**, 323–7 (2000).
 75. Wang, X. *et al.* Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and cardiac fibroblast growth. *Hypertension* **60**, 1437–1442 (2012).
 76. Díaz, H. Efecto de oxLDL y TNF-alfa en el fenotipo y expresión del receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada (LOX-1) en miofibroblastos cardíacos. Tesis de Magister en Bioquímica. 2015. (Universidad de Chile).
 77. Chen, K. *et al.* Adhesion molecule expression in fibroblasts: Alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids. *Hypertension* **46**, 622–627 (2005).
 78. Li, D. *et al.* LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of MMP-1 and inflammation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1795-801 (2002).
 79. Cruvinel, W. D. M. *et al.* Fundamentals of innate immunity with. *Bras J Rheumatol* **55**, (2010).

80. Wynn, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **46**, 26–32 (2008).
81. Bochaton-Piallat, M.-L., Gabbiani, G. & Hinz, B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Research* **5**, 752 (2016).
82. Borthwick, L Wynn, T Fisher, A. Cytokine mediated tissue fibrosis. **40**, 1301–1315.
83. Pohlers, D. *et al.* TGF- β and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1792**, 746–756 (2009).
84. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 526–537 (2007).
85. Li, L., Zhao, Q. & Kong, W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol.* 1–17 (2018) doi:10.1016/j.matbio.2018.01.013.
86. Mewton, N., Liu, C. Y., Croisille, P., Bluemke, D. & Lima, J. A. C. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 891–903 (2011).
87. Banerjee, I. *et al.* Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am. Physiol.* **293**, 1883–1891 (2007).
88. Baum, J. & Duffy, H. S. Fibroblasts and myofibroblasts: What are we talking about? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**, 376–379 (2011).
89. Fan, D., Takawale, A., Lee, J. & Kassiri, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 15 (2012).
90. Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G. & Daemen, M. J. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am. J. Pathol.* **145**, 868–875 (1994).
91. Campbell, S. E. & Katwa, L. C. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1947–1958 (1997).
92. Katwa, L. C. *et al.* Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1375–1386 (1997).
93. Fan, Z. & Guan, J. Antifibrotic therapies to control cardiac fibrosis. *Biomater. Res.* **20**, 1–13 (2016).
94. Gourdie, R. G., Dimmeler, S. & Kohl, P. Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 620–638 (2016).
95. Edgley, A. J., Krum, H. & Kelly, D. J. Targeting fibrosis for the treatment of heart failure: A role for transforming growth factor- β . *Cardiovasc. Ther.* **30**, 30–40 (2012).
96. Leask, A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF β , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ. Res.* **106**, 1675–1680 (2010).
97. Deng, B; Shen, L; Wu, Y; Shen, L; Ding, X; Lu, S; Jia, J; Qian, J; Ge, J. Delivery of alginate-chitosan hydrogel promotes endogenous repair and preserves cardiac function in rats with myocardial infarction. 1–28 (2015) doi:10.1002/eji.201445427.This.
98. Weber, K. T., Sun, Y., Bhattacharya, S. K., Ahokas, R. A. & Gerling, I. C. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat. Rev. Cardiol.* **10**, 15–26 (2013).
99. Turner, N. A. & Porter, K. E. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenes. Tissue Repair* **6**, 1 (2013).
100. Lu, J. *et al.* LOX-1 abrogation reduces cardiac hypertrophy and collagen accumulation following chronic ischemia in the mouse. *Gene Ther.* **19**, 522–531 (2012).
101. Hu, C. *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.* **283**, 10226–10231 (2008).
102. Karadeniz, G. *et al.* Oxidized low-density-lipoprotein accumulation is associated with liver fibrosis in experimental cholestasis. *Clinics (Sao Paulo)*. **63**, 531–540 (2008).
 103. Chatauret, N. *et al.* Diet-induced increase in plasma oxidized LDL promotes early fibrosis in a renal porcine auto-transplantation model. *J. Transl. Med.* **12**, 1–11 (2014).
 104. Kang, B. Y., Wang, W., Palade, P., Sharma, S. G. & Mehta, J. L. Cardiac hypertrophy during hypercholesterolemia and its amelioration with rosuvastatin and amlodipine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **54**, 327–334 (2009).
 105. Mehrabi, M. R. *et al.* Accumulation of oxidized LDL in human semilunar valves correlates with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **45**, 874–882 (2000).
 106. Aluganti Narasimhulu, C. *et al.* Increased presence of oxidized low-density lipoprotein in the left ventricular blood of subjects with cardiovascular disease. *Physiol. Rep.* **4**, 1–12 (2016).
 107. Tsutsui, T. *et al.* Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 957–962 (2002).
 108. Draude, G. & Lorenz, R. L. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H1042–H1048 (2000).
 109. Minami, M. *et al.* Transforming growth factor- β 1 increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 357–361 (2000).
 110. NISHIZUKA, T. *et al.* Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **87**, 104–113 (2011).
 111. Falconi, M. *et al.* Design of a novel LOX-1 receptor antagonist mimicking the natural substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 340–345 (2013).
 112. Biocca, S. *et al.* Molecular mechanism of statin-mediated LOX-1 inhibition. 1583–1595 (2015).
 113. Hurlstone, a F. *et al.* Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene* **18**, 1881–1890 (1999).
 114. Williams, T. M. & Lisanti, M. P. The caveolin proteins. *Genome Biol.* **5**, 1–8 (2004).
 115. Li, W. P., Liu, P., Pilcher, B. K. & Anderson, R. G. Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J. Cell Sci.* **114**, 1397–1408 (2001).
 116. Gupta, R., Toufaily, C. & Annabi, B. Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie* **107**, 188–202 (2014).
 117. Jin, Y., Lee, S., Minshall, R. D. & Choi, A. M. K. Caveolin-1 : a critical regulator of lung injury. **1**, (2011).
 118. Wang, N. *et al.* Lipopolysaccharide-induced caveolin-1 phosphorylation-dependent increase in transcellular permeability precedes the increase in paracellular permeability. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 4965–4977 (2015).
 119. Cheung C, Li S, Chen S, B. R. Regulation of Caveolin-1 Expression and Phosphorylation by VEGF in Ovine Amnion Cells Cecilia. **6**, 1112–1119 (2013).
 120. Timme, T. L. *et al.* Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* **19**, 3256–3265 (2000).
 121. Nunez-Wehinger, S. *et al.* Caveolin-1 in Cell Migration and Metastasis. *Curr. Mol. Med.* **14**, 255–274 (2014).

122. Mayoral, R. *et al.* Impairment of Transforming Growth Factor Signaling in Caveolin-1-deficient hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **285**, 3633–3642 (2010).
123. Mierke, J. *et al.* Atheroprotective role of Caveolin-1 and eNOS in an innovative transplantation model is mainly mediated by local effects. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 529–536 (2017).
124. Zou, H., Stoppani, E., Volonte, D. & Galbiati, F. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. *Mech. Ageing Dev.* **132**, 533–542 (2011).
125. Sanders, Y. Y. *et al.* SMAD-independent down-regulation of caveolin-1 by TGF- β : Effects on proliferation and survival of myofibroblasts. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
126. Nguyen, K. C. T. & Cho, K. A. Versatile Functions of Caveolin-1 in Aging-related Diseases. *Chonnam Med. J.* **53**, 28–36 (2017).
127. Torres, V. A. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J. Cell Sci.* **119**, 1812–1823 (2006).
128. Liu, P., Wang, P. Y., Michaely, P., Zhu, M. & Anderson, R. G. W. Presence of oxidized cholesterol in caveolae uncouples active platelet-derived growth factor receptors from tyrosine kinase substrates. *J. Biol. Chem.* **275**, 31648–31654 (2000).
129. Couet, J., Sargiacomo, M. & Lisanti, M. P. Interaction of a receptor tyrosine kinase , EGF-R , with caveolins. *J. Biol. Chem.* **272**, 30429–30438 (1997).
130. van den Heuvel, A. P. J., Schulze, A. & Burgering, B. M. T. Direct control of caveolin-1 expression by FOXO transcription factors. *Biochem. J.* **385**, 795–802 (2005).
131. Wu, C. C. *et al.* OxLDL upregulates caveolin-1 expression in macrophages: Role for caveolin-1 in the adhesion of oxLDL-treated macrophages to endothelium. *J. Cell. Biochem.* **107**, 460–472 (2009).
132. Wu, D. & Terrian, D. M. Regulation of caveolin-1 expression and secretion by a protein kinase C ϵ signaling pathway in human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 40449–40455 (2002).
133. Tourkina, E. Caveolin-1 Signaling in Lung Fibrosis. *Open Rheumatol. J.* **6**, 116–122 (2012).
134. Tourkina, E. *et al.* Antifibrotic properties of caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **294**, L843-61 (2008).
135. Gvaramia, D., Blaauboer, M. E., Hanemaaijer, R. & Everts, V. Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. *Matrix Biol.* **32**, 307–315 (2013).
136. Martin, S. *et al.* Caveolin-1 Deficiency Leads to Increased Susceptibility to Cell Death and Fibrosis in White Adipose Tissue: Characterization of a Lipodystrophic Model. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
137. Shihata, W. A., Putra, M. R. A. & Chin-Dusting, J. P. F. Is There a Potential Therapeutic Role for Caveolin-1 in Fibrosis? *Front. Pharmacol.* **8**, 1–8 (2017).
138. Haines, P., Hant, F. N., Lafyatis, R., Trojanowska, M. & Bujor, A. M. Elevated expression of cav-1 in a subset of SSc fibroblasts contributes to constitutive Alk1/Smad1 activation. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2238–2246 (2012).
139. Miyasato, S. K. *et al.* Caveolin-1 modulates TGF- β 1 signaling in cardiac remodeling. *Matrix Biol.* **30**, 318–329 (2011).
140. Shivshankar, P. *et al.* Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **47**, 28–36 (2012).
141. Lee, E. K., Lee, Y. S., Han, I. O. & Park, S. H. Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF- β 1 through down-regulating the expression of TGF- β type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 385–390 (2007).

142. Aránguiz-Urroz, P. *et al.* Beta2-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1812**, 23–31 (2011).
143. Mehta, J. L. & Li, D. Y. Identification and autoregulation of receptor for ox-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 511–514 (1998).
144. Liu, J., Ren, Y., Kang, L. & Zhang, L. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 1341–1347 (2014).
145. Giannandrea, M. & Parks, W. C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *DMM Dis. Model. Mech.* **7**, 193–203 (2014).
146. Defawe, O. D. *et al.* MMP-9 regulates both positively and negatively collagen gel contraction: A nonproteolytic function of MMP-9. *Cardiovasc. Res.* **66**, 402–409 (2005).
147. Weng, C. H. *et al.* Pleiotropic Effects of Myocardial MMP-9 Inhibition to Prevent Ventricular Arrhythmia. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
148. Hara, H., Takeda, N. & Komuro, I. Pathophysiology and therapeutic potential of cardiac fibrosis. *Inflamm. Regen.* **37**, 13 (2017).
149. Ma, Z. G., Yuan, Y. P., Wu, H. M., Zhang, X. & Tang, Q. Z. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 1645–1657 (2018).
150. Frantz, S. *et al.* Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **103**, 485–492 (2008).
151. Dixon, I. M. C. *et al.* Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide. *Circ. Res.* **5**, 376–379 (2016).
152. Alexanian, M. & Haldar, S. M. The Cardiac Myofibroblast. *Circ. Res.* **123**, 1258–1260 (2018).
153. Yazdani, S., Bansal, R. & Prakash, J. Drug targeting to myofibroblasts: Implications for fibrosis and cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **121**, 101–116 (2017).
154. Schlüter, K. D., Wolf, A., Weber, M., Schreckenberger, R. & Schulz, R. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) affects load-free cell shortening of cardiomyocytes in a proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)-dependent way. *Basic Res. Cardiol.* **112**, 1–11 (2017).
155. Fearon, I. M. OxLDL enhances L-type Ca²⁺ currents via lysophosphatidylcholine- induced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production. *Cardiovasc. Res.* **69**, 855–864 (2006).
156. Kataoka, K. *et al.* LOX-1 pathway affects the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 656–660 (2003).
157. Wang, H. H., Hsieh, H. L., Wu, C. Y., Sun, C. C. & Yang, C. M. Oxidized low-density lipoprotein induces matrix metalloproteinase-9 expression via a p42/p44 and JNK-dependent AP-1 pathway in brain astrocytes. *Glia* **57**, 24–38 (2009).
158. Wang, J. *et al.* oxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae. *Biosci. Rep.* **0**, BSR20180283 (2018).
159. Watt, J. *et al.* The relationship between oxidised LDL, endothelial progenitor cells and coronary endothelial function in patients with CHD. *Open Hear.* **3**, e000342 (2016).
160. Galle, J., Heinloth, A., Wanner, C. & Heermeier, K. Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int Suppl* **78**, S120-3 (2001).
161. Bowers, S. L. K., Banerjee, I. & Baudino, T. A. The extracellular matrix: At the center of it all. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 474–482 (2010).
162. Wiltz, D. *et al.* Extracellular Matrix Organization, Structure, and Function. in *Calcific Aortic Valve Disease*

vol. 2 64 (InTech, 2013).

163. Singh, P., Carraher, C. & Schwarzbauer, J. E. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 397–419 (2010).
164. Booth, A. J. *et al.* Recipient-derived EDA fibronectin promotes cardiac allograft fibrosis. *J. Pathol.* **226**, 609–618 (2012).
165. Absood, A. A comparison of oxidized LDL-induced collagen secretion by graft and aortic SMCs: role of PDGF. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **287**, H1200–H1206 (2004).
166. Lijnen, P., Papparella, I., Petrov, V., Semplicini, A. & Fagard, R. Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. *J. Hypertens.* **24**, 757–766 (2006).
167. Sanda, G. M. *et al.* Oxidized LDL-Exposed Human Macrophages Display Increased MMP-9 Expression and Secretion Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Cell. Biochem.* **118**, 661–669 (2017).
168. Cao, J. *et al.* Curcumin alleviates oxLDL induced MMP-9 and EMMPRIN expression through the inhibition of NF- κ b and mapk pathways in macrophages. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–9 (2017).
169. Ducharme, A. *et al.* Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* **106**, 55–62 (2000).
170. Al-Yafeai, Z. *et al.* Endothelial FN (Fibronectin) Deposition by α 5 β 1 Integrins Drives Atherogenic Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 2601–2614 (2018).
171. Klingberg, F. *et al.* The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- β -binding protein-1 to the fibroblast matrix. *J. Cell Sci.* **131**, jcs201293 (2018).
172. Ventura, E. *et al.* TGF- β induces oncofetal fibronectin that, in turn, modulates TGF- β superfamily signaling in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **131**, jcs209619 (2018).
173. Ding, G., Van Goor, H., Ricardo, S. D., Orlowski, J. M. & Diamond, J. R. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF- β and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* **51**, 147–154 (1997).
174. Liu, X. *et al.* Trimetazidine inhibits pressure overload-induced cardiac fibrosis through NADPH oxidase-ROS-CTGF pathway. *Cardiovasc. Res.* **88**, 150–158 (2010).
175. Khankan, R., Oliver, N., He, S., Ryan, S. J. & Hinton, D. R. Regulation of fibronectin-EDA through CTGF domain-specific interactions with TGF β 2 and its receptor TGF β RII. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 5068–5078 (2011).
176. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. LOX-1-mediated effects on vascular cells in atherosclerosis. *Cell. Physiol. Biochem.* **38**, 1851–1859 (2016).
177. Chouinard, J. A., Grenier, G., Khalil, A. & Vermette, P. Oxidized-LDL induce morphological changes and increase stiffness of endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **314**, 3007–3016 (2008).
178. Massaeli, H., Hurtado, C., Austria, J. A. & Pierce, G. N. Oxidized low-density lipoprotein induces cytoskeletal disorganization in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **277**, H2017-25 (1999).
179. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. NIH Public Access. **463**, 485–492 (2010).
180. Van Aalst, J. A. *et al.* Role of reactive oxygen species in inhibition of endothelial cell migration by oxidized low-density lipoprotein. *J. Vasc. Surg.* **40**, 1208–1215 (2004).
181. Zettler, M. E. *et al.* OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H644-53 (2003).
182. Seibold, S. Oxidized LDL Induces Proliferation and Hypertrophy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells via Regulation of p27Kip1 Expression: Role of RhoA. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 3026–3034 (2004).

183. Zhang, C. *et al.* oxLDL induces endothelial cell proliferation via Rho/ROCK/Akt/p27^{kip1} signaling: opposite effects of oxLDL and cholesterol loading. *Am. J. Physiol. Physiol.* **313**, C340–C351 (2017).
184. Li, S. J. *et al.* The high-fat diet induces myocardial fibrosis in the metabolically healthy obese minipigs—The role of ER stress and oxidative stress. *Clin. Nutr.* **36**, 760–767 (2017).
185. Khorrami, A., Garjani, A., Bagheri, B., Maleki-Dizaji, N. & Ziaee, M. Comparison of the effects of hypercholesterolemic diets on biochemical outcomes of myocardial infarction in rats. *Int. Cardiovasc. Res. J.* **12**, 22–28 (2018).
186. Watanabe, S. *et al.* A High-Fat and High-Cholesterol Diet Induces Cardiac Fibrosis, Vascular Endothelial, and Left Ventricular Diastolic Dysfunction in SHRSP5/Dmcr Rats. *J. Atheroscler. Thromb.* **25**, 439–453 (2018).
187. Shiou, Y.-L., Huang, I.-C., Lin, H.-T. & Lee, H.-C. High fat diet aggravates atrial and ventricular remodeling of hypertensive heart disease in aging rats. *J. Formos. Med. Assoc.* **117**, 621–631 (2018).
188. Van Tits, L. *et al.* Increased levels of low-density lipoprotein oxidation in patients with familial hypercholesterolemia and in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Lab. Investig.* **83**, 13–21 (2003).
189. Álvarez, E. *et al.* Procyanidins from grape pomace are suitable inhibitors of human endothelial NADPH oxidase. *J. Cell. Biochem.* **113**, 1386–1396 (2012).
190. Patel, H. H. & Insel, P. A. Lipid Rafts and Caveolae and Their Role in Compartmentation of Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1357–1372 (2009).
191. Akahori, H. *et al.* Atorvastatin ameliorates cardiac fibrosis and improves left ventricular diastolic function in hypertensive diastolic heart failure model rats. *J. Hypertens.* **32**, 1534–1541 (2014).
192. Elmadbouh, I. *et al.* Atorvastatin improves cardiac function and remodeling in chronic non-ischemic heart failure: A clinical and pre-clinical study. *Egypt. Hear. J.* **67**, 289–298 (2015).
193. deFilippi, C. *et al.* Statin Effects on Myocardial Fibrosis Markers in People Living with HIV. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1** (2018) doi:10.1097/QAI.0000000000001644.
194. Martín-Fernández, B. *et al.* Beneficial effects of proanthocyanidins in the cardiac alterations induced by aldosterone in rat heart through mineralocorticoid receptor blockade. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
195. Zhang, L. *et al.* The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. *Food Funct.* **7**, 1273–1281 (2016).
196. Biao, L. *et al.* Green Synthesis, Characterization and Application of Proanthocyanidins-Functionalized Gold Nanoparticles. *Nanomaterials* **8**, 53 (2018).
197. Liang, M. *et al.* Facile in situ synthesis of silver nanoparticles on procyanidin-grafted eggshell membrane and their catalytic properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 4638–4649 (2014).
198. Shin, M. *et al.* Targeting protein and peptide therapeutics to the heart via tannic acid modification. *Nat. Biomed. Eng.* **2**, 304–317 (2018).
199. Lopes, L. C. S. *et al.* Silver and gold nanoparticles from tannic acid: Synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities. *An. Acad. Bras. Cienc.* **90**, 2679–2689 (2018).
200. Kassi, E. *et al.* Circulating oxidized LDL levels, current smoking and obesity in postmenopausal women. *Atherosclerosis* **205**, 279–283 (2009).
201. Njajou, O. T. & Kanaya, A. M. Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes/metabolism* **25**, 733–739 (2009).
202. Martins, F. *et al.* High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model of Obesity. *Arq.*

Bras. Cardiol. 479–486 (2015) doi:10.5935/abc.20150095.

203. Luan, T. Y. *et al.* Expression of caveolin-1 is correlated with lung adenocarcinoma proliferation, migration, and invasion. *Med. Oncol.* **32**, 1–11 (2015).
204. Yeh, D. *et al.* Caveolin-1 is an Important Factor for the Metastasis and Proliferation of Human Small Cell Lung Cancer NCI-H446 Cell. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **292**, 1584–1592 (2009).
205. Fernández, M. A. *et al.* Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science (80-.)*. **313**, 1628–1632 (2006).
206. Tse, E. Y. T. *et al.* Caveolin-1 Overexpression is Associated With Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis and Metastasis. *J. Pathol.* 645–653 (2011) doi:10.1002/path.3957.
207. Shen, B., Chao, L. & Chao, J. Pivotal role of JNK-dependent FOXO1 activation in downregulation of kallistatin expression by oxidative stress. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **298**, 1048–1054 (2010).
208. Klotz, L. O. *et al.* Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* **6**, 51–72 (2015).
209. Vivar, R. *et al.* FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 128–138 (2016).