

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“EFECTO DEL PÉPTIDO ANGIOTENSINA-(1-9) SOBRE LA
DESDIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS
VASCULARES”**

Tesis presentada para optar al grado académico de
Doctor en Farmacología por:

IGNACIO ESTEBAN NORAMBUENA SOTO

Director de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

Santiago, Chile

2020

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

IGNACIO ESTEBAN NORAMBUENA SOTO

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día ____ de _____ de 2020.

Director de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Ramón Rodrigo (Presidente)

Dr. Claudio Cabello

Dr. Manuel Estrada

Dr. Luis Sobrevia

Para Victoria Barraza

Agradecimientos

Quiero agradecer al profe Mario, por confiar en mi corta experiencia como investigador en el comienzo de esta tesis, ya ue sin su ayuda habría sido muy difícil alcanzar la experiencia necesaria para un doctor en farmacología y mucho menos podría haber terminado esta tesis, pero por sobre todo por las enseñanzas fuera de la investigación, aprendí mucho sobre responsabilidad laboral en el laboratorio y el gusto por la docencia gracias a usted. Por otra parte, agradecer al porfe Sergio y su laboratorio que me acogió en seminarios y celebraciones a pesar de trabajar en un tema que la mayoría no conocía.

A la señora Gindra, siempre tan dispuesta a ayudarme cuando lo necesitaba, pero por sobre todo a las infinitas conversaciones para alegrar el día.

Al maestro Fidel, por todas las historias del laboratorio y la excelente disposición que tiene para solucionar cualquier problema.

A todo el grupo del laboratorio del profe Mario, los chiongcitos, que siempre me hicieron sentir como un aporte a las problemáticas del lab.

A mi familia, los cuales nunca han duda de mis capacidades y que no importa el camino que tome, siempre estarán ahí para darme una mano cuando lo necesite.

Y por último, a Victoria, mi compañera absoluta de esta aventura, a veces un poco tortuosa pero a pesar de eso siempre estuvo y está ahí para apoyarme y levantarme. Lejos la mejor, y la persona a la que le debo gran parte de este logro.

Gracias.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	ii
Índice de figuras.....	vi
Financiamiento.....	viii
Publicaciones y difusión.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumen	xiv
Abstract.....	xvi
I. Antecedentes.....	1
I.1. Enfermedades cardiovasculares.....	1
I.2. Vasos Sanguíneos.....	3
I.3. Células de musculo liso vascular	5
I.4. Desdiferenciación patológica	6
I.5. Sistema Renina-Angiotensina.....	8
I.6. Receptor AT2.....	9
I.7. Angiotensina-(1-9)	10
I.8. Factor transcripcional FoxO1	13
I.9. FoxO1 en diferenciación	13
I.10. FoxO1 en VSMC.....	14
II. Hipótesis	16
III. Objetivo general.....	16
IV. Objetivos específicos:.....	16
V. Metodología.....	17
V.1. Cultivo celular	17
V.2. Tratamientos de las células	17
V.3. Migración por Ensayo de Herida	18
V.4. Migración por Ensayo Transwell.....	19
V.5. Western blot	19
V.6. Inmunofluorescencia	20
V.7. Ciclo celular	21
V.8. Fraccionamiento celular.....	21
V.9. Análisis estadístico	22

VI. Resultados.....	23
VI.1. Determinación de la concentración efectiva de Ang-(1-9)	23
VI.1.1. Efecto de Ang-(1-9) sobre la migración celular.....	23
VI.1.2. Efecto de Ang-(1-9) sobre los niveles proteicos de calponina	24
VI.2. Evaluación del efecto de los antagonistas de AT2R y MasR.....	26
VI.2.1. Efecto de los antagonistas de AT2R y MasR sobre la migración celular	26
VI.2.2. Efecto de los antagonistas de AT2R y MasR sobre los niveles de proteínas contráctiles.....	26
VI.3. Obj. 1. Determinar si Angiotensina-(1-9) previene el cambio de fenotipo de las VSMC inducido por PDGF-BB mediante el receptor AT2. .	29
VI.3.1. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre la migración celular	29
VI.3.2. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre los niveles de proteínas contráctiles.....	32
VI.3.3. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre la proliferación celular	35
VI.3.4. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre la desdiferenciación en cultivo primario de VSMC.....	41
VI.4. Obj. 2. Evaluar si Angiotensina-(1-9) activa FoxO1 a través de la inhibición de Akt.....	43
VI.4.1. Efecto de Ang-(1-9) sobre los niveles de fosforilación de Akt y FoxO1	43
VI.4.2. Efecto de Ang-(1-9) sobre la localización celular de FoxO1	46
VI.4.3. Evaluación de PD123319 y Akt-Myr en el efecto de Ang-(1-9) sobre los niveles de fosforilación de Akt y FoxO1.....	48
VI.5. Obj. 3. Determinar si la activación de FoxO1 por Angiotensina-(1-9) inhibe la desdiferenciación de las VSMC inducido por PDGF-BB.....	51
VI.5.1. Estandarización del silenciamiento de FoxO1	51
VI.5.2. Efecto de la inhibición de FoxO1 sobre los niveles de proteínas contráctiles.....	53
VI.5.3. Efecto de la inhibición de FoxO1 sobre la proliferación celular ...	53
VI.5.4. Efecto de la inhibición de FoxO1 sobre la migración celular	56
VI.5.5. Efecto de siFoxO1 sobre la desdiferenciación en un cultivo primario de VSMC.....	59
VI.5.6. Efecto de la sobreexpresión de FoxO1 sobre la desdiferenciación de VSMC.....	61

VII. Discusión	64
VII.1 Concentración de Ang-(1-9)	65
VII.2. Ang-(1-9) e inhibición de la desdiferenciación de las VSMC	66
VII.3. Ang-(1-9) y AT2R	68
VII.4. Ang-(1-9) y Akt	70
VII.5. Ang-(1-9) y FoxO1	72
VIII. Conclusiones	77
IX. Bibliografía.....	78

Índice de figuras

Figura 1. Principales causas de muerte según OMS	2
Figura 2. Composición anatómica de las arterias.	4
Figura 3. Desdiferenciación patológica de las células musculares lisas vasculares.....	7
Figura 4. Componentes del Sistema Renina-Angiotensina (RAS).	9
Figura 5. Efecto de Ang-(1-9) 100 μ M sobre la fosforilación Akt y FoxO1. .	12
Figura 6. Dosis-respuesta de Ang-(1-9) frente a la migración y la disminución de proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC.....	25
Figura 7. Efecto de los antagonistas de AT2R y MasR frente a la migración de las VSMC A7r5 inducida por PDGF-BB.	27
Figura 8. Efecto de antagonistas de AT2R y MasR frente a la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC...	28
Figura 9. Ang-(1-9) previene el cierre de herida inducida por PDGF-BB en VSMC dependiente de AT2R.....	30
Figura 10. Ang-(1-9) previene la migración inducida por PDGF-BB en VSMC dependiente de AT2R.	31
Figura 11. Ang-(1-9) previene la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC A7r5 dependiente de AT2R. ...	33
Figura 12. Ang-(1-9) previene la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC A7r5 por un mecanismo independiente de MasR.	34
Figura 13. Ang-(1-9) previene el aumento de Ki67 inducida por PDGF-BB en VSMC.....	36
Figura 14. Ang-(1-9) previene el aumento en las poblaciones S y G2/M del ciclo celular inducido por PDGF-BB en VSMC.....	37
Figura 15. Ang-(1-9) previene el aumento en las poblaciones S y G2/M del ciclo celular inducido por PDGF-BB en VSMC, mediante AT2R..	39

Figura 16. Ang-(1-9) previene el aumento ciclina D1 inducida por PDGF-BB en VSMC dependiente de AT2R.....	40
Figura 17. Ang-(1-9) previene la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB en cultivo primario dependiente de AT2R.	42
Figura 18. Efecto de Ang-(1-9) 1 uM sobre la fosforilación de Akt.....	44
Figura 19. Efecto de Ang-(1-9) 1 uM sobre la fosforilación de FoxO1.	45
Figura 20. Ang-(1-9) promueve la localización nuclear de FoxO1.	47
Figura 21. PD12319 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre el aumento de los niveles de FoxO1.	49
Figura 22. La sobreexpresión de Akt-Myr bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre el aumento de los niveles de FoxO1.	50
Figura 23. Estandarización silenciamiento de FoxO1 en el tiempo.....	52
Figura 24. El silenciamiento de FoxO1 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB.	54
Figura 25. AS1842856 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la disminución de proteínas contráctiles de las VSMC inducida por PDGF-BB...	55
Figura 26. El silenciamiento de FoxO1 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la migración de las VSMC inducida por PDGF-BB.	57
Figura 27. AS1842856 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la migración inducida por PDGF-BB en VSMC.	58
Figura 28. El silenciamiento de FoxO1 bloquea efecto de Ang-(1-9) sobre la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB en RASMC.....	60
Figura 29. Sobreexpresión de FoxO1 previene la disminución de proteínas contráctiles de las VSMC inducida por PDGF-BB.....	62
Figura 30. Sobreexpresión de FoxO1 previene la migración de las VSMC inducida por PDGF-BB.....	63
Figura 31. Modelo final	¡Error! Marcador no definido.

Financiamiento

Beca CONICYT Doctorado 21160700 (Ignacio Norambuena)

Proyecto FONDECYT 1140329 (Mario Chiong)

Proyecto FONDAP 15130011 (Mario Chiong)

Publicaciones y difusión

a) Publicaciones en revistas internacionales

Angiotensin-(1-9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1 dependent mechanism.

Norambuena-Soto I, Ocaranza MP, Cancino-Arenas N, Sanhueza-Olivares F, Villar-Fincheira P, Leiva-Navarrete S, Mancilla C, Moya J, Jalil JE, Castro PF, Lavandero S, Chiong M. Biochem Pharmacol 2020 Aug 5:114190. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114190.

Angiotensin II-regulated autophagy is required for vascular smooth muscle cell hypertrophy. Mondaca-Ruff D, Riquelme JA, Quiroga C, **Norambuena-Soto I**, Sanhueza-Olivares F, Villar-Fincheira P, Hernández-Díaz T, Cancino-Arenas N, San Martín A, García L, Lavandero S, Chiong M. Frontiers in Pharmacology 2019;9:1553.

*Vasodilator and hypotensive effects of pure compounds and hydroalcoholic extract of *Xenophyllum poposum* (Phil) V.A Funk (Compositae) on rats.* Cifuentes F, Palacios J, Kuzmicic J, Carvajal L, Muñoz F, Quispe C, Nwokocha CR, Morales G, **Norambuena-Soto I**, Chiong M, Paredes A. Phytomedicine. 2018;50:99-108.

Autophagy mediates tumor necrosis factor- α -induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. García-Miguel M, Riquelme JA, **Norambuena-Soto I**, Morales PE, Sanhueza-Olivares F, Nuñez-Soto C, Mondaca-Ruff D, Cancino-Arenas N, San Martín A, Chiong M. PLoS One. 2018;13:e0197210.

Inhibition of mitochondrial fission prevents hypoxia-induced metabolic shift and cellular proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. Parra V, Bravo-Sagua R, **Norambuena-Soto I**, Hernández-Fuentes CP, Gómez-Contreras AG, Verdejo HE, Mellado R, Chiong M, Lavandero S, Castro PF. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017;1863: 2891-2903.

Transforming growth factor-beta and Forkhead box O transcription factors as cardiac fibroblast regulators. **Norambuena-Soto I**, Núñez-Soto C, Sanhueza-Olivares F, Cancino-Arenas N, Mondaca-Ruff D, Vivar R, Díaz-Araya G, Mellado R, Chiong M. Biosci Trends. 2017;11:154-162.

Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through mitochondrial dynamics regulation. Torres G, Morales PE, García-Miguel M, **Norambuena-Soto I**, Cartes-Saavedra B, Vidal-Peña G, Mondaca-Ruff D, Sanhueza-Olivares F, San Martín A, Chiong M. Biochem Pharmacol. 2016;104:52-61.

Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. Chiong M, Cartes-Saavedra B, **Norambuena-Soto I**, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M, Mellado R. Front Cell Dev Biol. 2014;2:72.

b) Participaciones en Congresos Internacionales y Nacionales

Presentaciones en congresos nacionales (Reuniones anuales de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Sociedad de Hipertensión y Sociedad de Ciencias Fisiológicas) de los cuales 4 eran de primer autor, colaborando en otras 10 presentaciones. Y una presentación de primer autor en congreso internacional (International Society for Heart Research).

c) Participaciones en Explora

Participación en programas de “Tutores Científicos para clubes científicos escolares” del PAR Explora RM Norte. Participación en las “Jornada de Iniciación Científica para estudiantes de enseñanza media” del centro ACCDiS.

Lista de abreviaturas

α -SMA	: α -Actina de músculo liso
ANOVA	: Análisis de varianza
Ang I	: Angiotensina I
Ang II	: Angiotensina II
Ang-(1-7)	: Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	: Angiotensina-(1-9)
AT1R	: Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2R	: Receptor de angiotensina II tipo 2
DMEM	: Medio Eagle modificado de Dulbecco
ECV	: Enfermedades cardiovasculares
ECA	: Enzima convertidora de angiotensina I
ECA2	: Enzima convertidora de angiotensina homóloga
EEM	: Error estándar de la media
EDTA	: Etilén diamino tetra acetato
FBS	: Suero fetal bovino
FoxO1	: Forkhead box protein O1
GAPDH	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLP-1	: Péptido similar a glucagón-1
h	: Hora
iECA	: Inhibidores de la ECA
IgG	: Inmunoglobulina G
kDa	: Kilodalton
L	: Litro
MEC	: Matriz extracelular
μ g	: Microgramo
μ L	: Microlitro
μ M	: Micromolar
μ m	: Micrómetro

mg : Milígramo
MOI : Multiplicidad de infección
n : Número de muestras
NO : Óxido nítrico
PDGF : Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGF-BB : PDGF isoforma BB
PBS : Amortiguador fosfato salino
RAS : Sistema renina-angiotensina
RASMC : Células de musculo liso vascular aórtico primario de rata
SDS : Dodecilsulfato de sodio
SRF : Factor de respuesta al suero
TBS : Amortiguador Tris salino
TGF- β 1 : Factor transformante de crecimiento β 1
TNF : Factor de necrosis tumoral
VSMC : Células musculares lisas vasculares

Resumen

Durante la progresión y desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (ECV), en particular las asociadas con los vasos sanguíneos, las células de la musculatura lisa vascular (VSMC) cambian de fenotipo, pasando de uno diferenciado a uno desdiferenciado. Las VSMC desdiferenciadas se caracterizan por tener aumentada la proliferación, migración y la secreción de matriz extracelular. Este fenotipo es responsable del estrechamiento y fibrosis de la pared arterial, exacerbando la lesión vascular. El inicio y progresión de diversas ECV es gatillada por varios agentes, entre los que se destacan la angiotensina II, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TNF- α , que inducen la desdiferenciación de las VSMC. El sistema renina-angiotensina (RAS) es fundamental en la fisiología cardiovascular, controlando la vasoconstricción, la inflamación y el remodelado vascular. Está constituido por angiotensina I (Ang I), la enzima convertidora de angiotensina (ECA), angiotensina II (Ang II) y el receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R). Una desregulación de este sistema contribuye de forma significativa a la fisiopatología de las ECV, principalmente producto de la acción de Ang II sobre AT1R. También se ha descrito un RAS alterno que tiene como componentes a la ECA homóloga (ECA2), angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] y AT2R. Se ha demostrado que este RAS alterno tiene efectos vasodilatadores, antiproliferativos, antiinflamatorios y anti-remodelado. Sin embargo, se sabe poco sobre los efectos directos de la Ang-(1-9) sobre las VSMC. Para dilucidar parte de esta interrogante es que la hipótesis de este trabajo fue “Angiotensina-(1-9) previene la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares inducida por PDGF-BB a través de la vía AT2R/Akt/FoxO1”. Se plantearon los siguientes objetivos específicos: (1) Determinar el efecto de angiotensina-(1-9) en el cambio de fenotipo de las células musculares lisas vasculares inducido por PDGF BB mediante el receptor AT2. (2) Evaluar el efecto de angiotensina-(1-9) sobre FoxO1 a través

de la inhibición de Akt en células musculares lisas vasculares. (3) Determinar la participación de FoxO1 en el efecto de angiotensina-(1-9) sobre la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares inducido por PDGF-BB.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó la línea celular de VSMC A7r5 y cultivos primarios de VSMC de aorta de rata. Inicialmente se realizó una curva dosis respuesta, determinando que Ang-(1-9) 1 μ M era la dosis más baja en presentar efectos antagónicos a PDGF-BB. Ang-(1-9) por sí sola, no modificó la proliferación ni la migración basal y tampoco alteró la cantidad de proteínas contráctiles. Sin embargo, Ang-(1-9) previno la proliferación inducida por PDGF-BB medida por ciclo celular, expresión de Ki67 nuclear y de ciclina total. Además, PDGF-BB indujo migración en las células medida por ensayo de herida y transwell la cual fue prevenida cuando se incubó previamente con Ang-(1-9). Por último, PDGF-BB disminuyó las proteínas contráctiles (α -SMA, SM22 y calponina) en VSMC. Este efecto se previno al preincubar con Ang-(1-9). Todos estos efectos de Ang-(1-9) se bloquearon cuando se utilizó un antagonista de AT2R como PD123319. Por otra parte, Ang-(1-9) redujo la fosforilación de Akt y FoxO1 a los 30 min, seguido de un aumento del contenido total de proteína FoxO1 a las 3 horas. Todos estos efectos se bloquearon por PD123319 y por la sobreexpresión de Akt-Myr (forma de Akt constitutivamente activa). Finalmente, se demostró la participación de FoxO1 en los efectos de Ang-(1-9) utilizando un siRNA contra FoxO1 o un inhibidor de FoxO1, AS1842856. Por otra parte, la sobreexpresión adenoviral de FoxO1 imitó los efectos de Ang-(1-9) frente a PDGF-BB. Estos datos sugieren que Ang-(1-9) previene la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB mediante un mecanismo dependiente de AT2R/Akt/FoxO1. Estos resultados apoyan la posibilidad de que Ang-(1-9) sea un potencial agente terapéutico para tratar enfermedades vasculares.

Abstract

“Effect of the angiotensin-(1-9) on vascular smooth muscle cell dedifferentiation”

During progression and development of cardiovascular diseases (CVD), particularly those associated with blood vessels, vascular smooth muscle cells (VSMC) change their phenotype from differentiated to a dedifferentiated phenotype. Dedifferentiated VSMC are characterized by increased proliferation, migration and extracellular matrix secretion. This phenotype is responsible for narrowing and fibrosis of the artery wall, which exacerbates the vascular lesion. Several agents have been described to trigger VSMC dedifferentiation, including angiotensin II, platelet-derived growth factor (PDGF) and TNF- α . The renin-angiotensin system (RAS) is a key player in the cardiovascular physiology by controlling vasoconstriction, inflammation and vascular remodeling. This system includes angiotensin I (Ang I), angiotensin I converting enzyme (ACE), angiotensin II (Ang II), and angiotensin II type 1 receptor (AT1R). Deregulation of this system significantly contributes to the CVD physiopathology, mainly due to the action of Ang II on AT1R. In addition, a counter-regulatory RAS has been described, which includes the homologous ACE (ACE2), angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], angiotensin-(1-9) [Ang-(1-9)] and AT2R. This counter-regulatory RAS has vasodilatory, anti-proliferative, anti-inflammatory and anti-remodeling effects. However, little is known about the direct effects of Ang-(1-9) on VSMCs. To elucidate part of this question, the hypothesis of this study was “Angiotensin-(1-9) prevents PDGF-BB-induced dedifferentiation of vascular smooth muscle cells through the AT2R/Akt/FoxO1 pathway”. The following specific objectives were established: (1) To determine the effect of angiotensin-(1-9) on PDGF-BB induced vascular smooth muscle cell phenotypic change through the AT2 receptor. (2) To evaluate the effect of angiotensin-(1-9) on FoxO1 through the inhibition of Akt in vascular smooth

muscle cells. (3) To assess the participation of FoxO1 in the effect of angiotensin-(1-9) on PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell dedifferentiation.

This work was carried out using VSMC cell line A7r5 and primary cultures of rat aorta VSMC. Initially, a dose response curve showed that Ang-(1-9) 1 μ M was the lower dose showing antagonistic effects against PDGF-BB. Ang-(1-9) alone, did not modify basal proliferation or migration and did not alter the contractile proteins levels. Nevertheless, Ang-(1-9) prevented PDGF-BB induced proliferation measured by cell cycle, nuclear Ki67 expression and cyclin D1. In addition, PDGF-BB induced migration in cells measured by wound healing and transwell assays which was prevented by previous incubation with Ang-(1-9). Finally, PDGF-BB decreased contractile proteins levels (α -SMA, SM22 and calponin) in VSMC, an effect that was prevented by preincubation with Ang-(1-9). All Ang-(1-9) effects were blocked when an AT2R antagonist, such as PD123319, was used. Furthermore, Ang-(1-9) reduced Akt and FoxO1 phosphorylation at 30 min, followed by an increase in total FoxO1 protein levels at 3 hours. All these effects were blocked by PD123319 and by over-expression of Akt-Myr (a constitutively active form of Akt). Finally, the participation of FoxO1 on Ang-(1-9) effects were demonstrated by using a siRNA against FoxO1 or an inhibitor such as AS1842856. On the other hand, FoxO1 adenoviral overexpression mimicked the Ang-(1-9) effects against PDGF-BB. These data suggest that Ang-(1-9) prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation by an AT2R/Akt/FoxO1-dependent mechanism. This work support the possibility that Ang-(1-9) can be used as a potential therapeutic agent to treat vascular diseases.

I. Antecedentes

I.1. Enfermedades cardiovasculares

El sistema cardiovascular (CV) está formado por tres componentes: el corazón, la sangre y los vasos sanguíneos. El corazón, es la bomba que genera la fuerza que impulsa a la sangre hacia las arterias. La sangre es el tejido conectivo fluido de transporte. El sistema circulatorio es una red de vasos sanguíneos que transporta y distribuye sustancias esenciales a los tejidos y elimina desechos metabólicos. Por otro lado, nuestro sistema circulatorio tiene la función de regular la presión con que la sangre llega a cada uno de los órganos del cuerpo, y esto depende de la resistencia que opongan al flujo de sangre las distintas arteriolas y capilares que preceden a los órganos. Las arterias alejan la sangre del corazón y, a excepción de la arteria pulmonar, transportan sangre oxigenada. Los capilares están constituidos por paredes delgadas y forman las condiciones propicias para un buen intercambio de gases dentro de los tejidos [1].

Este sistema ha estado en observación desde hace mucho tiempo, debido a que las enfermedades que afectan al corazón o a los vasos sanguíneos, enfermedades cardiovasculares (ECV), son la principal causa de muerte en Chile y el mundo (Figura 1) [2]. Los principales factores de riesgo para estas enfermedades son: la dieta malsana, baja actividad física, consumo de tabaco y alcohol. Además, también existen los “factores de riesgo intermediarios” que son: aumentos en la presión arterial, elevados niveles de carbohidratos y lípidos en sangre, sobrepeso y obesidad. De esta manera, el riesgo cardiovascular se puede reducir mediante la prevención de enfermedades como hipertensión, dislipidemia y diabetes [3]. Dentro de las ECV, el infarto al miocardio y los accidentes cerebrovasculares, dos enfermedades caracterizadas por sufrir procesos isquémicos, son

responsables de alrededor del 75% de las muertes a nivel mundial [2]. Estos periodos de isquemia son fenómenos agudos que principalmente se deben a la obstrucción del flujo sanguíneo. Este impedimento al paso de la sangre es producto de la formación de depósitos de grasa (placas de ateroma) en las paredes de los vasos sanguíneos, como consecuencia de enfermedades como la aterosclerosis [3]. Por lo tanto, los vasos sanguíneos juegan un papel clave en el desarrollo de las ECV.

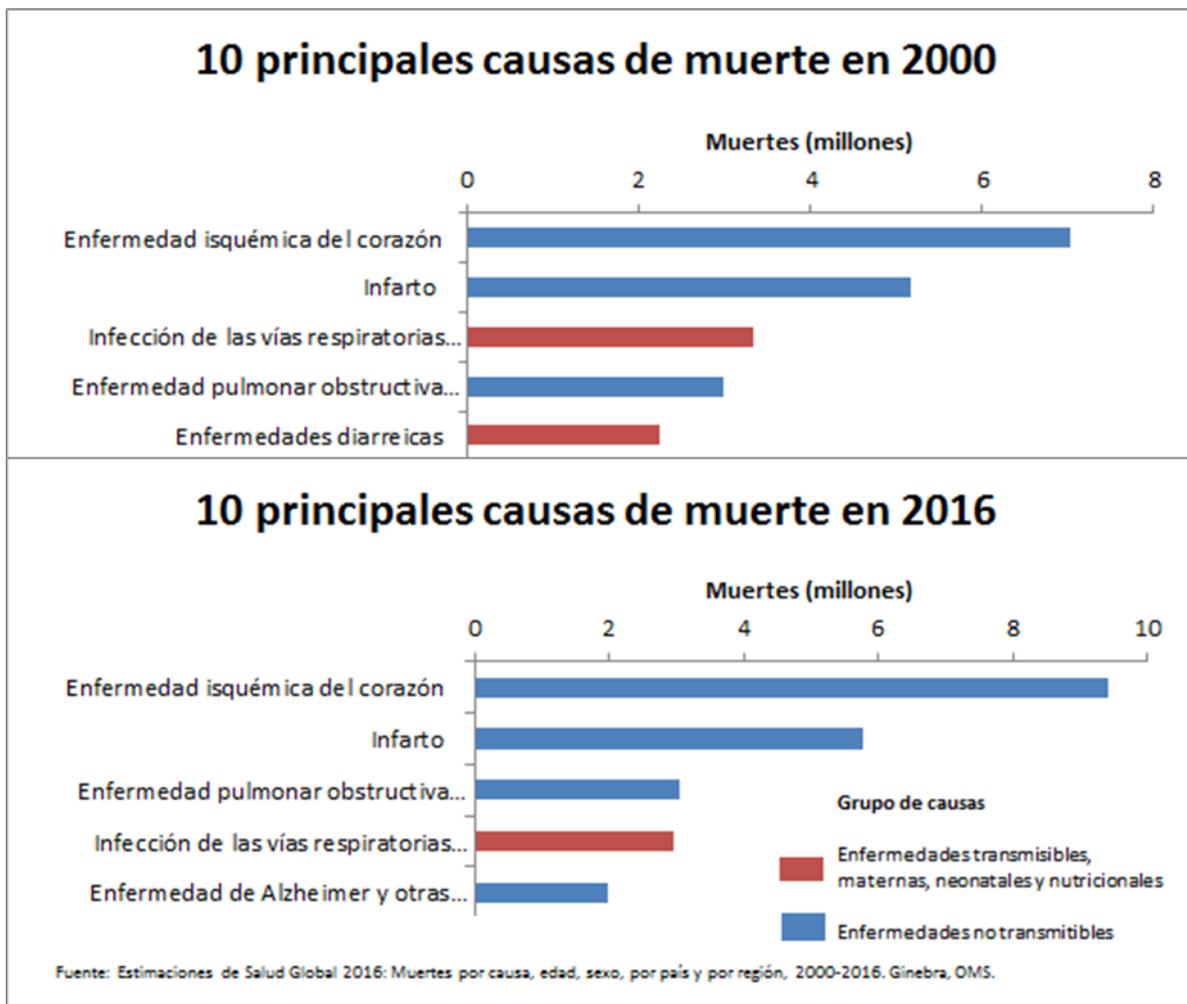


Figura 1. Principales causas de muerte según OMS

Dentro de las principales causas de muerte que se observan a nivel mundial, las de tipo isquémica lideran la estadística desde hace 20 años y han aumentado en cantidad, pasando de 12 millones en el año 2000 a 15 millones en el año 2016.

I.2. Vasos Sanguíneos

El sistema arterial está compuesto por vasos de conductancia, arterias de resistencia, arteriolas y capilares [4]. Las arterias de resistencia son las responsables de la distribución y del control del flujo sanguíneo y de la presión arterial. Esta presión representa la fuerza ejercida por la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos y permite el flujo desde las grandes arterias a los tejidos. Depende de múltiples factores cuyas alteraciones pueden producir tanto hipotensión como hipertensión [5]. La hipotensión, o caída de la presión arterial, puede llegar a comprometer la irrigación de los tejidos y su vitalidad, especialmente en órganos como corazón, cerebro, riñón y retina [5]. A su vez, la elevación de la presión arterial también puede ser peligrosa a extremos de comprometer la vida, sobre todo cuando es de instalación brusca y rápida (no da tiempo para la generación de procesos adaptativos) porque puede generar daños irreparables y mortales en los mismos órganos mencionados [6].

Existen tres parámetros importantes para regular la resistencia al flujo de sangre, el diámetro de los vasos, el largo de la arteria y la viscosidad de la sangre [4]. La regulación del diámetro de los vasos es el factor principal, debido a la capacidad que tienen las arterias para producir una contracción tónica de la musculatura lisa. La presión arterial se mantiene en un estado de equilibrio debido a procesos de vasoconstricción y vasodilatación [7]. La resistencia periférica se modifica también por alteraciones estructurales de los vasos. Dado que el flujo sanguíneo depende del radio del vaso, una disminución progresiva de éste (como es característico en enfermedades como aterosclerosis o diabetes) puede originar descontrol en la presión arterial y ayudar a la formación de placas de ateroma [7].

Los vasos están compuestos por 3 capas (Figura 2): la íntima, media y adventicia. La capa íntima está compuesta por una monocapa de células endoteliales que se encuentran en contacto directo con la sangre [8]. Estas células regulan el tono vascular al responder frente a cambios de presión arterial y secretar sustancias vasorelajantes, como óxido nítrico (NO), prostaciclina o el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), o secretando sustancias vasoconstrictoras, como endotelina [8, 9]. Estas sustancias actúan en la túnica media, que está compuesta principalmente por células musculares lisas vasculares (VSMC) y fibras de elastina, cuya principal función es la regulación del tono vascular y la presión arterial a través de procesos de relajación o contracción [8, 9]. La alteración de esta capa celular está involucrada en múltiples patologías como la hipertensión, aterosclerosis e infartos [4]. Por último, la adventicia está compuesta principalmente por matriz extracelular (MEC), fibroblastos, mastocitos y terminaciones nerviosas [8].

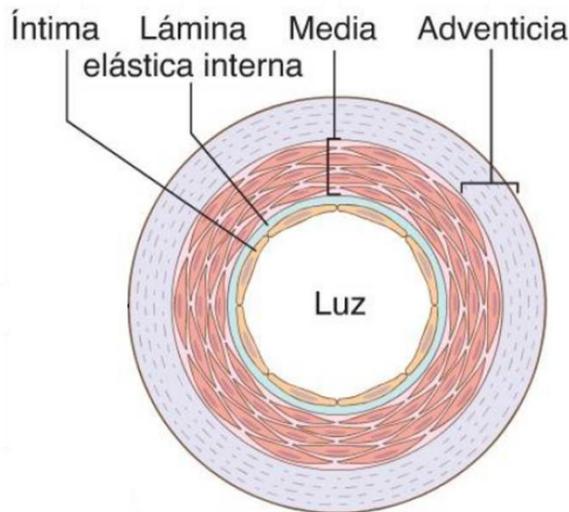


Figura 2. Composición anatómica de las arterias.

La capa íntima está compuesta por células endoteliales; la capa media por células musculares lisas vasculares (VSMC); la capa adventicia está compuesta por matriz extracelular (MEC) y fibroblastos.

I.3. Células de músculo liso vascular

Las VSMC regulan el diámetro de los vasos porque presentan un fenotipo con capacidad de contraerse. Esta contracción depende de una interacción entre la α -actina de músculo liso (α -SMA), cadena pesada de miosina, h-caldesmona y calponina [10, 11]. Por otro lado, estas células fisiológicamente poseen la capacidad de proliferar, migrar y secretar MEC. Estas características son necesarias para la reparación de los vasos sanguíneos luego de un daño, o para favorecer la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis [10]. En condiciones normales, las VSMC se encuentran en su fenotipo diferenciado en donde, además de poseer una alta capacidad de contracción, poseen una muy baja tasa de proliferación y baja capacidad de secreción de MEC [12, 13]. Por otro lado, el fenotipo desdiferenciado tiene como característica una alta tasa de proliferación, migración y secreción de MEC [12, 13]. Las VSMC presentan estos dos fenotipos pudiendo cambiar reversiblemente entre uno diferenciado a otro desdiferenciado.

Este cambio de fenotipo es regulado por distintos factores que incluyen a fuerzas mecánicas, agonistas contráctiles como angiotensina II (Ang II), MEC, especies reactivas de oxígeno (ROS), interacciones entre el endotelio vascular y las VSMC, hipoxia, factor de crecimiento transformante β -1 (TGF- β 1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre muchos otros factores [13-15]. Por ende, la capacidad de las VSMC para contraer, proliferar, migrar y secretar es modificable y depende de una gran cantidad de agentes [9-11]. Como resultado, las VSMC constituyen elementos estructurales básicos y funcionales en la regulación de la actividad de los vasos sanguíneos y su disfunción lleva a la aparición de ECV.

I.4. Desdiferenciación patológica

El cambio de fenotipo de las VSMC desde uno altamente diferenciado a uno desdiferenciado (Figura 3), se ha descrito ampliamente en la progresión de enfermedades como aterosclerosis, hipertensión, estenosis o formación de neoíntima [12, 13, 15]. Existen varios factores que son responsables de este cambio de fenotipo celular, destacándose el PDGF-BB, TNF- α y Ang II [16]. Datos obtenidos por nuestro laboratorio, muestran que estas moléculas son capaces de aumentar la capacidad de migración, la tasa de proliferación, producir un aumento en la secreción de MEC y también inducir una disminución de las proteínas encargadas de la contracción celular en la línea celular de VSMC de aorta de rata A7r5 [17, 18]. Sin embargo, la forma en la que este cambio sucede y los mecanismos moleculares involucrados, no se encuentran del todo definidos. Lo que se sabe es que el factor de respuesta al suero (SRF) regula gran parte de los marcadores de diferenciación de distintos tipos celulares [9]. Concretamente en VSMC, la especificidad de diferenciación de las células es debido a la unión del coactivador myocardin a SRF [19]. Debido a que myocardin no tiene capacidad de unirse directamente al DNA, requiere actuar en conjunto con SRF para así inducir la transcripción de genes que promueven la diferenciación de las VSMC [9]. Esta interacción es el punto de convergencia de la mayoría de las señales desdiferenciadoras. Por un lado, los estímulos como PDGF-BB y Ang II son capaces de fosforilar a ERK1/2 y este a su vez fosforilar a Elk-1, el cual compite con myocardin por el sitio con SRF impidiendo la expresión de marcadores contráctiles [20]. Por otro lado, PDGF-BB también disminuye la expresión de myocardin [21].

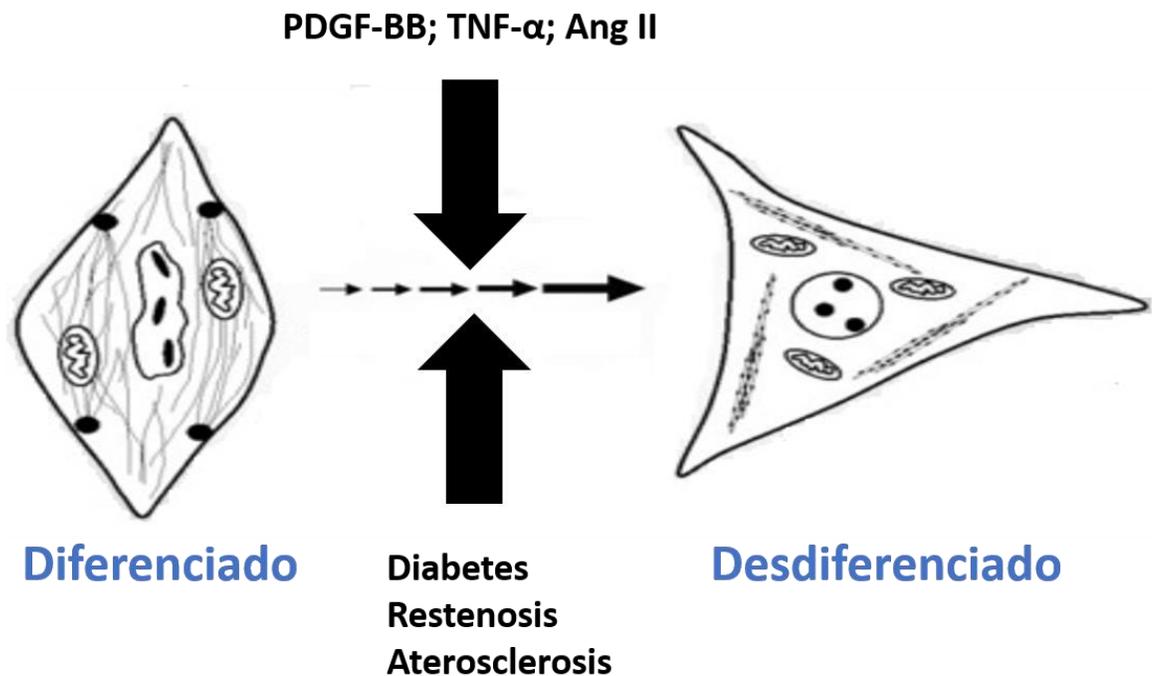


Figura 3. Desdiferenciación patológica de las células musculares lisas vasculares.

Enfermedades (diabetes, restenosis y aterosclerosis) y hormonas (factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma BB [PDGF-BB], factor de necrosis tumoral α [TNF- α], angiotensina II [Ang II]) asociadas a la dediferenciación de las células musculares lisas vasculares.

Es por esto por lo que la investigación sobre nuevos agentes que puedan prevenir este fenómeno y con ello, retrasar el progreso de las distintas ECV ha sido constante. Sin embargo, debido a que las ECV siguen siendo la principal causa de muerte, es necesario la exploración de nuevos agentes farmacológicos para su tratamiento. En este sentido, nuestro laboratorio trabaja en el descubrimiento de los efectos protectores ligados al péptido angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)], un nuevo integrante del sistema renina-angiotensina (RAS) [22].

I.5. Sistema Renina-Angiotensina

El RAS es un componente fundamental de la fisiología y homeostasis cardiovascular debido a su influencia en la regulación del balance electrolítico, presión arterial, tono y remodelado vascular [22].

La vía clásica del RAS (Figura 4) comienza con el angiotensinógeno generado en el hígado, el cual es proteolizado por la renina, una proteasa liberada desde los riñones luego de una baja en la volemia o por estimulación adrenérgica, generando el péptido de 10 aminoácidos, angiotensina I (Ang I) [23]. La enzima convertidora de angiotensina I (ECA) remueve los dos últimos aminoácidos del carboxilo terminal de la Ang I, generando el péptido de 8 aminoácidos, Ang II. Ang II ejerce su acción biológica por unión a los receptores AT1 (AT1R) y AT2 (AT2R) [23, 24]. Ang II es el péptido efector más importante de la vía, regulando la contracción vascular, crecimiento celular y liberación de aldosterona [23]. La aldosterona regula el balance electrolítico mediante el proceso de reabsorción de sodio en el riñón [23]. Sin embargo, las implicaciones fisiológicas de este sistema han continuado expandiéndose con el tiempo, ya que en adición al RAS clásico, se han ido reconociendo nuevos integrantes de este sistema, tales como los péptidos con función biológica angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] y Ang-(1-9), así como nuevas enzimas y receptores [25].

El descubrimiento de la enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA2) (Figura 4), adicionó mayor complejidad al eje clásico del RAS [26]. La evidencia actual sugiere un prometedor papel a este nuevo integrante del RAS, específicamente como un contra-regulador del eje principal [22]. ECA2 difiere de ECA tanto en especificidad de sustrato como en función. ECA2 produce Ang-(1-7) a partir de la hidrólisis de Ang II y por otro lado produce Ang-(1-9) a partir de la hidrólisis de Ang I. Ang-(1-9) puede ser

luego transformada a Ang-(1-7) por acción de ECA [26]. Entonces, una desregulación en este sistema, aumentando la vía clásica o disminuyendo el eje contra-regulador, puede contribuir de forma significativa a la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares [27].

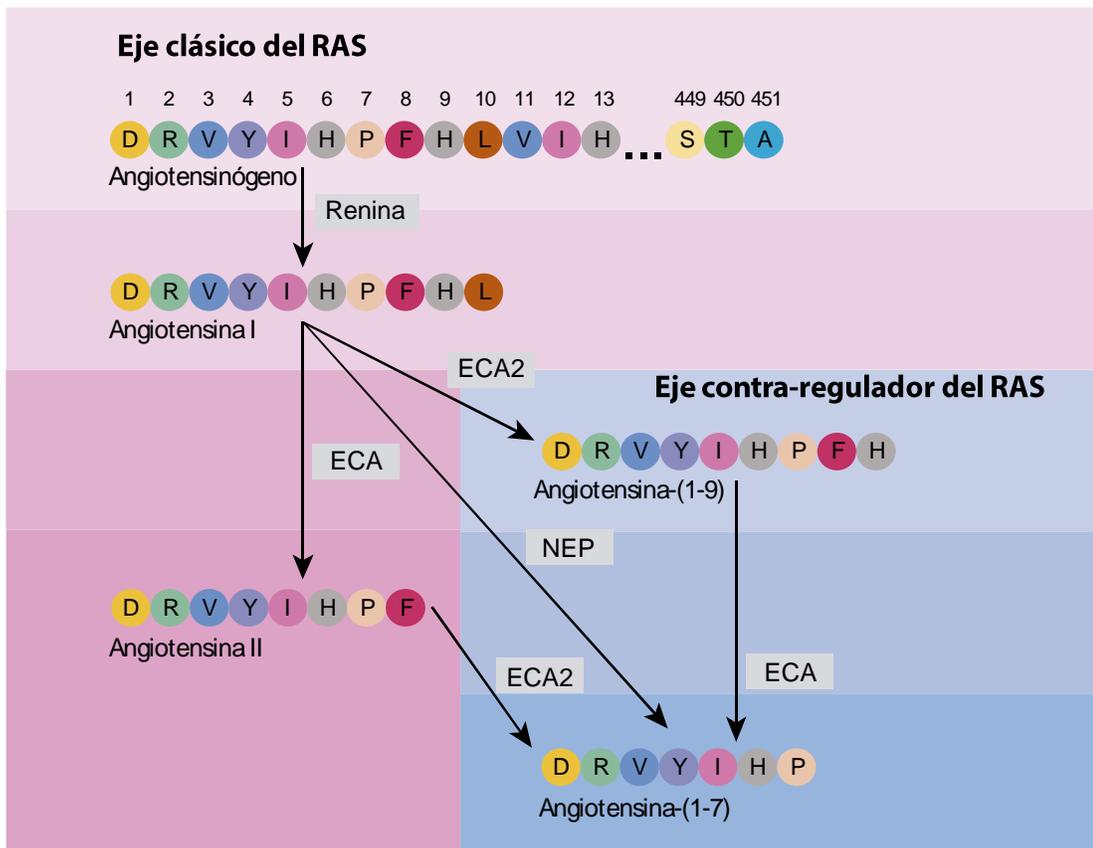


Figura 4. Componentes del Sistema Renina-Angiotensina (RAS).
Péptidos: angiotensinógeno, angiotensina I; angiotensina II; angiotensina-(1-9); angiotensina-(1-7); **Enzimas:** renina, enzima convertidora de angiotensina I (ECA), enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA2), neprilisina (endopeptidasa neutra, NEP). Adaptado de Ocaranza y cols [22].

I.6. Receptor AT2

El AT2R se ha descrito como el que media, al menos en parte, los efectos opuestos del AT1R una vez estimulado por Ang II [28]. El AT2R se

expresa en cardiomiocitos, fibroblastos, aorta y en arterias de resistencia y coronarias [29]. Su estimulación provoca vasodilatación, disminución en la proliferación y aumento en la apoptosis, además, de efectos antiinflamatorios [22]. Además, en vasos sanguíneos reduce el remodelado cardiovascular [29]. La activación de AT2R regula la vía NO/cGMP, a través de activación de la eNOS [30]. También promueve la activación de proteínas fosfatasa y la defosforilación de JNK, ERK1/2 y STAT, que se relacionan con sus efectos antiproliferativos y antiinflamatorios [31-33]. Un efecto más específico del AT2R en las VSMC, es la inducción de la relajación a través de la inhibición de la vía RhoA/Rho kinasa [34]. Por otro lado, mediante un ensayo de radio ligando, Flores-Muñoz y cols. demostraron que Ang-(1-9) se une y activa a este receptor [35].

I.7. Angiotensina-(1-9)

Existe muy poca información con respecto a este péptido de 9 aminoácidos originado a partir de la escisión de la leucina del carboxilo terminal de la angiotensina I (1-10) mediante ECA2. Inicialmente se pensaba que Ang-(1-9) era inactivo y su acción biológica correspondía sólo a ser un intermediario en la producción de Ang-(1-7) [26]. Sin embargo, en el año 1990, se mostró que el tratamiento crónico con inhibidores de la ECA (iECAs) producía una disminución en los niveles de Ang II con un aumento paralelo de las concentraciones plasmáticas de Ang-(1-9), sin cambio en los niveles de Ang-(1-7) [36]. Esto permitió hipotetizar que el efecto de estos fármacos podría no estar ligado exclusivamente a la disminución de la producción de Ang II, sino que también con algún efecto complementario y positivo de la Ang-(1-9). Además, Ang-(1-9) está presente en voluntarios sanos, en pacientes y en ratones tratados con iECAs o antagonistas de AT1R, y sus niveles circulantes aumentan en etapas tempranas post-infarto al miocardio [37]. Esto permitió postular a Ang-(1-9) como un nuevo contrarregulador del eje ECA/Ang II.

Actualmente, se ha evidenciado que Ang-(1-9) tiene efectos antihipertróficos en modelos de infarto en ratas [38], inducido por Ang II [35] o por norepinefrina [39]. También se ha mostrado que Ang-(1-9) atenúa la fibrosis inducida en modelos de ratas espontáneamente hipertensas vía AT2R [40]. Recientemente, se ha descrito que la administración de Ang-(1-9) preserva la función cardíaca posterior a un infarto por ligación de la arteria coronaria en un modelo de rata [41, 42]. Sin embargo, estos estudios muestran los efectos del péptido sobre el tejido cardíaco, pero poco se sabe sobre los efectos que tiene Ang-(1-9) sobre los vasos sanguíneos. Ocaranza y cols. demostraron que Ang-(1-9) previene el remodelado vascular en ratas hipertensas en un modelo de bomba de infusión de Ang II [43]. Todas estas evidencias han despertado un gran interés en continuar investigando si este péptido pudiera llegar a convertirse en una alternativa real como tratamiento o profilaxis del remodelado cardiovascular. Sin embargo, no existen trabajos que relacionen Ang-(1-9) con las VSMC, por lo que no se sabe si estos efectos protectores del remodelado vascular son directos sobre las VSMC o es indirecto mediado por el control de la presión arterial y la función cardíaca.

La vía de señalización de Ang-(1-9) no se encuentra bien definida. Si bien se sabe que sus efectos son mediados por el AT2R [22, 35, 40], la señalización río abajo de este receptor luego de su activación no se conoce completamente. Recientemente, Mendoza-Torres y cols. mostraron que Ang-(1-9) induce la fosforilación de Akt en cardiomiocitos [42]. En base a esto, y a que no existen antecedentes directos de su acción en VSMC, es que nuestro laboratorio intenta dilucidar cuáles serían los efectos de Ang-(1-9) en estas células. Los datos obtenidos de forma preliminar por nuestro laboratorio han mostrado que este péptido es capaz de disminuir la fosforilación basal de Akt (Figura 5) en tiempos tempranos (inferiores a una hora). Además, río abajo de la señalización de Akt, los niveles proteicos del factor transcripcional Forkhead box protein O1 (FoxO1) se encuentran elevados (Figura 5). Estos

hallazgos abren nuevas interrogantes sobre este péptido y su efecto sobre la diferenciación de las VSMC y su relación con FoxO1.

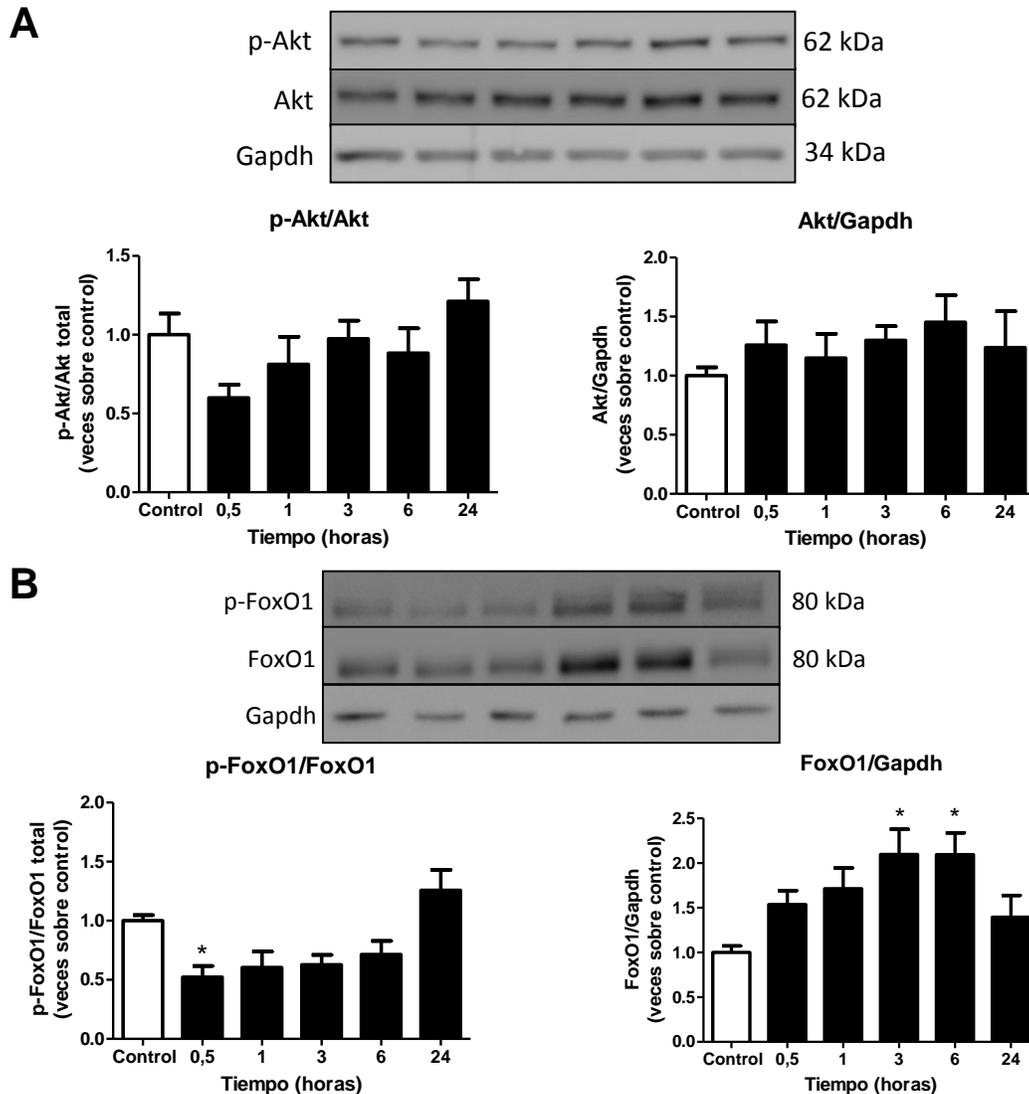


Figura 5. Efecto de Ang-(1-9) 100 μ M sobre la fosforilación Akt y FoxO1. Células A7r5 se trataron con Ang-(1-9) (100 μ M) por 0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y las proteínas fosforiladas y totales se determinaron por Western blot. Se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. **(A)** Akt y **(B)** FoxO1. Los paneles superiores muestran geles representativos. Los paneles inferiores izquierdos muestran las razones **(A)** p-Akt/Akt y **(B)** p-FoxO1/FoxO1. Los paneles inferiores derechos muestran las razones **(A)** Akt total/GAPDH y **(B)** FoxO1 total/GAPDH. n = 4-5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control.

I.8. Factor transcripcional FoxO1

FoxO1 es un factor transcripcional de la superfamilia de los forkhead box, del subgrupo de los factores FoxO. Existen 4 tipos, FoxO1, 3, 4 y 6, los primeros se expresan de forma ubicua en todos los tejidos y FoxO6 se ha visto solo en sistema nervioso central [44]. Hosaka y cols., usando ratones knock-out (KO) para FoxO1, FoxO3 y FoxO4, mostraron que el KO de FoxO1 es letal en etapas embrionarias por falta de desarrollo vascular. Los KO de FoxO3 y de FoxO4, a diferencia del KO de FoxO1, son viables y los ratones muestran un crecimiento normal en apariencia, en comparación con los ratones wild type (wt) [45]. Este estudio muestra la importancia que tiene FoxO1 en el sistema vascular, por lo que resulta muy interesante que el péptido Ang-(1-9) pueda afectar de alguna forma sus niveles y su fosforilación. FoxO1 se puede regular mediante distintas modificaciones postraduccionales, siendo las más estudiadas la fosforilación, acetilación y ubiquitinación [46]. Estas modificaciones pueden activar o inactivar su función como factor de transcripción. Además, permiten el cambio de su localización subcelular. La fosforilación por Akt en tres sitios distintos (T24, S256 y S319), permite la unión de las proteínas 14-3-3 con la posterior translocación hacia el citoplasma [44]. Por lo tanto, estas tres fosforilaciones bloquean su acción como factor de transcripción, e incluso promueven su degradación [44].

I.9. FoxO1 en diferenciación

Se han descrito múltiples funciones para el subgrupo FoxO, y en específico a FoxO1. Como factor transcripcional es capaz de regular la expresión de una gran cantidad de genes. Entre estas funciones se ha descrito que FoxO1 es capaz de regular el metabolismo, la sobrevivencia celular a través de la apoptosis y el ciclo celular [46]. En base a esto último, se ha evaluado la

función de FoxO en el proceso de diferenciación de múltiples tipos celulares, encontrándose que FoxO1 es muy importante en el desarrollo del tejido hepático [47], en la diferenciación del tejido adiposo [48], y la del fibroblasto cardiaco [49]. Sin embargo, la relevancia de FoxO1 en las VSMC no es del todo clara. Por otro lado, FoxO puede activar la expresión de myocardin [50]. Como se mencionó anteriormente, la regulación de los niveles de myocardin es importante para el control de la diferenciación. Entonces queda planteada la pregunta de si FoxO1 podría estimular la diferenciación de las VSMC regulando la expresión de myocardin.

I.10. FoxO1 en VSMC

Existen pocos reportes sobre la función que ejerce FoxO1 en las VSMC. Shin y cols. y Abid y cols. mostraron que FoxO1 es regulado por Akt en células vasculares humanas [51, 52]. Recién en el último tiempo se ha vinculado a FoxO1 con la proliferación de las VSMC, y tanto en células humanas vasculares como en células musculares pulmonares, al disminuir los niveles de FoxO1, las VSMC aumentan la síntesis de DNA y la proliferación [53, 54]. Todos estos efectos, de señalización o como regulador del ciclo celular, han sido ampliamente descritos en distintos tipos celulares en donde también FoxO1 regula la diferenciación [55]. Sin embargo, no hay estudios sobre la capacidad de FoxO1 de regular la diferenciación de las VSMC.

En base a estos antecedentes nos realizamos las siguientes preguntas:

- a) ¿Es Ang-(1-9) capaz de prevenir el proceso de desdiferenciación de las VSMC?
- b) Si Ang-(1-9) previene el cambio de fenotipo ¿Cómo lo hace?
- c) ¿Es FoxO1 un factor importante en el proceso de desdiferenciación de las VSMC?

Con este trabajo se intenta determinar si Ang-(1-9) tiene un potencial uso como regulador de la diferenciación de las VSMC. Además, se contribuirá en la comprensión de la señalización río abajo posterior a la activación del AT2R.

II. Hipótesis

“Angiotensina-(1-9) previene la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares inducida por PDGF-BB a través de la vía AT2R/Akt/FoxO1”.

III. Objetivo general

“Determinar el efecto de angiotensina-(1-9), a través de la vía AT2R/Akt/FoxO1, en la prevención del cambio de fenotipo de las células musculares lisas vasculares inducido por PDGF-BB”.

IV. Objetivos específicos:

- 1) Determinar el efecto de angiotensina-(1-9) en el cambio de fenotipo de las células musculares lisas vasculares inducido por PDGF-BB mediante el receptor AT2.
- 2) Evaluar el efecto de angiotensina-(1-9) sobre FoxO1 a través de la inhibición de Akt en células musculares lisas vasculares.
- 3) Determinar la participación de FoxO1 en el efecto de angiotensina-(1-9) sobre la desdiferenciación de las células musculares lisas vasculares inducido por PDGF-BB.

V. Metodología

V.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de músculo liso vascular A7r5, obtenida de la arteria aorta de embriones de rata (CRL-144, ATCC, EEUU). Las células se mantuvieron en un medio de cultivo Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) rico en glucosa (25 mM) suplementado con NaHCO_3 (1,2 $\mu\text{g/L}$), suero fetal bovino inactivado por calor (FBS; 10%) y piruvato (110 g/mL). Las células se cultivaron a 37°C en una atmosfera humedecida con 5% de CO_2 en aire. Al alcanzar un 80% de confluencia, las células se replaquearon soltándolas con una solución de tripsina (0,3%) en una solución buffer fosfato con EDTA 0,025% libre de Ca^{2+} - Mg^{2+} y depositándolas en placas nuevas con medio de cultivo fresco. Se utilizaron células de músculo liso vascular aórtico primario de rata (RASMC) de ratas Sprague-Dawley (200-250 g) obtenidas según lo descrito previamente [56]. Se cultivaron con DMEM 6171 (Sigma Chem Co), suplementado con 10% de FBS, glutamina 4 mM y antibióticos (penicilina-estreptomicina) a 37°C, con 5% de CO_2 , hasta 80-90% de confluencia.

V.2. Tratamientos de las células

Antes de la estimulación, tanto las células A7r5 como RASMC estaban parcialmente privadas de suero durante la noche con DMEM 2% FBS o DMEM 6171 2% FBS, respectivamente. Minutos antes de comenzar un experimento, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco, previamente ambientado a 37°C en un baño termostático. Posteriormente, se trataron con (a) vehículo, (b) Ang-(1-9) 1 μM , (c) PDGF-BB (20 ng/mL, #521225, Merck), y (d) preincubado con Ang-(1-9) 1 μM por 3 h y luego tratado con PDGF-BB 20 ng/mL. Se realizaron experimentos entre los pasajes 4 a 10 en ambos tipos de células.

La utilización de antagonistas (PD123319 [1 μ M, #P186, Sigma-Aldrich] y A779 [10 μ M, #SML1370, Sigma-Aldrich]) o inhibidores químicos (AS1842856 1 μ M) se realizó 30 min antes de iniciar la incubación con los tratamientos antes mencionados. La disminución de los niveles de FoxO1 se realizó mediante el silenciamiento genético a través de un siRNA (#6256, Cell Signaling Technology). Para ello, las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 células por pocillo, luego de 24 h, se transfectaron con siRNA FoxO1 usando lipofectamina RNAimax (Invitrogen) en medio OPTIMEM. Posteriormente, a las 6 h de transfección se cambió el medio por DMEM fresco y se incubaron con los tratamientos antes descritos. Por último, para la transducción adenoviral las células A7r5 se sembraron a una densidad de 2×10^5 células por pocillo. Luego de 24 h, se transdujeron con el adenovirus Akt-Myr o con GFP-FoxO1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1000 partículas virales por célula. Las células se mantuvieron bajo estas condiciones durante 24 h, antes de ser lavadas y estimuladas. Como control de transducción se utilizó un adenovirus β -galactosidasa a la misma multiplicidad de infección.

V.3. Migración por Ensayo de Herida

A una placa de 60 mm en confluencia máxima se le realizó una “herida” o se creó un área libre de células en la monocapa del cultivo celular con la ayuda de una punta amarilla de micropipeta. Las células se cultivaron en un medio de cultivo (DMEM, NaHCO_3 , FBS, piruvato) suplementado con bromo deoxiuridina (100 μ M) para inhibir la proliferación celular. Luego, se realizó la captura de imágenes de manera periódica durante 24 h. Finalmente, se comparó las imágenes y se determinó el área de la herida no cubierta con células. Los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida a las 24 h en comparación con la herida inicial.

V.4. Migración por Ensayo Transwell

Se utilizaron cámaras Boyden de 8 μm de poro en placas de 24 pocillos (BD Biosciences). Después de la estimulación con Ang-(1-9) y PDGF-BB, se sembraron 20.000 células en 100 μL de DMEM con 0% de FBS en la cámara superior y 550 μL de DMEM con 10% de FBS en la cámara inferior. Después de 4 h de migración, las células de la parte superior se eliminaron con un hisopo de algodón. Las células migradas a la cámara inferior se fijaron durante 2 h con una solución de metanol al 20% más cristal violeta y se lavaron con agua. Posteriormente, el número de células migradas se fotografió mediante observación bajo el microscopio y se cuantificó. Los resultados se expresaron como el número de células migradas por campo fotografiado.

V.5. Western blot

Una vez finalizado el estímulo, las células se lisaron con medio de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; Tritón X-100 1% v/v) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasas (Roche). Finalmente, el extracto se denaturó a 100°C por 5 min en amortiguador SDS-PAGE 4x. La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (utilizando concentraciones de 8% o al 12%). En todos los casos, se cargaron 20 μg de extracto proteico total. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF preactivada con metanol. Posterior a la electrotransferencia, las membranas se incubaron con solución de bloqueo compuesta por buffer TBS-Tween más leche descremada al 5% durante 1 h a temperatura ambiente y, posteriormente, se incubaron toda la noche en una solución de buffer TBS-Tween en conjunto con el anticuerpo primario correspondiente anti α -SMA (dilución 1:10000, #ab7817 Abcam), anti SM22 (dilución 1:5000,

#ab14106 Abcam), anti calponina (dilución 1:2000, #ab46794 Abcam), anti β -tubulina (dilución 1:10000, Sigma Aldrich), anti p-Akt (dilución 1:1000, #9271 Cell Signaling), anti Akt (dilución 1:1000, #9272 Cell Signaling), anti p-FoxO1 (dilución 1:1000, #9464 Cell Signaling), anti FoxO1 (dilución 1:1000, #2880 Cell Signaling) y ciclina D1 (dilución 1:500, #sc-8396 Santa Cruz Biotechnology). Luego, las membranas se lavaron 15 min en TBS-Tween 1x por triplicado; y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón (dilución 1:5000, Calbiochem) disueltos en una solución de buffer TBS-Tween con leche descremada al 5%. Para la detección, las membranas se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL. Para revelar y digitalizar las imágenes se utilizó el equipo Syngene (Frederick, MD, USA). Finalmente, las imágenes se procesaron mediante el programa UN-SCAN-IT gel (Silk Scientific, Inc., Orem, UT, USA).

V.6. Inmunofluorescencia

Las células A7r5 se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min. Luego se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% durante 15 min, se bloquearon con BSA al 1% durante 1 h y se incubaron con anti-Ki67 (# 9129S, Cell Signaling Technology). El anticuerpo secundario Alexa 488 (#A11034, Life Technologies) se incubó durante 2 h. Se utilizó el medio de montaje ProLong Gold (#P36935, Life Technologies) y los núcleos se tiñeron con DAPI (#P36935, Life Technologies). Para el análisis de Ki67, se capturó un plano focal con un microscopio Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 200, utilizando el software de captura y análisis de imágenes LSM 5 3.2 en un objetivo 40x con aceite de inmersión. A las imágenes obtenidas se le sustrajo el fondo y se cuantificó la intensidad de fluorescencia con el uso del software ImageJ (NIH, Bethesda, EE. UU.).

V.7. Ciclo celular

Células A7r5 se sembraron en placas de 12 pocillos en DMEM que contenía 10% de FBS. Cuando alcanzaron un 60-70% de confluencia, las células se sincronizaron en la fase G0 por privación de suero mediante el cambio de medio DMEM con 0% de FBS durante 24 h. Luego, las células se trataron con Ang-(1-9) y PDGF-BB. Los sobrenadantes del cultivo se recolectaron para determinar el número de células muertas. Las células se tripsinizaron y luego se centrifugaron a 1000 g a 4°C durante 5 min. Las células se permeabilizaron y se fijaron en metanol durante la noche a -20°C. Luego, las células se centrifugaron a 1000 g a 4°C durante 5 min y se lavaron con PBS 1X para retirar metanol. Las células se incubaron en 50 µg/mL de RNAsa (#740505, Macherey-Nagel) a temperatura ambiente durante 30 min y luego se adicionó yoduro de propidio (1 mg/mL) a temperatura ambiente durante 15 min bajo protección contra la luz. La distribución del ciclo celular se analizó por citometría de flujo FACScan TM (Becton Dickinson) en el software "Cell FITTM DNA System" (Becton Dickinson).

V.8. Fraccionamiento celular

El aislamiento de la fracción nuclear se realizó según lo descrito por Suzuki y cols [57]. Los procesos de centrifugación fueron realizados en una "Mini-centrifuga" con velocidad fija de 7000 rpm a temperatura ambiente. Brevemente, las células A7r5 se rasparon de placas de cultivo de 60 mm y se recogieron en 300 µL de PBS frío. Después de 10 s de centrifugación a temperatura ambiente, se eliminaron los sobrenadantes y se volvieron a suspender los gránulos en 300 µL de buffer NP40 al 0,1% en PBS frío. Se añadieron 30 µL de buffer Laemmli 4X a 100 µL del lisado, el cual se denominó "lisado de células completas". Los 200 µL restantes se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 s y se añadieron 30 µL de buffer Laemmli

4X a 100 μ L del sobrenadante y se hirvió durante 5 min, el cual se denominó "fracción citosólica". El sobrenadante restante se retiró y el pellet se resuspendió en 300 μ L de buffer NP40 al 0,1% en PBS frío y se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 s. El sobrenadante fue descartado. El pellet se resuspendió en 45 μ L de buffer Laemmli 4X y se designó como "fracción nuclear". La fracción nuclear y el lisado de células completas se sonicaron durante 3 min y se hirvieron durante 5 min. Como marcadores de fracción nuclear y citosólica se utilizó laminina A/C (Dilución 1:1000, #sc-376248, Santa Cruz Biotechnology) y GAPDH (Dilución 1:10000, #8795, Sigma-Aldrich), respectivamente. Las distintas fracciones se evaluaron mediante Western blot, como se describió anteriormente.

V.9. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM) del número indicado de experimentos independientes. Según el experimento, los datos se analizaron mediante la prueba t de Student para comparaciones directas o ANOVA de una o dos vías. Para las comparaciones múltiples se utilizó el post test de Holm-Sidak. Un valor de $p < 0,05$ se definió como significancia estadística. El análisis estadístico de todos los experimentos se realizó con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

VI. Resultados

VI.1. Determinación de la concentración efectiva de Ang-(1-9)

En primera instancia se realizó una curva de dosis-respuesta para determinar la concentración de Ang-(1-9) efectiva en la prevención de la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB. Para esto se realizó el ensayo de cierre de herida, como marcador de la migración celular, y se evaluó por Western blot los niveles de la proteína calponina, como un marcador de proteínas contráctiles. Para esto las VSMC derivadas de la línea celular A7r5 se incubaron durante 3 h con concentraciones crecientes de Ang-(1-9) a partir de 0,1 hasta 100 μ M, para luego incubarlas con PDGF-BB durante 24 h para inducir la desdiferenciación.

VI.1.1. Efecto de Ang-(1-9) sobre la migración celular

En la figura 6A, se observa que Ang-(1-9) 100 μ M por sí sola, no modificó la migración de las células respecto al control. Por otro lado, PDGF-BB (20 ng/mL) aumentó significativamente la migración celular respecto al control, provocando un 60% de cierre de herida en comparación al 15% de cierre de herida visto en el control. En cambio, cuando se incubó con Ang-(1-9) 3 h previas a la adición de PDGF-BB, se observó que la concentración más baja de Ang-(1-9) (0,1 μ M) no previno el efecto de PDGF-BB. Sin embargo, a partir de la concentración de 1 μ M de Ang-(1-9) el estímulo con PDGF-BB no provocó un aumento en la migración celular, manteniendo un porcentaje de cierre de herida similar al control en 20%. Estos datos sugieren que Ang-(1-9), desde 1 μ M hasta 100 μ M, previene la migración de las VSMC A7r5 inducida por PDGF-BB (20 ng/mL).

VI.1.2. Efecto de Ang-(1-9) sobre los niveles proteicos de calponina

En el caso de los niveles proteicos de calponina, se observó que Ang-(1-9) 100 μM por sí sola no modificó los niveles de esta proteína comparado con el control. Sin embargo, el tratamiento con PDGF-BB durante 24 h disminuyó en un 30% los niveles de esta proteína. El pretratamiento con Ang-(1-9) durante 3 h con una concentración de 0,1 μM no tuvo ningún efecto. En cambio, a partir de la concentración de 1 μM , la incubación previa con Ang-(1-9) previno la disminución de la calponina inducida por PDGF-BB (Figura 6B). Estos datos sugieren que Ang-(1-9), desde 1 μM hasta 100 μM , previene la disminución de calponina de las VSMC A7r5 inducida por PDGF-BB (20 ng/mL). Con estos resultados se obtuvo la concentración efectiva 50 (EC_{50}), que da cuenta de la concentración de Ang-(1-9) que produce el 50% del efecto oscilaba entre 0,1 y 1 μM (Figura 6C).

Tomando en conjunto los datos de migración y niveles proteicos de calponina, los resultados permiten sugerir que Ang-(1-9), a una concentración de 1 μM , previene la desdiferenciación de las VSMC A7r5 inducida por PDGF-BB.

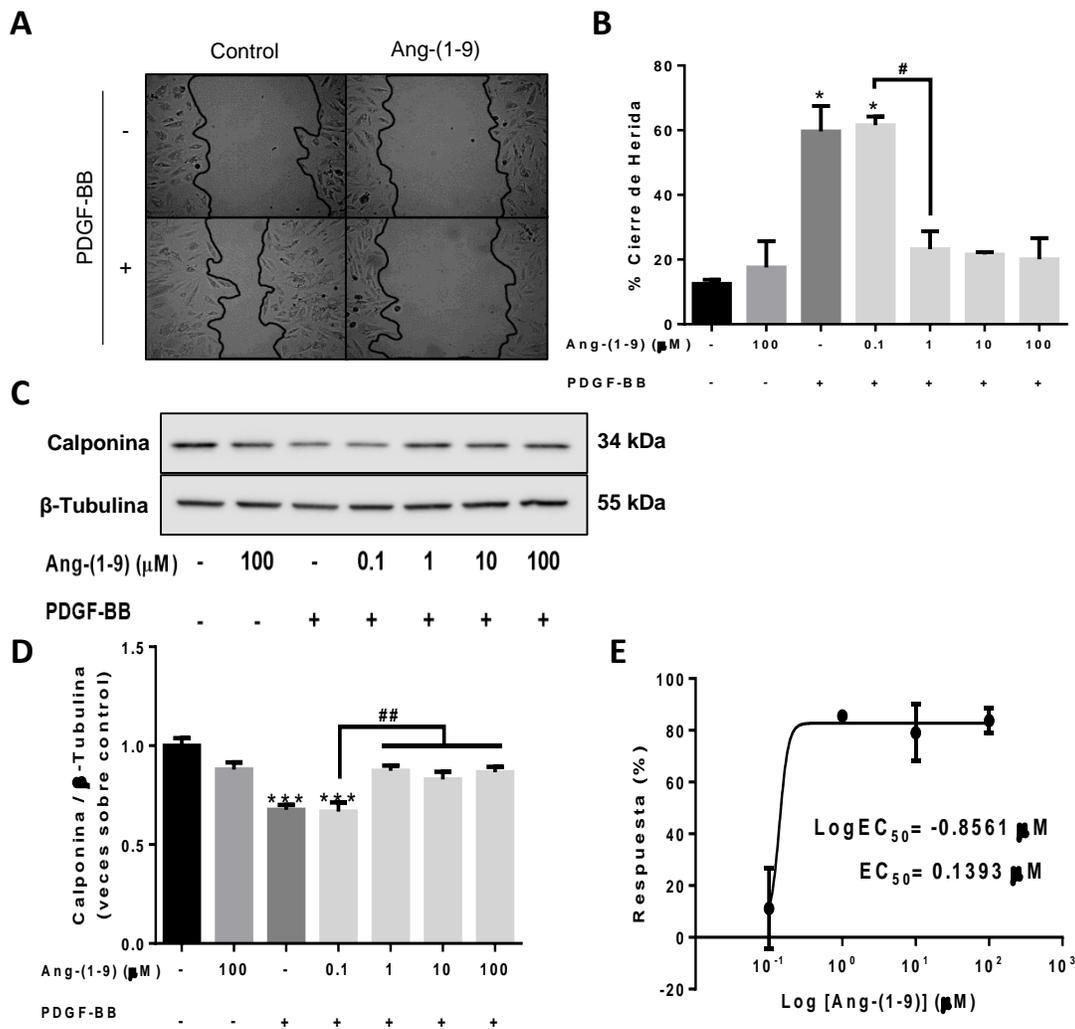


Figura 6. Dosis-respuesta de Ang-(1-9) frente a la migración y la disminución de proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC. Células A7r5 se pretrataron con Ang-(1-9) por 3 h y luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. **(A)** Imágenes representativas de las células 24 h posteriores al ensayo de la herida, tratadas con Ang-(1-9) (1 μM), PDGF-BB o Ang-(1-9) + PDGF-BB. **(B)** Cuantificación del ensayo de herida. Los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida respecto al tamaño de la herida inicial. Se prepararon extractos proteicos totales y los niveles proteicos de calponina se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(C)** Western blot representativo. **(D)** Cuantificación de los niveles totales de calponina. **(E)** Curva concentración-respuesta para el cálculo del EC₅₀. n=4. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. *p<0,05, ***p<0,001 vs control. #p<0,05, ##p<0,01 vs Ang-(1-9) 0,1 μM .

VI.2. Evaluación del efecto de los antagonistas de AT2R y MasR

Con el fin de determinar si la utilización de los antagonistas de AT2R, PD123319, y de MasR, A779, modifican los efectos de PDGF-BB en las VSMC A7r5, se evaluó la migración celular por ensayo de herida y los niveles de proteínas contráctiles, α -SMA, SM22 y calponina. Para esto las VSMC A7r5 se incubaron durante 30 min con PD123319 1 μ M o A779 10 μ M, para luego incubarlas con PDGF-BB durante 24 h para inducir la desdiferenciación.

VI.2.1. Efecto de los antagonistas de AT2R y MasR sobre la migración celular

PDGF-BB indujo la migración de las VSMC A7r5. PD123319 o A779 no modificó la migración por sí solos. La preincubación con cada antagonista durante 30 min previos a la adición de PDGF-BB, no modificó la migración celular de las VSMC A7r5 inducida por PDGF-BB (Figura 7).

VI.2.2. Efecto de los antagonistas de AT2R y MasR sobre los niveles de proteínas contráctiles

PDGF-BB disminuyó los niveles de las 3 proteínas contráctiles medidas, α -SMA, SM22 y calponina (Figura 8). Específicamente en la figura 8A, se observa que el antagonista PD123319 no modificó los niveles de las proteínas contráctiles y que al incubarlo por 30 min previos al PDGF-BB no interfirió en el efecto de éste. En el mismo sentido, se muestra en la figura 8B, que el antagonista A779 tampoco indujo cambios en los niveles de las proteínas contráctiles. Al igual que el antagonista del AT2R, no modificó el efecto de PDGF-BB en la disminución de los niveles proteicos de α -SMA, SM22 y calponina.

Estos resultados, en su conjunto, permiten inferir que los antagonistas AT2R, PD123319, y MasR, A779, no tienen por sí solos acciones basales ni modifican la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB.

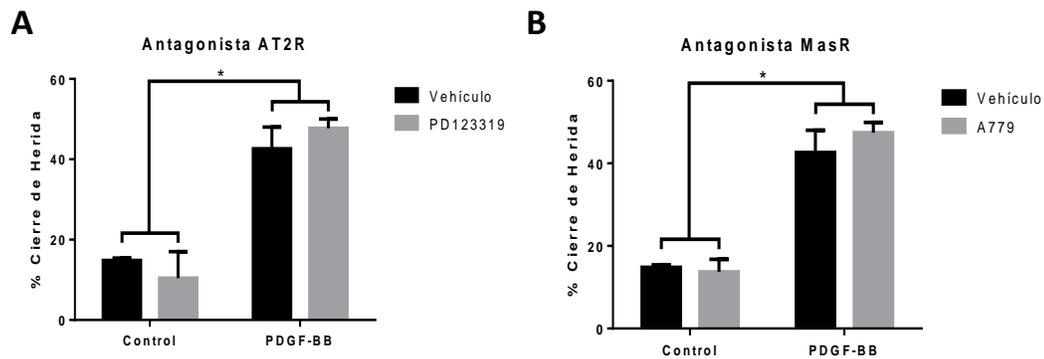


Figura 7. Efecto de los antagonistas de AT2R y MasR frente a la migración de las VSMC A7r5 inducida por PDGF-BB.

Se cultivaron células A7r5 hasta confluencia y se les realizó una herida usando una punta amarilla de micropipeta. Luego, el medio de cultivo DMEM se suplementó con bromo deoxiuridina (100 μ M) y las células se pretrataron con **(A)** PD123319 1 μ M o **(B)** A779 10 μ M por 30 min. Luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Las heridas se registraron fotográficamente al inicio y a las 24 h. Los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida respecto al tamaño de la herida inicial. n=4. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control.

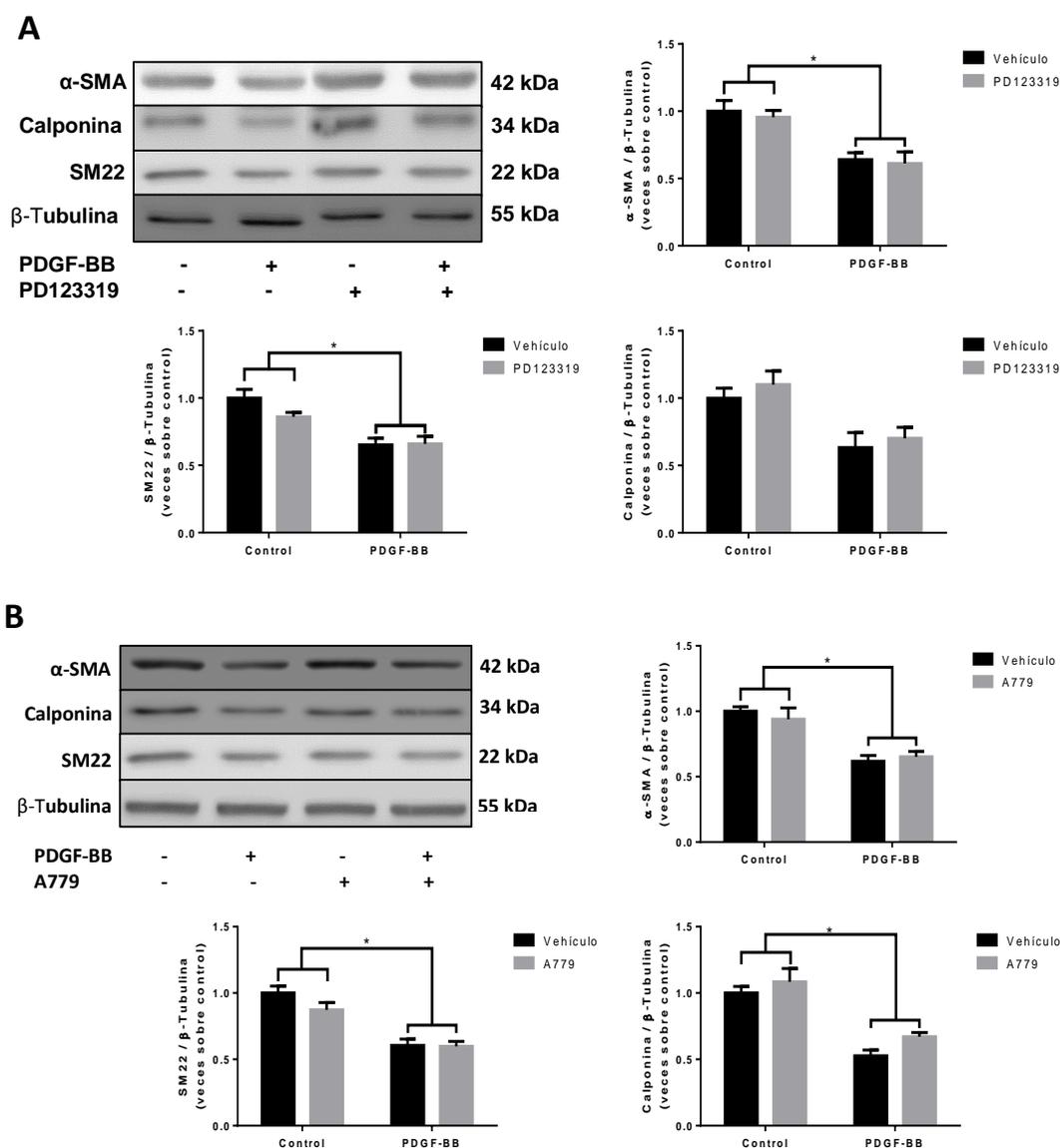


Figura 8. Efecto de antagonistas de AT2R y MasR frente a la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC.

Células A7r5 se pretrataron con **(A)** PD123319 (1 μ M) o **(B)** A779 (10 μ M) por 30 min. Luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y las proteínas contráctiles se determinaron por Western blot. Se muestran Western blot representativos y niveles totales de α -SMA, SM22 y Calponina. Se utilizó β -tubulina como control de carga. n=4. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. * $p < 0,05$ vs control.

VI.3. Obj. 1. Determinar si Angiotensina-(1-9) previene el cambio de fenotipo de las VSMC inducido por PDGF-BB mediante el receptor AT2.

Una vez determinada la concentración efectiva de Ang-(1-9) y comprobado que los antagonistas de AT2R y MasR no interfieren en el efecto de PDGF-BB, se evaluó si Ang-(1-9) previene el cambio de fenotipo de las VSMC inducido por PDGF-BB mediante el AT2R. Para ello, se trataron las células con PD123319 o A779 por media hora para luego incubarlo por 3 h con Ang-(1-9). Finalmente, se adicionó PDGF-BB por 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación con los distintos estímulos se evaluó la migración celular, los niveles de proteínas contráctiles y la proliferación celular.

VI.3.1. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre la migración celular

En la figura 9, se repite la observación de que Ang-(1-9) cuando se utiliza de forma aislada no modifica la migración de las células. Por otro lado, PDGF-BB aumentó significativamente la migración celular provocando un 53% de cierre de herida, comparándolo con el control que se observa un 16%. En cambio, cuando se incubó con Ang-(1-9) 3 h previas a la adición de PDGF-BB, se observó que las células migraron en la misma magnitud que el control. Con respecto al efecto con los antagonistas, cuando las células se pretrataron con PD123319, el efecto de Ang-(1-9) de prevenir la inducción de la migración por PDGF-BB se perdió. En cambio, el pretratamiento con A779 no produjo ningún cambio en el efecto de Ang-(1-9) sobre la migración inducida por PDGF-BB. Además, se realizó el ensayo de migración por cámaras Transwell, ratificando el resultado de que Ang-(1-9) previene la migración inducida por PDGF-BB y que este efecto se pierde cuando se utiliza un antagonista del AT2R (Figura 10). Estos resultados sugieren que Ang-(1-9) previene la migración inducida por PDGF-BB a través del AT2R, sin participación del MasR.

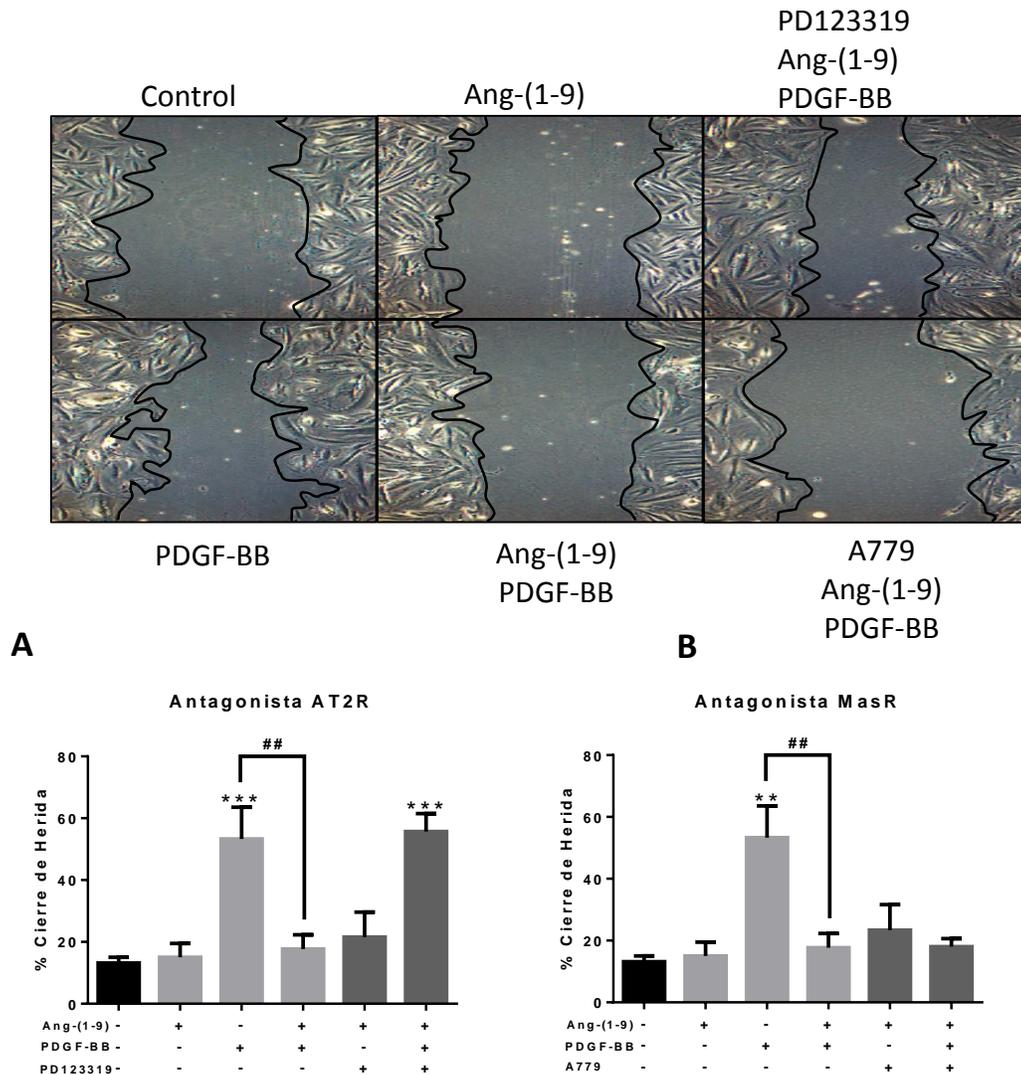


Figura 9. Ang-(1-9) previene el cierre de herida inducida por PDGF-BB en VSMC dependiente de AT2R.

Se cultivaron células A7r5 hasta confluencia y se les realizó una herida usando una punta amarilla de micropipeta. Luego, el medio de cultivo DMEM se suplementó con bromo deoxiuridina (100 μ M) y las células pretrataron con **(A)** PD123319 (1 μ M) o **(B)** A779 (10 μ M) 30 min antes de la adición de Ang-(1-9) (1 μ M), y finalmente se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Las heridas se registraron fotográficamente al inicio y a las 24h. Los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida respecto al tamaño de la herida inicial. n = 5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. **p<0,01; ***p<0,001 vs control. ##p<0,01 vs PDGF-BB.

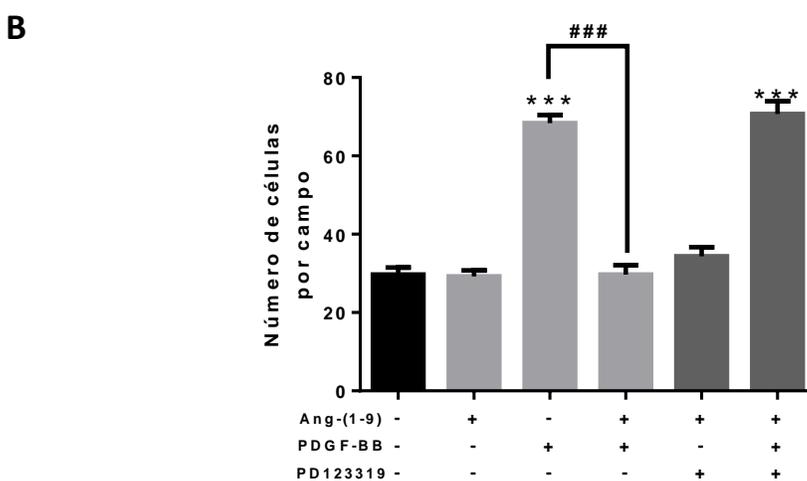
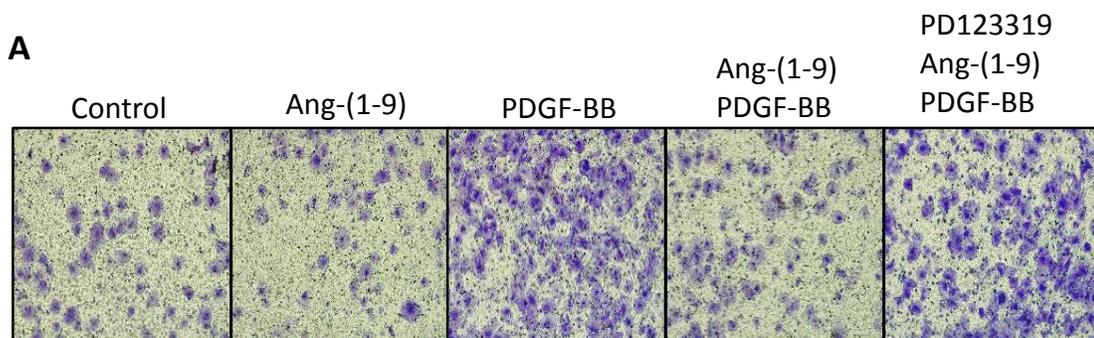


Figura 10. Ang-(1-9) previene la migración inducida por PDGF-BB en VSMC dependiente de AT2R.

Las células A7r5 se pretrataron con PD123319 (1 μ M) antagonista del AT2R 30 min antes de la adición de Ang-(1-9) (1 μ M), después de una incubación por 3 h, las células se trataron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Posteriormente, las células se sembraron en el pocillo superior de cámaras Transwell. Después de 4 h, se eliminaron las células de la cámara superior y las células que migraron se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. **(A)** Imágenes representativas de las células A7r5, 4 h posteriores al ensayo de Transwell. **(B)** Cuantificación del ensayo Transwell. Los resultados se expresaron como número de células que migraron. n = 5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. ***p<0,001 vs control. ###p<0,001 vs PDGF-BB.

VI.3.2. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre los niveles de proteínas contráctiles

Uno de los marcadores más importantes del cambio de fenotipo de las VSMC es la expresión de proteínas de tipo contráctil. Como ya se mostró anteriormente, la incubación con el factor de crecimiento PDGF-BB durante 24 h provocó una disminución en los niveles de las proteínas contráctiles α -SMA, SM22 y calponina. Al mismo tiempo, durante la estandarización de la concentración efectiva de Ang-(1-9) se demostró que el tratamiento previo por 3 h de Ang-(1-9) prevenía el efecto de PDGF-BB. Sin embargo, en esa ocasión solo se evaluó calponina. Esta vez se utilizaron las 3 proteínas antes mencionadas y el efecto fue el mismo. Ang-(1-9) previno la disminución en los niveles de proteínas contráctiles α -SMA, SM22 y calponina, inducido por PDGF-BB (Figura 11). Al pretratar con PD123319 el efecto de Ang-(1-9), para prevenir la disminución en las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB, se perdió. En cambio, cuando se pretrató A779, el efecto preventivo de Ang-(1-9) se mantuvo (Figura 12). Estos resultados sugieren que Ang-(1-9) previene la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB a través del AT2R, sin participación del MasR.

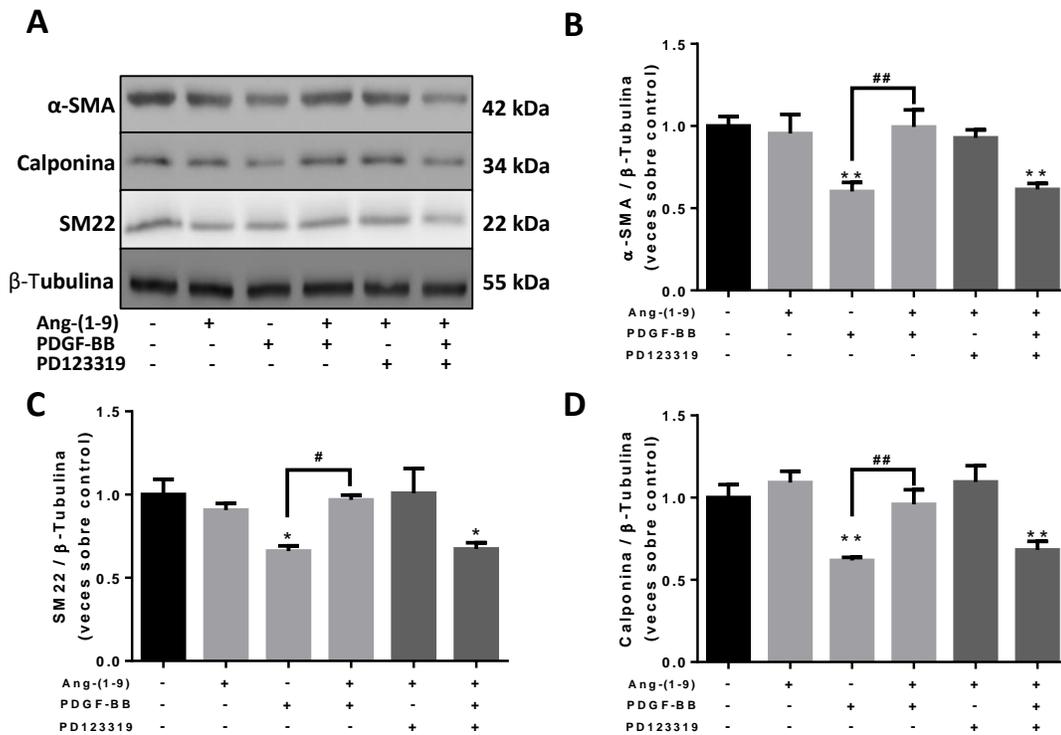


Figura 11. Ang-(1-9) previene la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC A7r5 dependiente de AT2R.

Células A7r5 se pretrataron con PD123319 (1 μ M) por 30 min antes de la adición de Ang-(1-9) (1 μ M) y luego de 3 h de incubación se trataron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y las proteínas contráctiles se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blot representativos y niveles totales de **(B)** α -SMA, **(C)** SM22 y **(D)** calponina. $n=5$. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs control. # $p<0,05$; ## $p<0,01$ vs PDGF-BB.

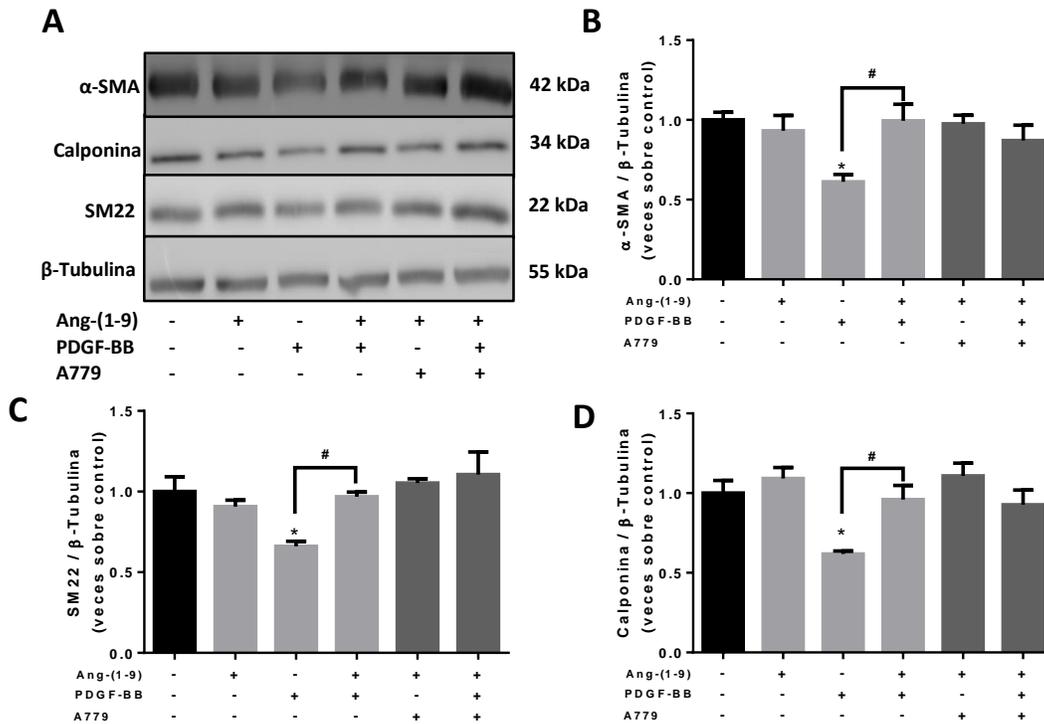


Figura 12. Ang-(1-9) previene la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB en VSMC A7r5 por un mecanismo independiente de MasR.

Células A7r5 se pretrataron con A779 (10 μ M) por 30 min antes de la adición de Ang-(1-9) (1 μ M) y luego de 3 h de incubación se trataron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y las proteínas contráctiles se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blot representativos y niveles totales de **(B)** α -SMA, **(C)** SM22 y **(D)** calponina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs PDGF-BB.

VI.3.3. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre la proliferación celular

Una de las técnicas utilizadas para cuantificar la proliferación celular es la medición de la proteína Ki67 por inmunofluorescencia. El tratamiento con PDGF-BB por 24 h aumentó la fluorescencia asociada a Ki67 por célula con respecto al control sugiriendo un aumento en la proliferación celular. Ang-(1-9) previno el efecto de PDGF-BB sobre Ki67 (Figura 13). Por lo tanto, estos datos sugieren que Ang-(1-9) estaría previniendo la proliferación celular inducida por PDGF-BB.

En un ensayo que mide los distintos estadios del ciclo celular de la población de células A7r5 que están en cultivo, Ang-(1-9) no modificó el ciclo celular basal de las VSMC (Figura 14). Las células estimuladas con PDGF-BB por 24 h muestran un desplazamiento de las poblaciones hacia la derecha del histograma, indicando mayor proporción de células en un estado de síntesis y de mitosis (G2 + M). La preincubación con Ang-(1-9) 3 h previas a la adición de PDGF-BB bloqueó el cambio en el perfil del histograma inducido por PDGF-BB (Figura 14). Estos resultados sugieren que Ang-(1-9) previno el cambio de la población de células en cultivo hacia un estado proliferativo inducido por PDGF-BB.

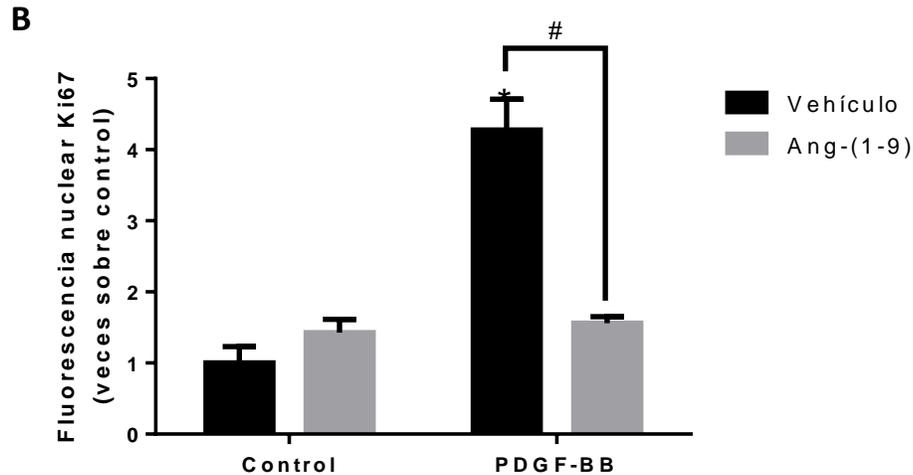
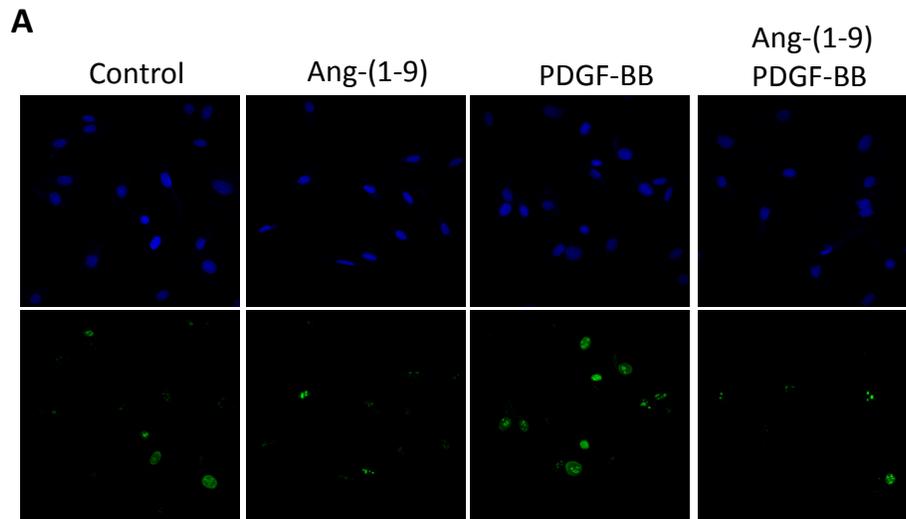


Figura 13. Ang-(1-9) previene el aumento de Ki67 inducida por PDGF-BB en VSMC.

Células A7r5, crecidas en portaobjetos, se pretrataron con Ang-(1-9) (1 μ M) por 3 h y luego con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Posteriormente las células se permeabilizaron, fijaron, bloquearon y se incubaron con un anticuerpo anti Ki67. La marca se detectó usando un segundo anticuerpo Alexa 488 (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). **(A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencias de Ki67 obtenidas por microscopía confocal. **(B)** Cuantificación de intensidad de fluorescencia nuclear de Ki67. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs PDGF-BB.

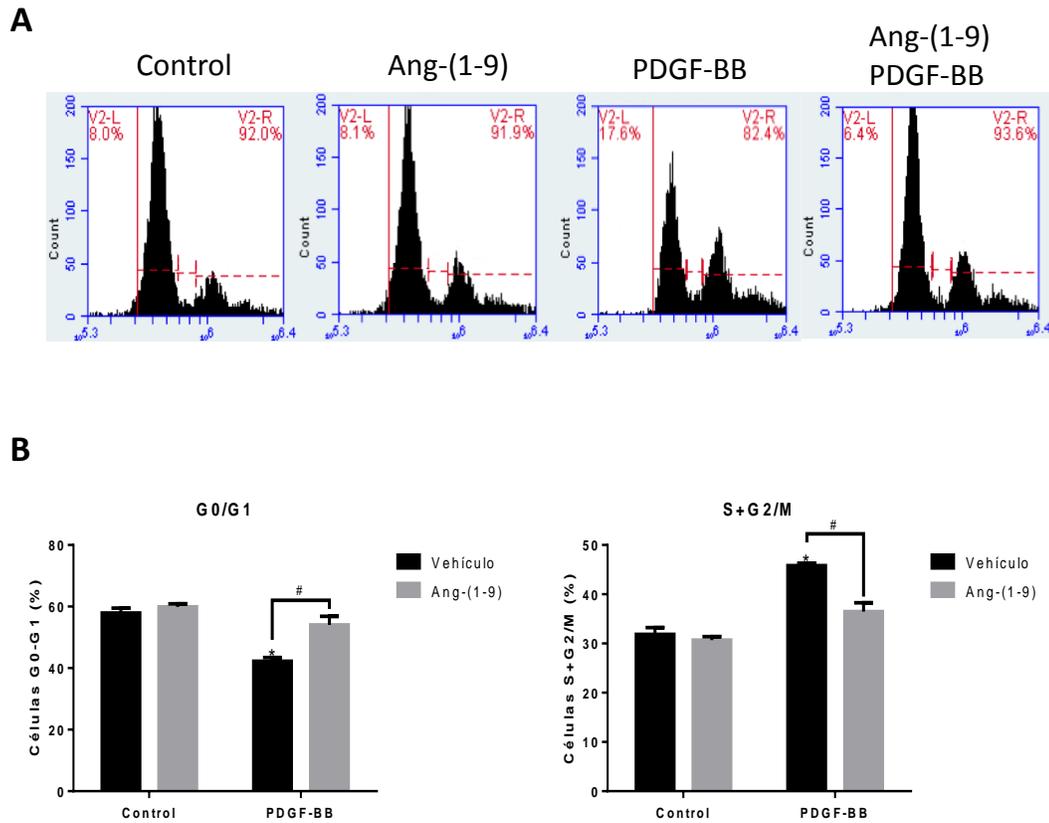


Figura 14. Ang-(1-9) previene el aumento en las poblaciones S y G2/M del ciclo celular inducido por PDGF-BB en VSMC.

Células A7r5 se pretrataron con Ang-(1-9) (1 μ M) por 3 h y luego con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Las células se soltaron con tratamiento con tripsina, se permeabilizaron con metanol frío, se incubaron con yoduro de propidio, y se analizaron por citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos. **(B)** Cuantificación de poblaciones de ciclo celular G0/G1 y S+G2/M. n=4. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs PDGF-BB.

Posteriormente, se realizó el experimento utilizando los antagonistas de AT2R y MasR. Se encontró resultados similares a los anteriores, en donde, el efecto de Ang-(1-9) se perdió cuando se preincubó con el antagonista PD123319. El efecto de prevención inducida por Ang-(1-9) se mantuvo cuando se utilizó el antagonista A779 (Figura 15). Por otra parte, al evaluar los niveles de ciclina D1, se observó que el tratamiento con PDGF-BB produjo un aumento en los niveles de ciclina D1, sugiriendo inducción de la proliferación celular. En cambio, cuando se trató previamente con Ang-(1-9), los niveles de ciclina D1 no aumentaron. Estos resultados sugieren que Ang-(1-9) previene el aumento de la proliferación celular inducida por PDGF-BB. Finalmente, la utilización de PD123319 bloqueó el efecto de Ang-(1-9) en los niveles de ciclina D1 (Figura 16).

Todos estos resultados indican que Ang-(1-9) previene la proliferación inducida por PDGF-BB. Este efecto sería dependiente del AT2R.

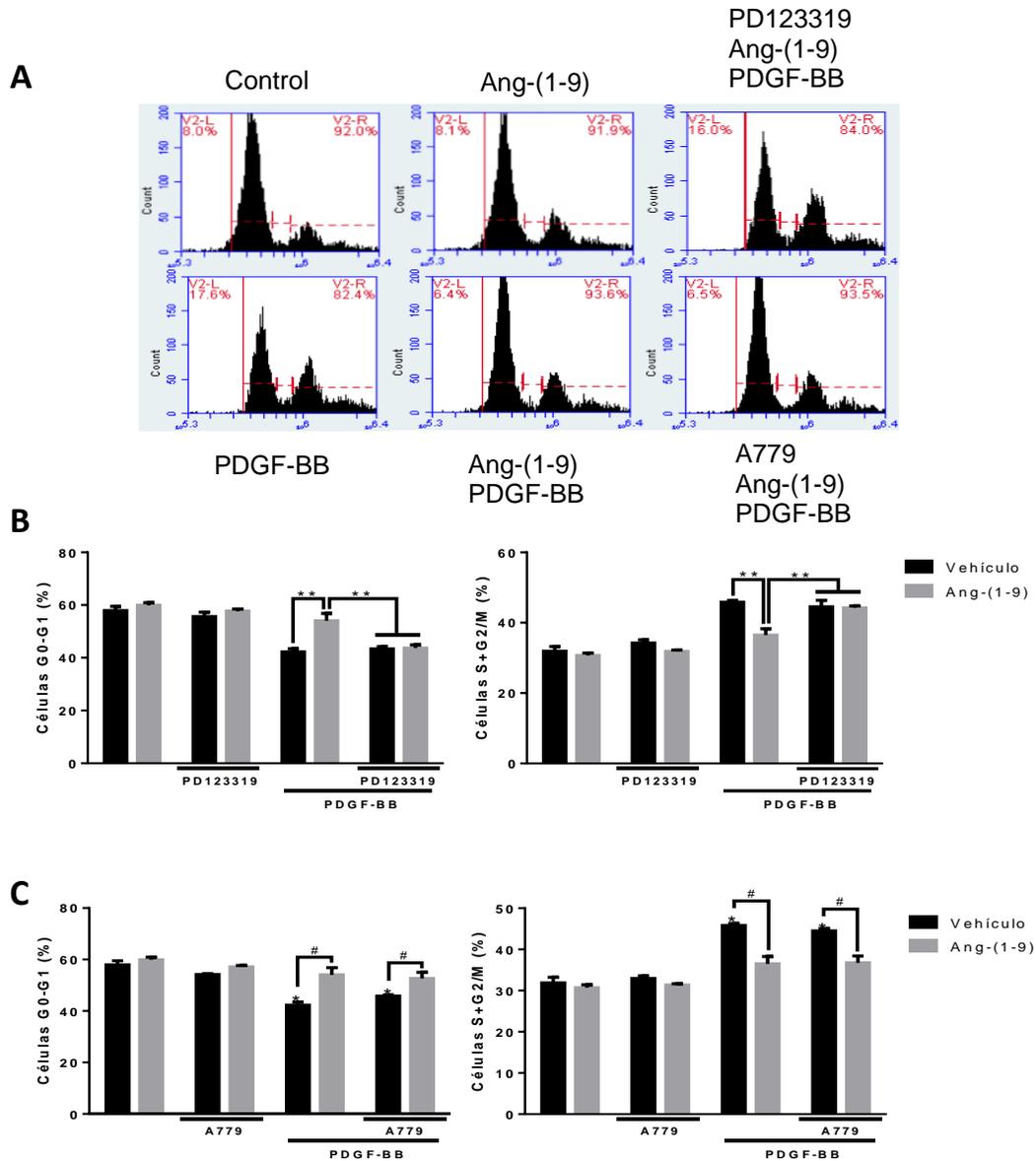


Figura 15. Ang-(1-9) previene el aumento en las poblaciones S y G2/M del ciclo celular inducido por PDGF-BB en VSMC, mediante AT2R.

Células A7r5 se pretrataron con PD123319 (1 μ M) o con A779 (10 μ M) por 30 min, luego con Ang-(1-9) (1 μ M) por 3 h y finalmente con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Las células se soltaron de la placa usando tripsina, suspensión celular se incubó con yoduro de propidio y luego se analizaron por citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos. Cuantificación de poblaciones en estadios del ciclo celular G0/G1 y S+G2/M de las células A7r5 pretratadas con **(B)** PD123319 y **(C)** A779. n=4. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *p<0,05; **p<0,01 vs control. #p<0,05 vs respectivo PDGF-BB + vehículo.

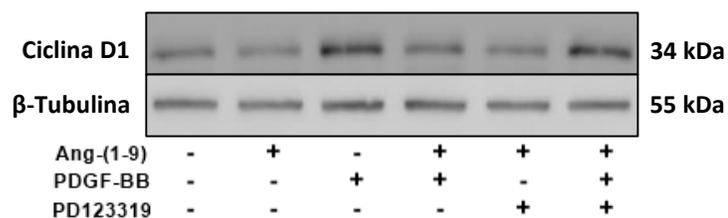
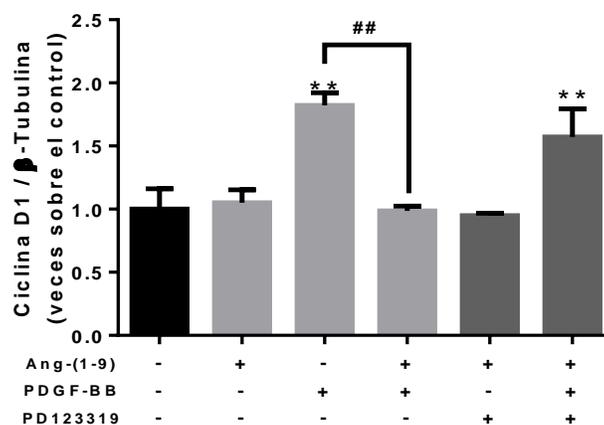
A**B**

Figura 16. Ang-(1-9) previene el aumento ciclina D1 inducida por PDGF-BB en VSMC dependiente de AT2R.

Células A7r5 se pretrataron con PD123319 (1 μ M) por 30 min antes de la adición de Ang-(1-9) (1 μ M) y luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y la ciclina D1 se determinó por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blot representativos. **(B)** Cuantificación de los niveles totales de ciclina D1. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. **p<0,01 vs control. ##p<0,01 vs PDGF-BB.

VI.3.4. Efecto del antagonismo de AT2R y MasR sobre la desdiferenciación en cultivo primario de VSMC

Para confirmar los resultados obtenidos en la línea celular A7r5, se utilizó un modelo de cultivo primario de células de musculo liso de aorta de rata adulta (RAMSC) (Figura 17). En este modelo se replicó el efecto de PDGF-BB como inductor del cambio de fenotipo de las VSMC. Se observó que PDGF-BB disminuyó los niveles de proteínas contráctiles y, al mismo tiempo, aumentó los niveles de ciclina D1 como marcador de proliferación. La incubación con Ang-(1-9) previno los efectos de PDGF-BB. Al antagonizar el AT2R, el efecto protector de Ang-(1-9) se perdió.

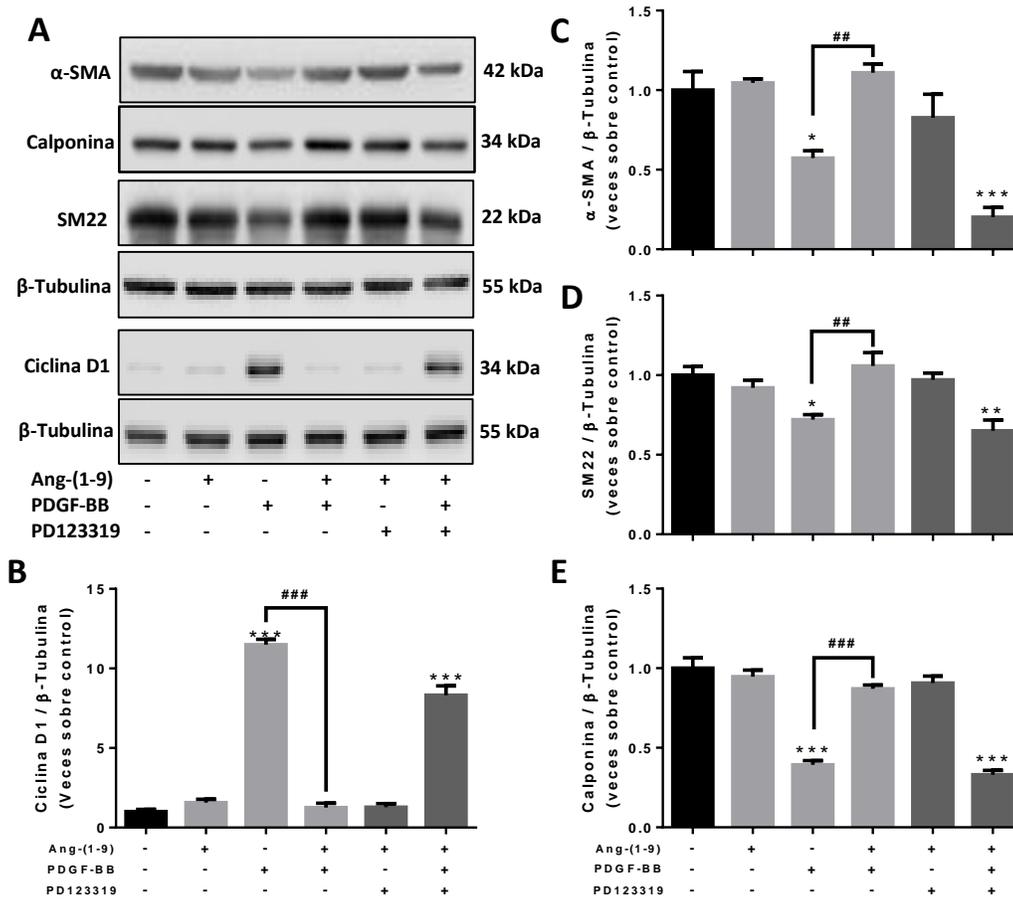


Figura 17. Ang-(1-9) previene la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB en cultivo primario dependiente de AT2R.

RASMC se pretrataron con PD123319 (1 μ M) por 30 min antes de la adición de Ang-(1-9) (1 μ M) y luego de 3 h de incubación se trataron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y las proteínas contráctiles y de proliferación se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blot representativos y niveles totales de **(B)** ciclina D1, **(C)** α -SMA, **(D)** SM22 y **(E)** calponina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs control. # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$ vs PDGF-BB.

VI.4. Obj. 2. Evaluar si Angiotensina-(1-9) activa FoxO1 a través de la inhibición de Akt

Nuestros resultados preliminares se obtuvieron de la incubación con Ang-(1-9) 100 μ M sobre las VSMC (Figura 5). Debido al cambio en la concentración utilizada de Ang-(1-9) en los experimentos realizados en el objetivo específico 1, se realizó una nueva cinética de tiempo utilizando la concentración de 1 μ M de Ang-(1-9). Este experimento fue necesario para comprobar si el aumento en los niveles de proteína FoxO1 a las 3 h, visto con la concentración de 100 μ M, se mantenía. Para esto se evaluó mediante Western blot los niveles proteicos de Akt fosforilada y de Akt total, además de los niveles proteicos de FoxO1.

VI.4.1. Efecto de Ang-(1-9) sobre los niveles de fosforilación de Akt y FoxO1

Al igual que lo que ocurría con Ang-(1-9) 100 μ M, la incubación con Ang-(1-9) 1 μ M por 30 min indujo una disminución de 30% en la fosforilación de Akt, la que se perdió a los 60 min. Otro punto relevante es que no se observaron cambios en los niveles totales de Akt durante todo el período de incubación con Ang-(1-9) (0- 24 h) (Figura 18).

La incubación con Ang-(1-9) 1 μ M por 30 min indujo una disminución de 35% en la fosforilación de FoxO1. Este resultado se correlacionó con el observado con Akt en la figura 18. Por otro parte, el tratamiento por 3 h con Ang-(1-9) 1 μ M aumentó significativamente los niveles de FoxO1 en un 50%. No se observaron variaciones en los otros tiempos en los que se midió el efecto de Ang-(1-9) (Figura 19).

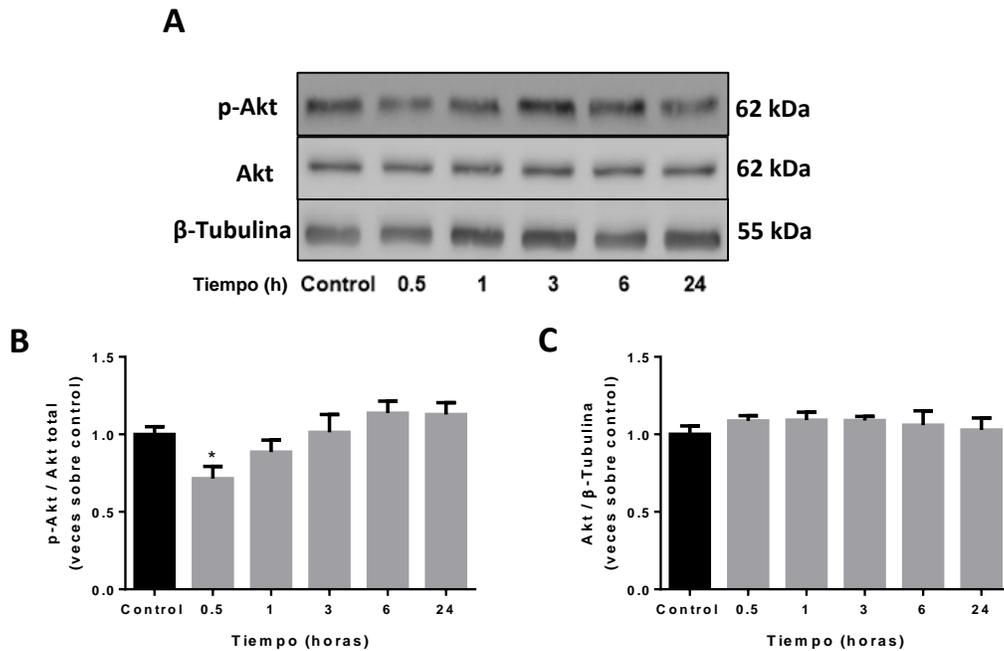


Figura 18. Efecto de Ang-(1-9) 1 μ M sobre la fosforilación de Akt. Células A7r5 se trataron con Ang-(1-9) (1 μ M) por 0,5, 1, 3, 6 y 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales. Las proteínas fosforiladas (p-Akt Ser⁴⁷³ y p-FoxO1 Thr²⁴) y totales se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blots representativos. Cuantificación de **(B)** la razón p-Akt/Akt y **(C)** niveles totales de Akt relativizados por β -tubulina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control.

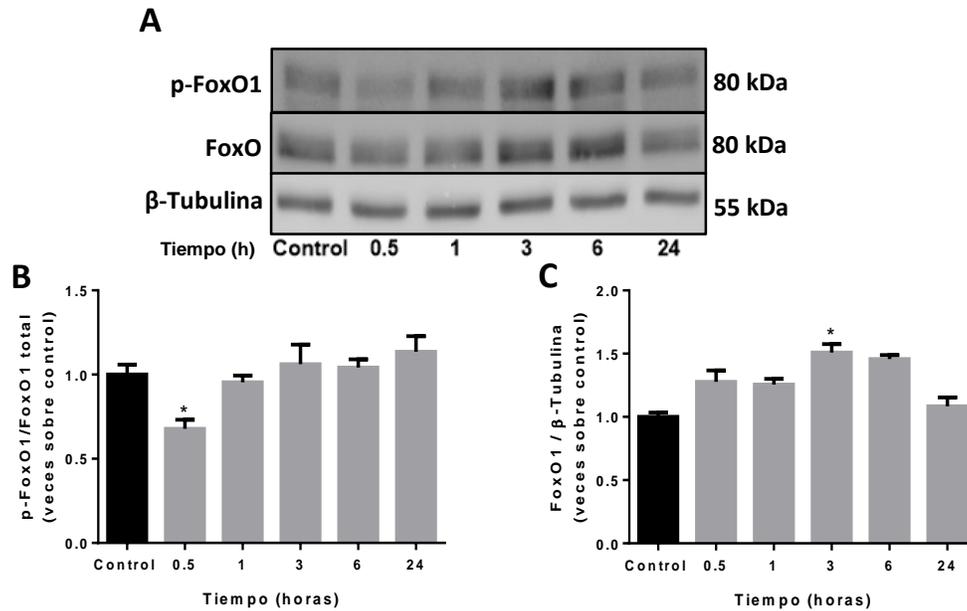


Figura 19. Efecto de Ang-(1-9) 1 μ M sobre la fosforilación de FoxO1.

Células A7r5 se trataron con Ang-(1-9) (1 μ M) por 0,5, 1, 3, 6 y 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales. Las proteínas fosforiladas y totales se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blots representativos. Cuantificación de **(B)** la razón p-FoxO1/FoxO1 y **(C)** niveles totales de FoxO1 relativizados por β -tubulina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. * $p < 0,05$ vs control.

VI.4.2. Efecto de Ang-(1-9) sobre la localización celular de FoxO1

Los estados de fosforilación de FoxO1 son determinantes para su acción como factor de transcripción, en donde es necesario que se encuentre desfosforilado para poder estar localizado en el núcleo y ejercer su acción [46]. Por lo que, con los resultados obtenidos en la figura 19, se realizó un fraccionamiento núcleo/citoplasma en los dos tiempos en que se encontraron efectos de Ang-(1-9), 30 min y 3 h.

Ang-(1-9) por 30 min indujo una modificación en la localización de FoxO1, promoviendo la traslocación al núcleo. Se observó una disminución en la cantidad de FoxO1 que se encontraba en el citoplasma y al contrario, se observó un aumento en la cantidad de FoxO1 que se encontraba en el núcleo (Figuras 20A-B). De forma interesante, al tiempo de 3 h, en donde la cantidad de FoxO1 aumenta, no se pudo determinar traslocación nuclear de FoxO1, debido a que se observó un aumento de sus niveles tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figuras 20C-D).

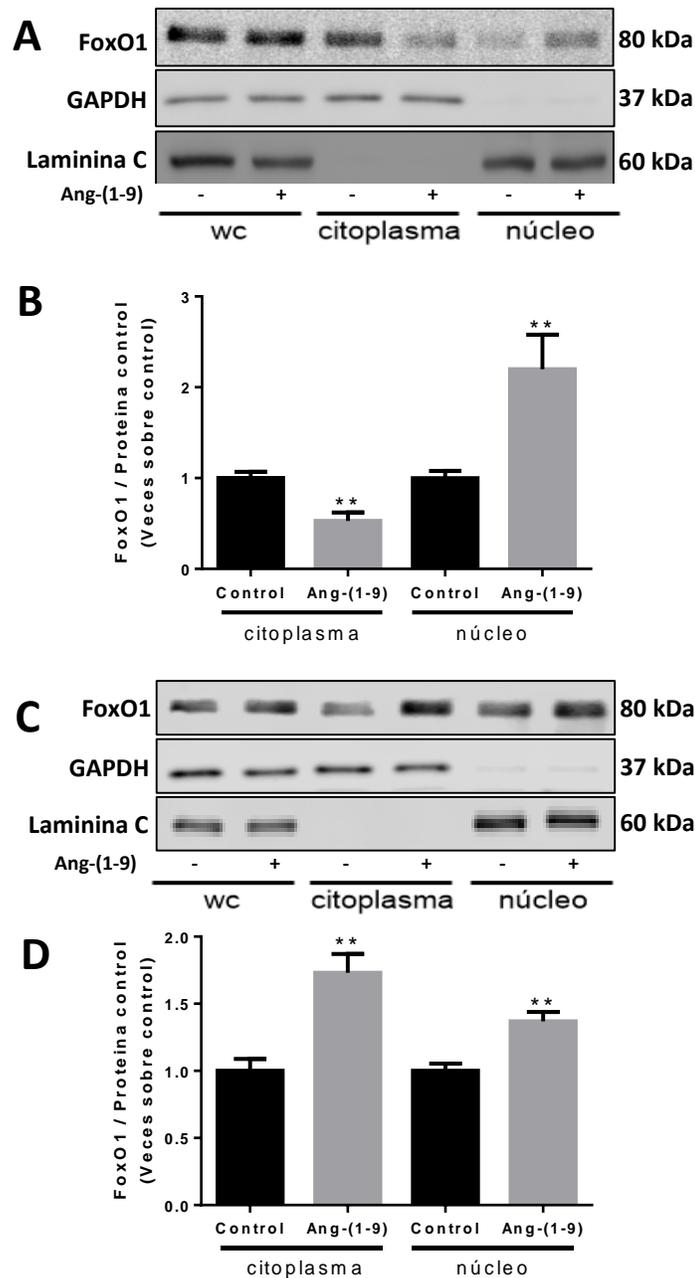


Figura 20. Ang-(1-9) promueve la localización nuclear de FoxO1.

Células A7r5 se trataron con Ang-(1-9) 1 μ M por (A y B) 30 min o (C y D) 3 h. Se realizó el aislamiento de las fracciones citoplasmática y nuclear como se describió en metodología. Las proteínas FoxO1, GAPDH (control fracción citoplasma) y laminina C (control fracción nuclear) se determinaron por Western blot. Además, como control se muestra el lisado completo (wc). (A y C) Western blots representativos. (B y D) Cuantificación de los niveles proteicos de FoxO1 relativizados por su respectiva proteína control. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un t-student. **p<0,01 vs control.

VI.4.3. Evaluación de PD123319 y Akt-Myr en el efecto de Ang-(1-9) sobre los niveles de fosforilación de Akt y FoxO1

Como se observa en las figuras 18 y 19, la incubación con Ang-(1-9) 1 μ M por 30 min disminuyó la fosforilación de Akt y FoxO1. Además, el tratamiento por 3 h con Ang-(1-9) 1 μ M aumentó los niveles totales de FoxO1. Para determinar si estos efectos son dependientes de AT2R y de Akt, se utilizó el antagonista del AT2R, PD123319, y se sobreexpresó Akt constitutivamente activo (Akt-Myr).

PD123319 bloqueó los efectos de Ang-(1-9), ya que no se evidenció la disminución de la fosforilación a los 30 min tanto de Akt como de FoxO1 inducida por Ang-(1-9). Además, cuando se incubó con Ang-(1-9) por 3 h, PD123319 también impidió el aumento en la cantidad de FoxO1 (Figura 21). Por otro lado, la sobreexpresión de Akt constitutivamente activo, previno la disminución en la fosforilación de FoxO1 dependiente de Ang-(1-9) a los 30 min, e inhibió también el aumento a las 3 h de FoxO1 (Figura 22).

Estos resultados en conjunto sugieren que Ang-(1-9) promueve la fosforilación de FoxO1, y que este efecto sería dependiente de AT2R y Akt.

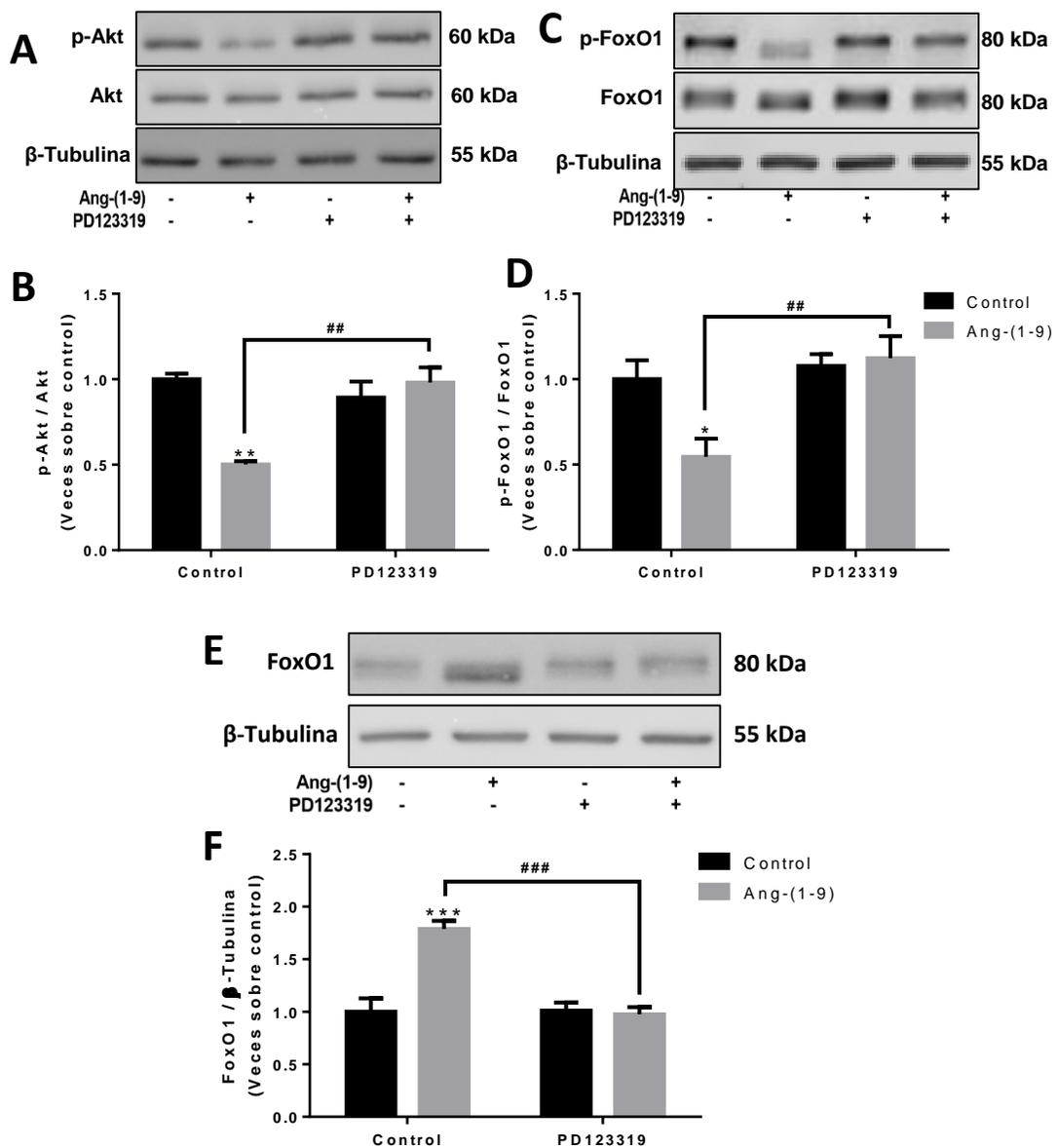


Figura 21. PD123319 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre el aumento de los niveles de FoxO1.

Células A7r5 se trataron con Ang-(1-9) 1 μ M por (A, B, C y D) 30 min o (E y F) 3 h con o sin preincubación con PD123319 1 μ M por 30 min. Se prepararon extractos proteicos totales. Las proteínas fosforiladas (p-Akt Ser⁴⁷³ y p-FoxO1 Thr²⁴) y totales se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. (A, C y E) Western blots representativos. Cuantificación de (B) la razón p-Akt/Akt, (D) la razón p-FoxO1/FoxO1 y (F) niveles totales de FoxO1 relativizados por β -tubulina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs control. ##p<0,01; ###p<0,001 vs Ang-(1-9).

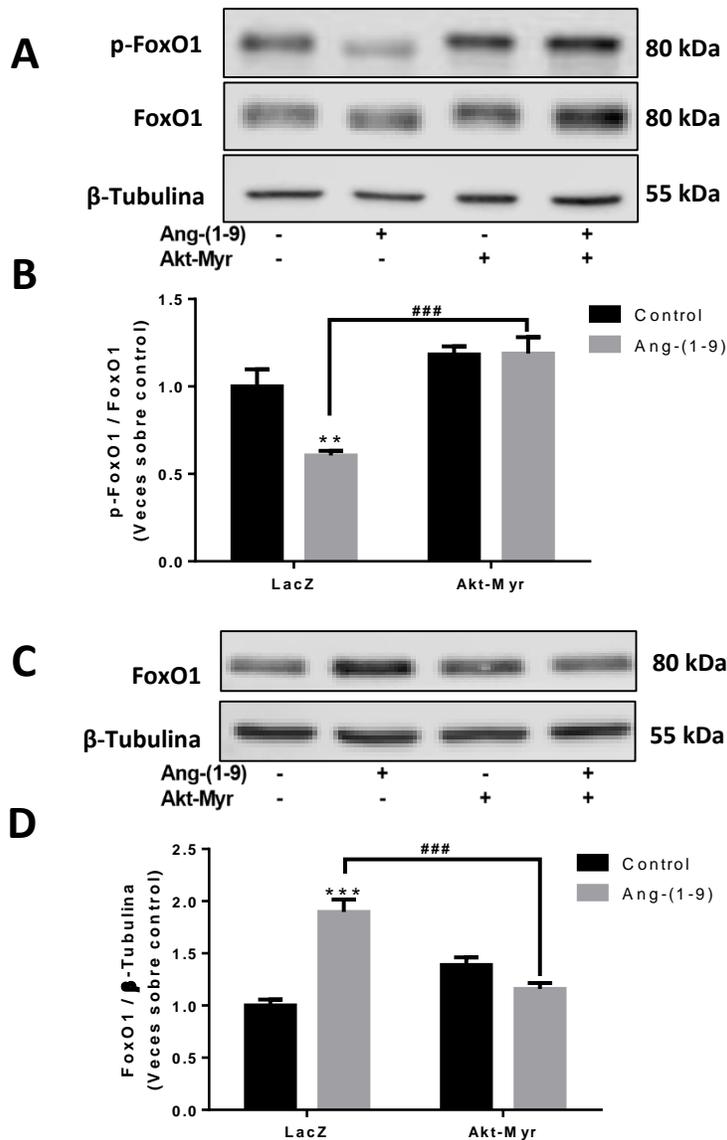


Figura 22. La sobreexpresión de Akt-Myr bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre el aumento de los niveles de FoxO1.

Células A7r5 se transdujeron con un adenovirus para sobreexpresar Akt constitutivamente activo (Akt-Myr) con un MOI de 1000 por 24 h. Posteriormente, se trataron con Ang-(1-9) 1 μ M por (A y B) 30 min o (C y D) 3 h. Se prepararon extractos proteicos totales. Las proteínas fosforiladas (p-FoxO1 Thr²⁴) y totales se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. (A y C) Western blots representativos. Cuantificación de (B) la razón p-FoxO1/FoxO1 y (D) niveles totales de FoxO1 relativizados por β -tubulina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías, con un post test Holm-Sidak. **p<0,01; ***p<0,001 vs control. ###p<0,001 vs Ang-(1-9).

VI.5. Obj. 3. Determinar si la activación de FoxO1 por Angiotensina-(1-9) inhibe la desdiferenciación de las VSMC inducido por PDGF-BB.

Finalmente, luego de demostrar que Ang-(1-9) previene el cambio de fenotipo de las VSMC inducido por PDGF-BB, y que este efecto depende del AT2R asociado con la activación de FoxO1, se evaluó si es que el efecto de Ang-(1-9) era dependiente de FoxO1. Esto se realizó utilizando un inhibidor químico de FoxO1, AS1842856, por media hora antes del tratamiento con Ang-(1-9) y PDGF-BB. Además, se utilizó un siRNA FoxO1 para disminuir los niveles de la proteína 24 h antes del tratamiento con Ang-(1-9) y PDGF-BB. Por último, para imitar los efectos de Ang-(1-9) se utilizó un adenovirus para aumentar los niveles de FoxO1 24 h previas al tratamiento con PDGF-BB. Al finalizar todos los estímulos como marcadores de la desdiferenciación se evaluaron los niveles de proteínas contráctiles y de proliferación, y de los ensayos de herida y Transwell para migración.

VI.5.1. Estandarización del silenciamiento de FoxO1

Lo primero que se realizó fue una cinética de tiempo para determinar la efectividad del silenciamiento y por cuanto tiempo duraba el efecto. Mediante Western blot se determinó los niveles totales de FoxO1 a las 24, 48 y 72 h de incubación con el siRNA para FoxO1. Los resultados obtenidos muestran que desde las 24 h el silenciamiento fue efectivo, disminuyendo la proteína en un 90%. Este efecto que se mantuvo hasta las 72 h (Figura 23). Además, se midieron los niveles de proteínas contráctiles como control, y se observó que el silenciamiento de FoxO1 no provocó una alteración en los niveles de SM22 ni de calponina (Figura 23).

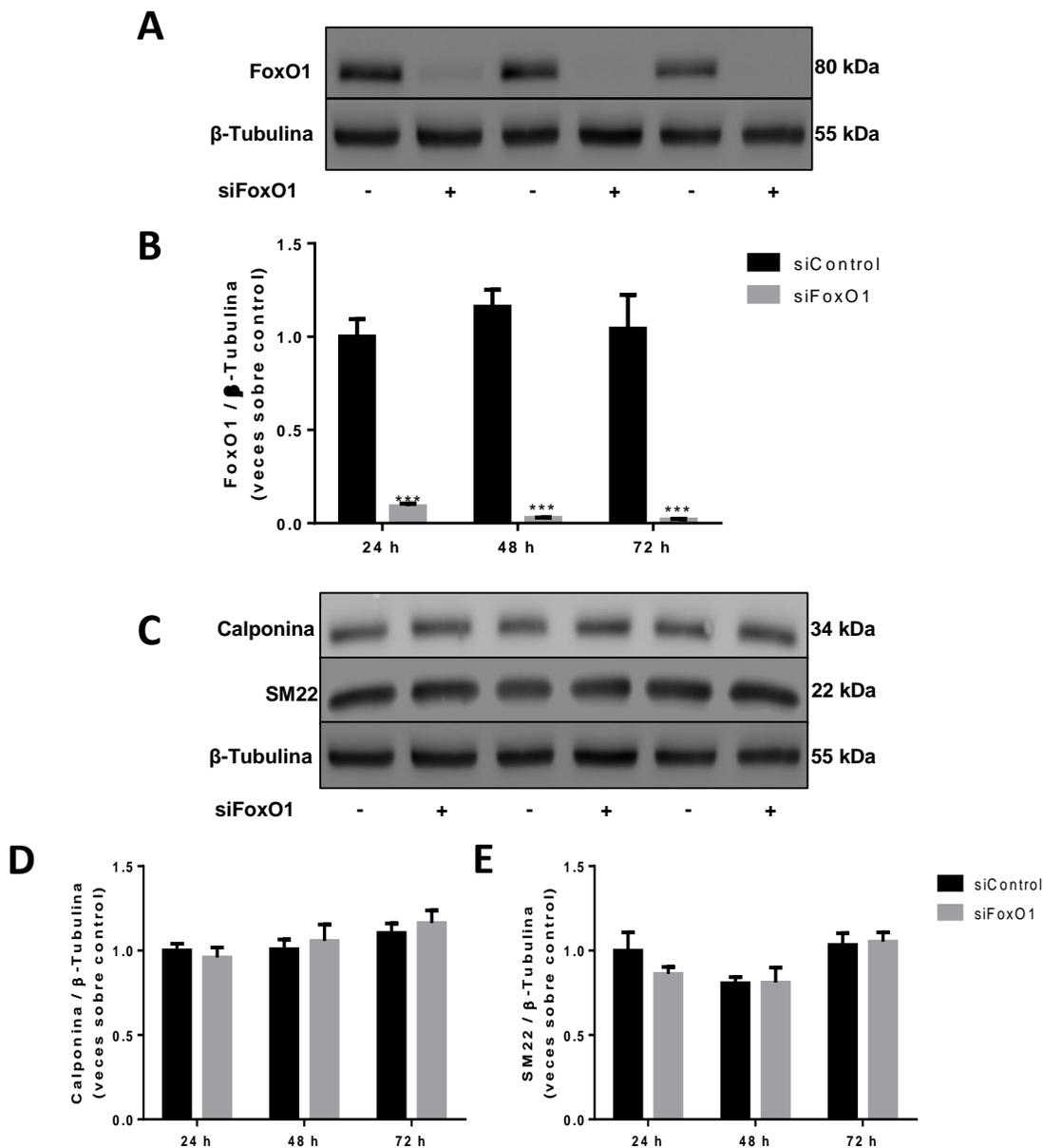


Figura 23. Estandarización silenciamiento de FoxO1 en el tiempo.

Células A7r5 se transfectaron con un siRNA para FoxO1 por 24, 48 y 72 h. Los niveles de FoxO1, calponina y SM22 se determinaron mediante Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blot representativo de FoxO1. **(B)** Cuantificación de los niveles totales de FoxO1. **(C)** Western blots representativos de calponina y SM22. Cuantificación de los niveles de **(D)** calponina y **(E)** SM22. $n=5$. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un t-student entre siControl y siFoxO1. *** $p<0,001$ vs siControl 24, 48 y 72 h, respectivamente.

VI.5.2. Efecto de la inhibición de FoxO1 sobre los niveles de proteínas contráctiles

Como ya se mostró anteriormente en el objetivo específico 1, la incubación con PDGF-BB durante 24 h provoca una disminución en los niveles de las proteínas contráctiles. Al mismo tiempo se demostró que el tratamiento previo por 3 h de Ang-(1-9) previene el efecto de PDGF-BB. En la figura 24, se muestra que este efecto se mantuvo a pesar de estar incubado previamente con un siRNA control. Pero al incubarse con siFoxO1 24 h antes, el efecto de Ang-(1-9) para prevenir la disminución en las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB se perdió. Por otro lado, los efectos protectores de Ang-(1-9) frente a la disminución de las proteínas contráctiles se bloquearon al utilizar el inhibidor químico de FoxO1 30 min antes de los estímulos (Figura 25). Estos resultados sugieren que Ang-(1-9) previene la disminución de las proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB por un mecanismo dependiente de FoxO1.

VI.5.3. Efecto de la inhibición de FoxO1 sobre la proliferación celular

En el objetivo específico 1, se demostró que la incubación con PDGF-BB durante 24 h aumenta la proliferación celular. Al mismo tiempo se demostró que el tratamiento previo por 3 h de Ang-(1-9) previene el efecto de PDGF-BB. En la figura 24, se muestra que los niveles de ciclina D1 como marcador de la proliferación no se modificó con el tratamiento con un siRNA control. En cambio, el tratamiento con siFoxO1 24 h antes, previno el efecto de Ang-(1-9) sobre el aumento en los niveles de ciclina D1 inducida por PDGF-BB (Figura 24). Estos resultados sugieren que Ang-(1-9) previene la proliferación inducida por PDGF-BB, y que este efecto sería por un mecanismo dependiente de FoxO1.

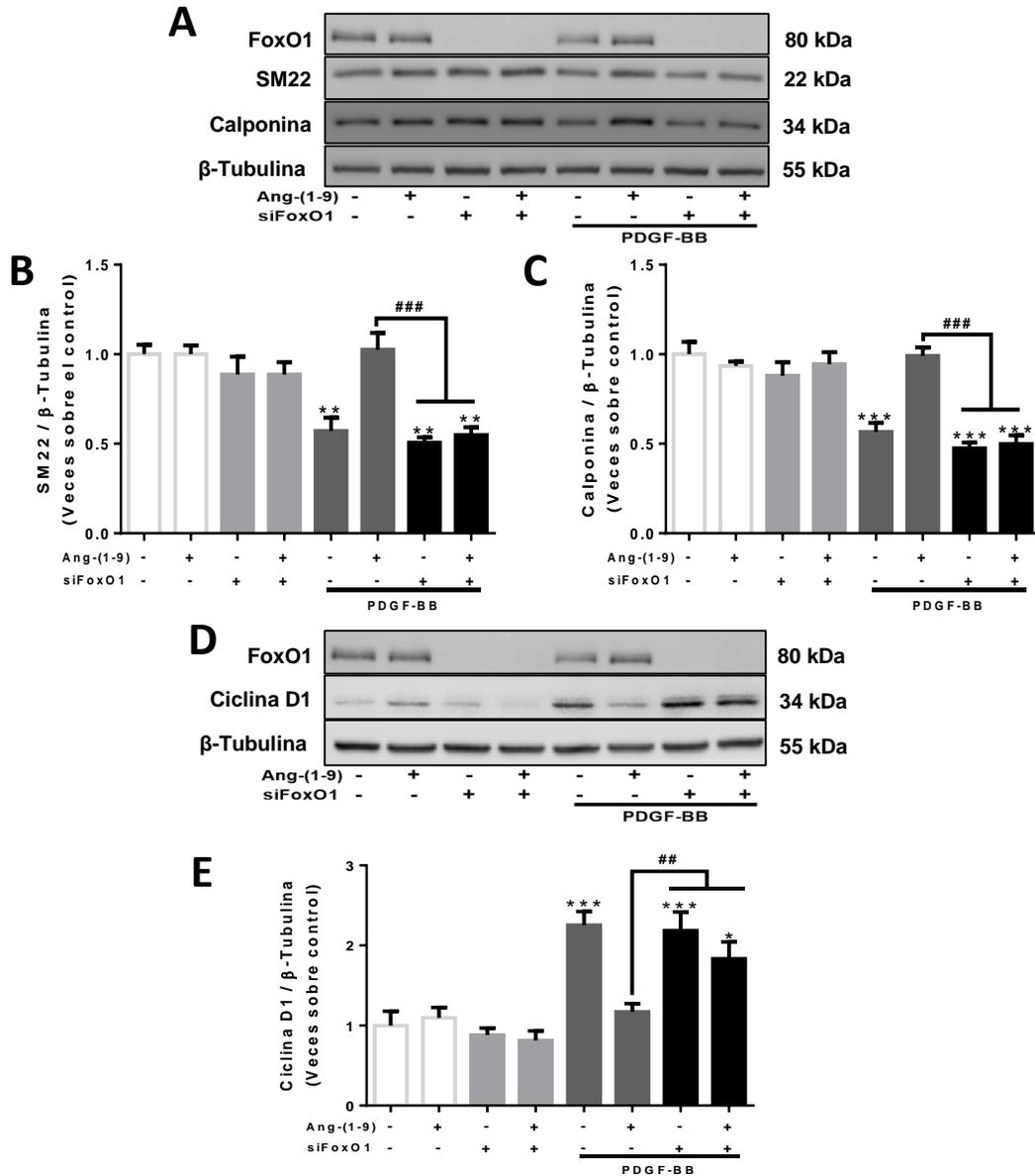


Figura 24. El silenciamiento de FoxO1 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la dediferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB.

Células A7r5 se transfectaron con un siRNA para FoxO1 por 24 h. Posteriormente, se trataron con Ang-(1-9) 1 μ M por 3 h y luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales. Las proteínas contráctiles y de proliferación se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A y D)** Western blots representativos. Cuantificación de **(B)** SM22, **(C)** calponina y **(E)** ciclina D1. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs control. ##p<0,01; ###p<0,001 vs PDGF-BB + Ang-(1-9).

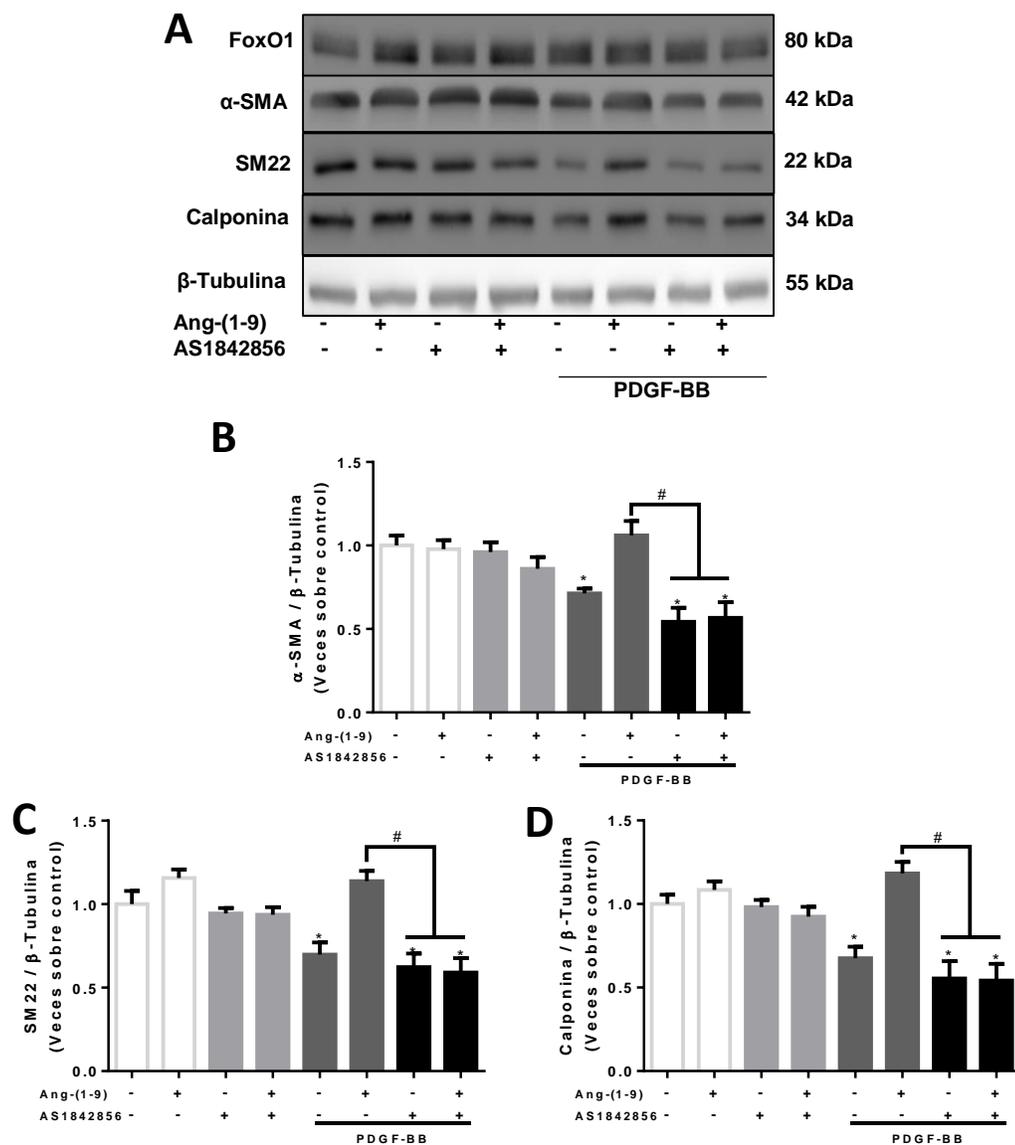


Figura 25. AS1842856 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la disminución de proteínas contráctiles de las VSMC inducida por PDGF-BB.

Células A7r5 se pretrataron con AS1842856 (1 μ M) por 30 min, y posteriormente se trataron con Ang-(1-9) 1 μ M por 3 h y luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales. Las proteínas contráctiles se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blots representativos. Cuantificación de **(B)** α -SMA, **(C)** SM22 y **(D)** calponina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías, con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs PDGF-BB + Ang-(1-9).

VI.5.4. Efecto de la inhibición de FoxO1 sobre la migración celular

En las figuras 26 y 27, se muestran los resultados del ensayo de Transwell para evaluar la migración celular inhibiendo a FoxO1. El siFoxO1 no modificó la migración basal de las VSMC A7r5. PDGF-BB indujo un aumento de la migración desde 25 ± 2 a 65 ± 4 células en las A7r5 tratadas con siRNA control. En estas células, Ang-(1-9) también previno la migración inducida por PDGF-BB (Figura 26). En cambio, cuando se utilizó un siFoxO1 24 h antes, el efecto preventivo de Ang-(1-9) frente a la inducción de la migración por PDGF-BB se perdió (Figura 26).

Basalmente, el inhibidor de FoxO1, AS1842856, no tiene ningún efecto en la migración de las VSMC A7r5. PDGF-BB indujo un aumento de la migración de 28 ± 2 a 64 ± 4 células. Cuando las células se pretrataron con el inhibidor AS1842856, el efecto de Ang-(1-9) de prevenir la inducción de la migración por PDGF-BB se perdió (Figura 27).

Estos resultados sugieren que Ang-(1-9) previene la migración inducida por PDGF-BB a través de la activación de FoxO1.

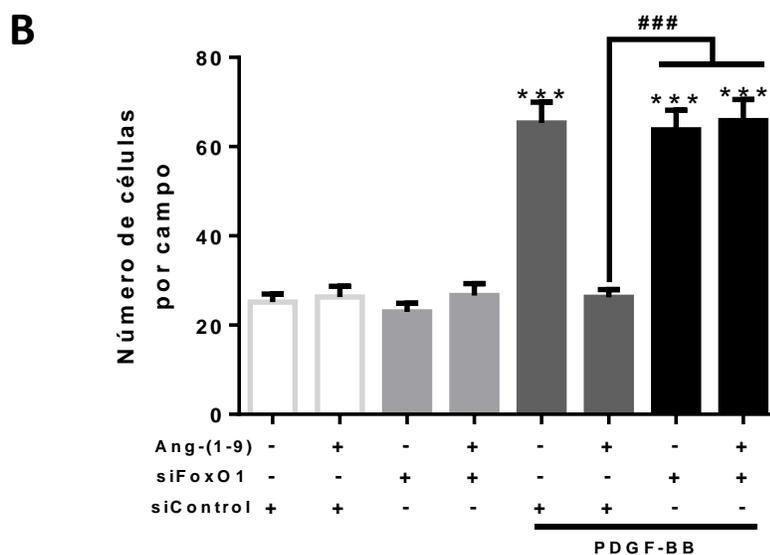
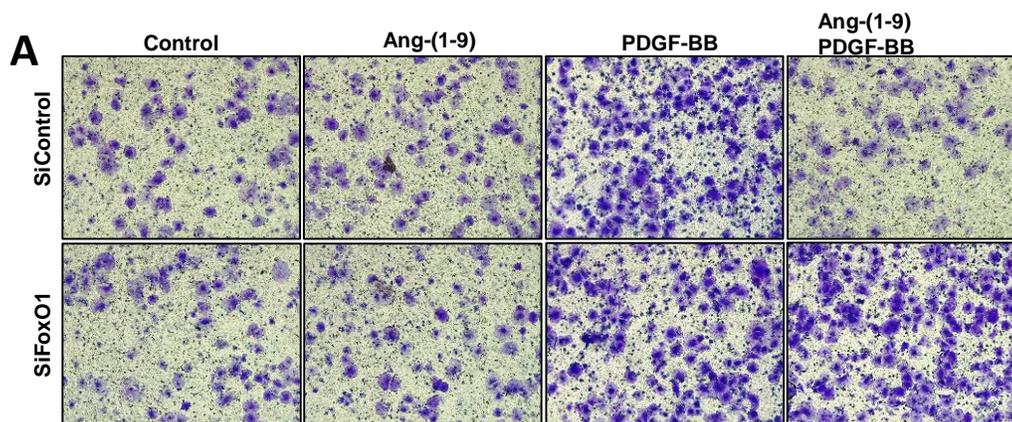


Figura 26. El silenciamiento de FoxO1 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la migración de las VSMC inducida por PDGF-BB.

Células A7r5 se transfectaron con un siRNA para FoxO1 por 24 h, y posteriormente se trataron con Ang-(1-9) 1 μ M por 3 h y luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se utilizó un siRNA control (siControl) como control de transfección. Posteriormente, las células se sembraron en el pocillo superior de cámaras Transwell. Después de 4 h, se eliminaron las células de la cámara superior y las células que migraron se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. **(A)** Imágenes representativas de las células A7r5, 4 h posteriores al ensayo de Transwell. **(B)** Cuantificación del ensayo Transwell. Los resultados se expresaron como número de células que migraron. $n = 5$. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *** $p < 0,001$ vs control. ### $p < 0,001$ vs PDGF-BB + Ang-(1-9).

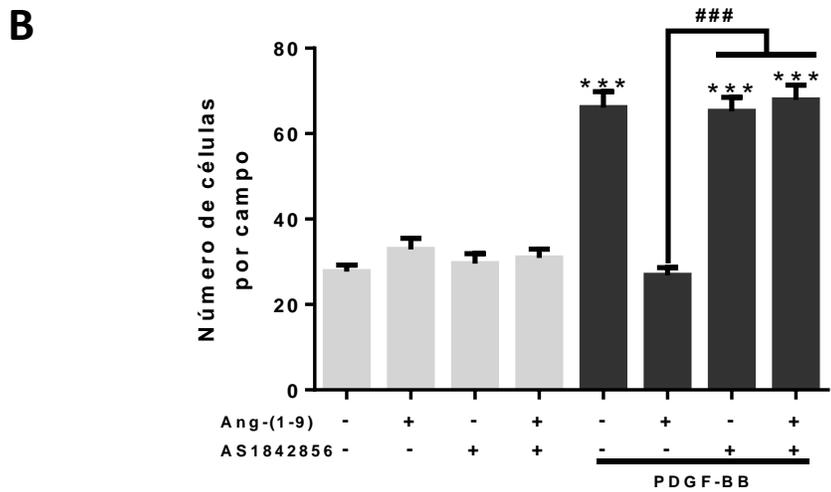
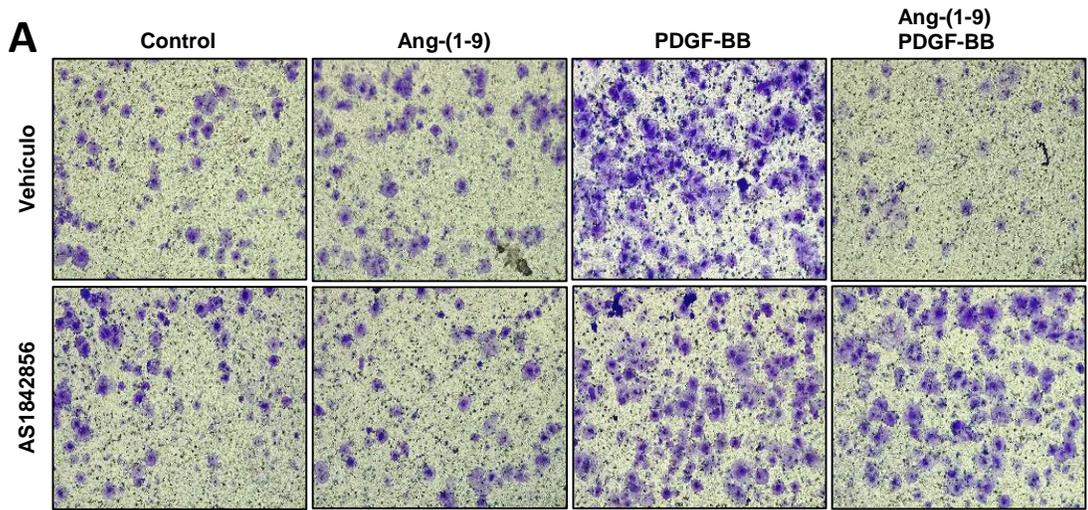


Figura 27. AS1842856 bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la migración inducida por PDGF-BB en VSMC.

Las células A7r5 se pretrataron con AS1842856 (1 μ M) 30 min antes de la adición de Ang-(1-9) (1 μ M), y luego de 3 h de incubación se trataron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Posteriormente, las células se sembraron en el pocillo superior de cámaras Transwell. Después de 4 h, se eliminaron las células de la cámara superior y las células que migraron se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. **(A)** Imágenes representativas de las células A7r5, 4 h posteriores al ensayo de Transwell. **(B)** Cuantificación del ensayo Transwell. Los resultados se expresaron como número de células que migraron. $n = 5$. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *** $p < 0,001$ vs control. ### $p < 0,001$ vs PDGF-BB + Ang-(1-9).

VI.5.5. Efecto de siFoxO1 sobre la desdiferenciación en un cultivo primario de VSMC

Nuevamente a modo de confirmar los resultados obtenidos en la línea celular A7r5, se utilizó el modelo de cultivo primario de RAMSC (Figura 28). En este modelo se replicaron los resultados obtenidos al disminuir los niveles de FoxO1 mediante un siRNA. En primera instancia se observa que la disminución de los niveles de FoxO1 no genera modificación en el contenido de proteínas contráctiles (SM22 y Calponina) ni de proliferación celular (ciclina D1). El efecto de PDGF-BB como inductor del cambio de fenotipo de las VSMC se mantuvo tanto en las células tratadas con un siRNA control como control de transfección, así como también en las células tratadas con el siRNA para FoxO1. PDGF-BB disminuyó los niveles de proteínas contráctiles (34% SM22 y 37% calponina) y aumentó los niveles de ciclina D1 como marcador de proliferación. Finalmente, al silenciar FoxO1, Ang-(1-9) no fue capaz de prevenir todos los efectos de PDGF-BB (Figura 28). Estos resultados fortalecen los hallazgos obtenidos anteriormente en la línea celular, que dan cuenta de la acción de Ang-(1-9) por un mecanismo dependiente de FoxO1.

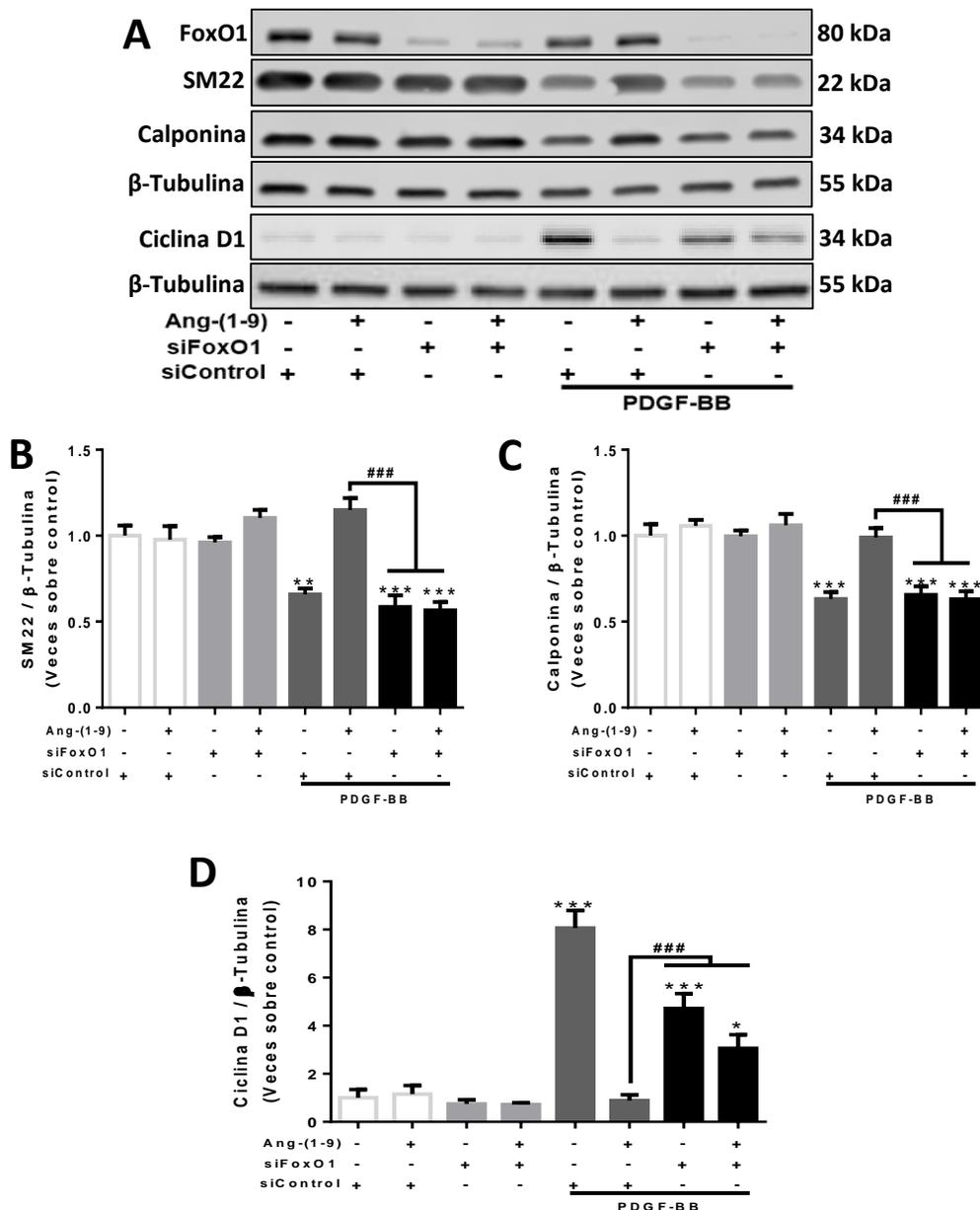


Figura 28. El silenciamiento de FoxO1 bloquea efecto de Ang-(1-9) sobre la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB en RASMC.

RASMC se transfectaron con un siRNA para FoxO1 o con siRNA control por 24 h, y posteriormente se trataron con Ang-(1-9) 1 μ M por 3 h y luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y las proteínas contráctiles y de proliferación se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blot representativos y niveles totales de **(B)** SM22, **(C)** calponina y **(D)** ciclina D1. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de dos vías con un post test Holm-Sidak. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 vs control. ###p<0,001 vs PDGF-BB + Ang-(1-9).

VI.5.6. Efecto de la sobreexpresión de FoxO1 sobre la desdiferenciación de VSMC

En último lugar, para corroborar la participación de FoxO1 en la regulación del cambio de fenotipo de las VSMC inducido por PDGF-BB, se utilizó la transducción adenoviral para sobreexpresar FoxO1 en células A7r5. Observándose que, cuando aumentaban los niveles de FoxO1 por la sobreexpresión, esto no alteraba la migración basal de las células ni tampoco la cantidad de proteínas contráctiles, debido a que se encontraron los mismos niveles que en la condición control. Por otra parte, PDGF-BB disminuyó la cantidad de proteínas contráctiles (39% α -SMA, 44% SM22 y 39% calponina). Este efecto se bloqueó en células que se sobreexpresó FoxO1 (Figura 29). En el mismo sentido, en el ensayo de herida, PDGF-BB aumenta la migración celular en un 55% en comparación al 22% de la condición control, pero no es capaz de inducir la migración de las células que sobreexpresan FoxO1 (Figura 30).

En consecuencia, estos resultados sugieren que cuando las células tienen una cantidad basal de FoxO1 aumentada, PDGF-BB no inducen el cambio de fenotipo de las VSMC.

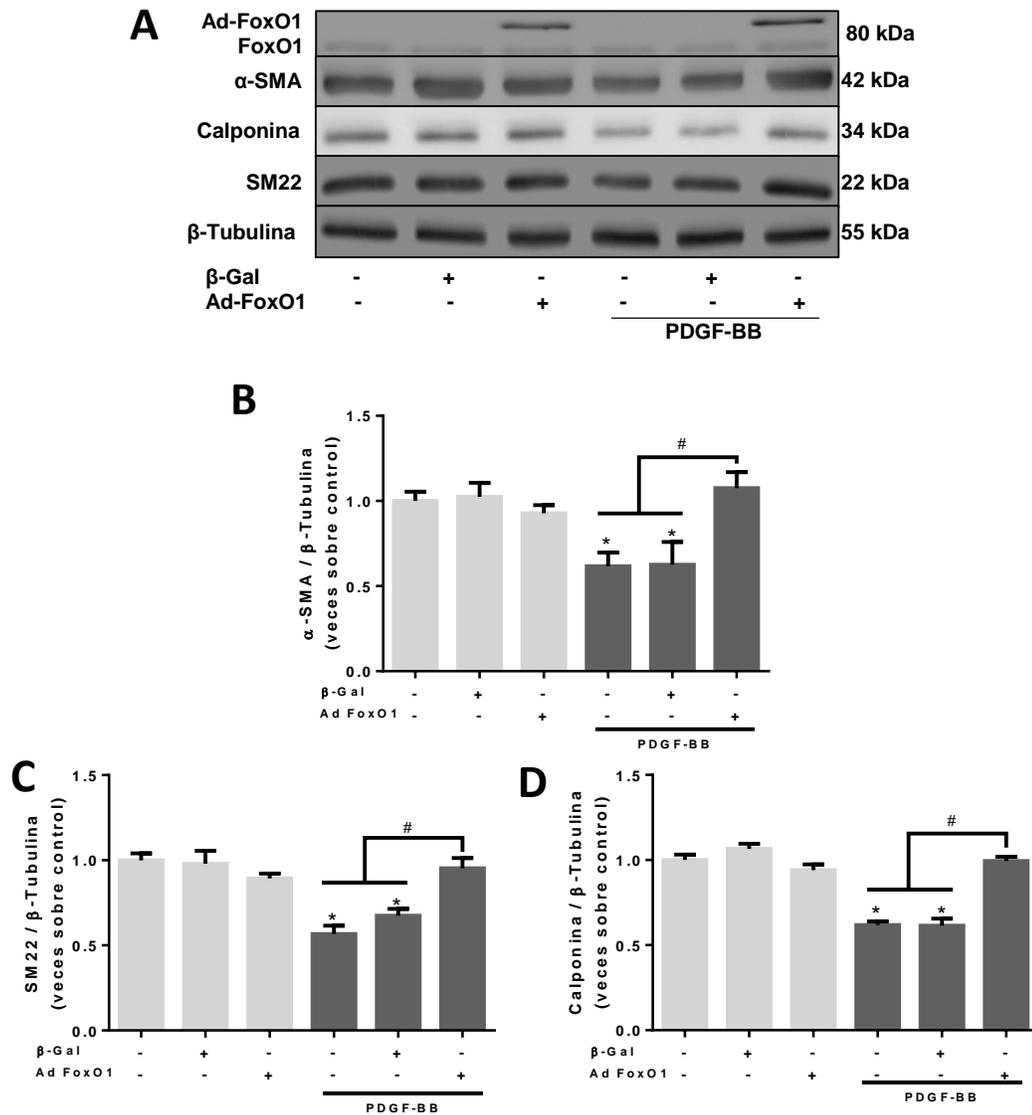


Figura 29. Sobreexpresión de FoxO1 previene la disminución de proteínas contráctiles de las VSMC inducida por PDGF-BB.

Células A7r5 se transdujeron con un adenovirus para sobreexpresar FoxO1-GFP (Ad FoxO1) con un MOI de 1000 por 24 h, luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Se prepararon extractos proteicos totales y las proteínas contráctiles se determinaron por Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. **(A)** Western blot representativos y niveles totales de **(B)** α -SMA, **(C)** SM22 y **(D)** calponina. n=5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. * $p < 0,05$ vs control. # $p < 0,05$ vs PDGF-BB + Ad FoxO1.

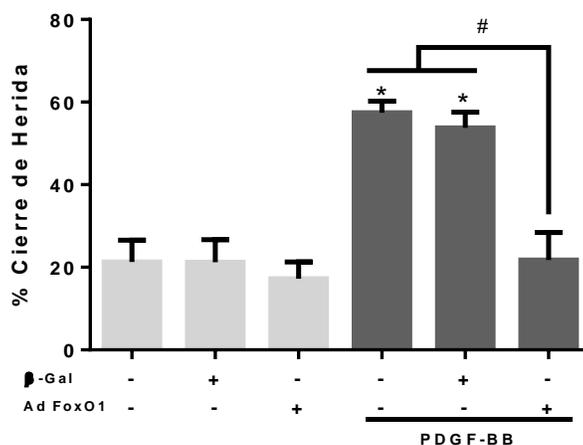
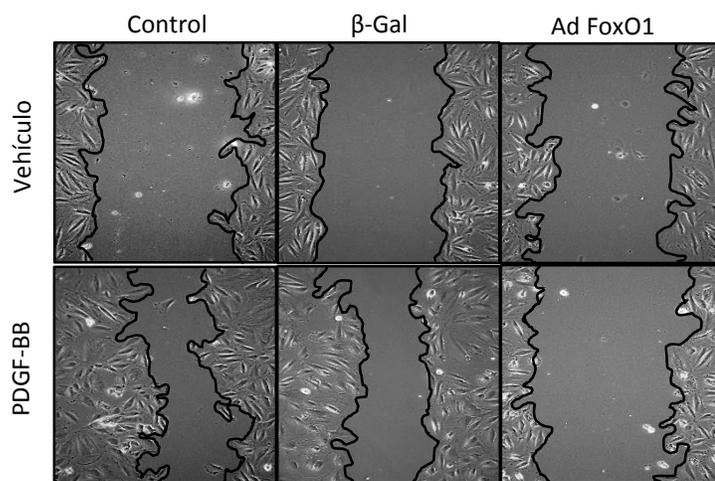


Figura 30. Sobreexpresión de FoxO1 previene la migración de las VSMC inducida por PDGF-BB.

Se cultivaron células A7r5 hasta confluencia y se les realizó una herida usando una punta amarilla de micropipeta. Luego, el medio de cultivo DMEM se suplementó con bromo deoxiuridina (100 μ M). Posteriormente se transdujeron con un adenovirus para sobreexpresar FoxO1-GFP (Ad FoxO1) o para sobreexpresar β -galactosidasa como control, ambos con un MOI de 1000 por 24 h, luego se incubaron con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h. Las heridas se registraron fotográficamente al inicio y a las 24h. Los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida respecto al tamaño de la herida inicial. n = 5. Promedio \pm EEM. El análisis realizado fue un ANOVA de una vía con un post test Holm-Sidak. *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs PGDF-BB + Ad FoxO1.

VII. Discusión

En esta tesis se estudia la regulación del fenotipo de las VSMC por parte de Ang-(1-9). En particular, como se muestra en el modelo final en la figura 31, se demostró que Ang-(1-9) previene la dediferenciación de las VSMC inducido por PDGF-BB. Este cambio de fenotipo es importante en la génesis y desarrollo de varias ECV [12, 13, 15]. Además, se comprobó que este efecto lo realiza a través del AT2R. En forma paralela, se demostró que los efectos protectores asociados a la activación de AT2R por Ang-(1-9) son mediados por la vía Akt/FoxO1.

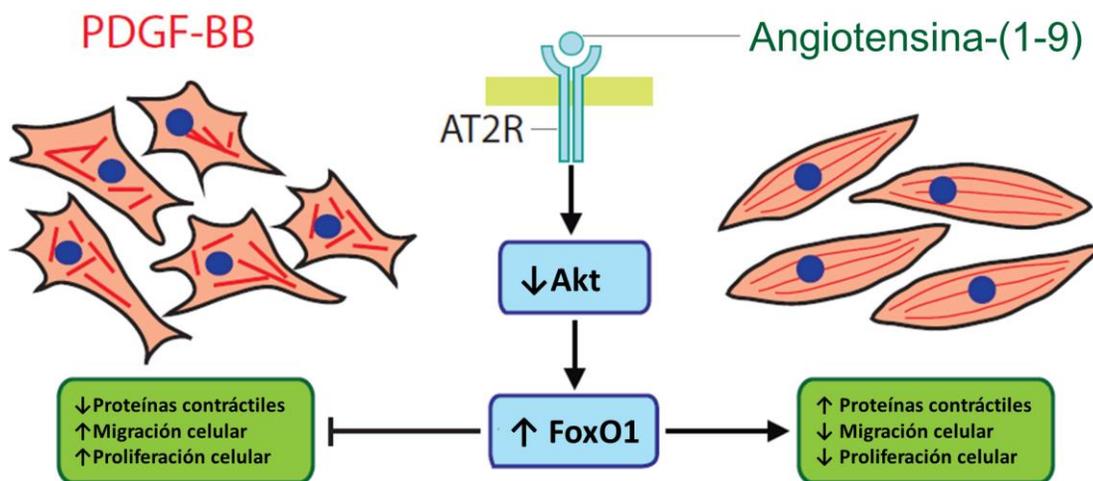


Figura 31. Modelo final

Angiotensina-(1-9), a través del AT2R, disminuye la fosforilación de Akt y promueve el aumento de FoxO1. Esto permite mantener el fenotipo diferenciado de las VSMC frente a estímulos dediferenciadores como PDGF-BB.

VII.1 Concentración de Ang-(1-9)

En primera instancia fue necesario encontrar la concentración efectiva de Ang-(1-9) para prevenir el cambio de fenotipo de las VSMC inducido por PDGF-BB. Sorpresivamente, la concentración mínima efectiva tanto para prevenir la migración y la disminución de proteína contráctil calponina inducida por PDGF-BB fue de 1 μM (Figura 6). Esta concentración fue 100 veces menor a la utilizada en los datos preliminares de la tesis y al mismo tiempo, es 100 veces menor a la concentración utilizada por varios investigadores como anti-hipertrófico en cultivos de cardiomiocitos neonatos [38, 39]. Que una concentración menor de Ang-(1-9) tuviera efectos no es nuevo, ya se había visto que la concentración de 3 μM era suficiente para provocar un aumento en la secreción de ANP en aurículas aisladas [58]. Por otra parte, la concentración efectiva encontrada es la misma utilizada en la literatura para los efectos de Ang-(1-9) como inótropo positivo en corazón aislado [41] y como inhibidor de la muerte por isquemia [42]. En este último estudio de Mendoza-Torres y cols. Se muestra que concentraciones menores a 1 μM de Ang-(1-9) mantiene efectos cardioprotectores pero son cada vez menos efectivos, lo que se asemeja a nuestros resultados que mostraron que a la concentración de Ang-(1-9) 100 nM se pierden todos los efectos.

In vitro, los distintos efectos protectores de Ang-(1-9), usando diferentes concentraciones, puede deberse a que los estímulos patológicos se realizan en temporalidades distintas. La prevención de la muerte por isquemia [42] y nuestros resultados se realizaron a las 24 h. En cambio, la hipertrofia *in vitro* fue ensayada a las 48 h de estimulación [39]. Esta diferencia, sumado además a la baja estabilidad del péptido puede contribuir a que sean necesarias concentraciones protectoras más altas. A nivel *in vivo*, también se han reportado diferencias en las concentraciones efectivas de Ang-(1-9). Con una infusión de 100 ng/kg/min se disminuye la fibrosis cardiaca y aumenta la biodisponibilidad de NO pero no disminuye la presión [40]. Sin embargo,

cuando se utiliza una infusión de 600 ng/kg/min se observa una disminución de la presión en modelos de hipertensión [43]. Por otra parte, las concentraciones encontradas a nivel plasmático tanto en humanos como en ratas son de 1 a 5 fmol/mL [38, 59]. Cuando se utilizan inhibidores de la ECA o antagonistas del AT1R en ratas, los niveles llegan a 25-40 fmol/mL [38]. Los valores plasmáticos logrados con la infusión de 600 ng/kg/min son de 14 fmol/mL, lo que contribuye a la discusión sobre si los efectos cardioprotectores de estos fármacos se deben solo a la inhibición de la vía clásica del RAS o se deben a los efectos del eje contra-regulador del RAS.

VII.2. Ang-(1-9) e inhibición de la desdiferenciación de las VSMC

La desdiferenciación de VSMC se evaluó mediante migración celular, proliferación y niveles de proteína contráctil. Estos tres parámetros se utilizan ampliamente para evaluar el cambio de fenotipo de las VSMC [12, 13]. Es importante destacar que Ang-(1-9) no modificó ninguno de los parámetros evaluados a los tiempos y a las concentraciones utilizadas en los experimentos. En este punto es importante mencionar que las condiciones de cultivo de los modelos utilizados son con medios con un alto contenido de glucosa, esto ya que se ha visto que condiciones de alta glucosa inducen cambio en el fenotipo de las VSMC [60, 61]. Por lo tanto, a pesar de que no se confirmó que en este modelo el alto contenido de glucosa afectara el fenotipo de las VSMC, nuestros resultados sugieren que Ang-(1-9) no revierte la proliferación ni migración celular inducida por las condiciones de alta glucosa del medio de cultivo, como si lo realizan moléculas como metformina [60].

Por otro lado, cuando las VSMC eran tratadas con PDGF-BB, un inductor bien conocido de desdiferenciación de VSMC [18, 62, 63], el contenido de proteínas contráctiles disminuía, las células migraban y proliferaban en mayor proporción. Sin embargo, cuando las VSMC fueron

pretratadas durante 3 h con Ang-(1-9), para posteriormente incubar con PDGF-BB, no se produjo ningún efecto de desdiferenciación. Por lo que, se evidencia que Ang-(1-9) previene los cambios inducidos por PDGF-BB en estos tres parámetros.

La inhibición de la desdiferenciación de VSMC también se describió para GLP-1 [18], exenatide [64, 65], exendin-4 [64], rapamicina [63], estatinas [66, 67] y muchos otros compuestos. Específicamente, con respecto a la migración celular, se obtuvieron resultados similares a los publicados previamente por nuestro laboratorio al utilizar GLP-1, y a los resultados publicados por otros laboratorios al utilizar exenatide, un análogo a GLP-1. Este tipo de herramientas farmacológicas han mostrado ser beneficiosas en el cambio de fenotipo de las VSMC [18, 64, 65]. En el mismo sentido, Ang-(1-9) fue capaz de prevenir la disminución de proteínas contráctiles inducida por PDGF-BB, del mismo modo que lo hacen fármacos que son ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades vasculares como rapamicina [63], o las estatinas [66, 67]. De manera interesante, estos resultados muestran que Ang-(1-9) regula el fenotipo de las VSMC manteniéndolo en un estado diferenciado, al igual como lo hacen otras moléculas que son utilizadas en la clínica con efectos protectores en las distintas ECV. Estos resultados sugieren que la utilización de Ang-(1-9) podría ser beneficioso para las enfermedades vasculares, efecto que tiene que ser probado con más estudios *in vivo* y ensayos clínicos.

Además, la inhibición de la proliferación de VSMC es un sello distintivo importante para prevenir la hiperplasia de la íntima [68]. De hecho, los medicamentos que inhiben la proliferación de VSMC, como la rapamicina y el paclitaxel [69] se usan para prevenir la formación de neoíntima [70, 71] o la restenosis vascular posterior a la cirugía, como el cateterismo o la angioplastia [72]. Estos resultados se relacionan con los resultados obtenidos por nuestro

laboratorio en donde se asocia una reducción de la presión arterial dependiente de Ang-(1-9) con la disminución del remodelado vascular. Al mismo tiempo, este remodelado vascular se asocia al aumento en la proliferación de las VSMC, la cual se pierde cuando se administra Ang-(1-9) [73]. Todos estos hallazgos aportan información que ayuda a determinar si los efectos positivos que se observan a nivel vascular, en modelos *in vivo*, con la administración de Ang-(1-9) frente a hipertensión provocada por bomba de infusión de Ang II [43], frente a ratas espontáneamente hipertensas [40] o frente a modelo hipertenso de DOCA-sal [74], se deben o no a la acción directa de este péptido sobre las VSMC. En estos modelos, la infusión de Ang-(1-9), además de producir una disminución en la presión arterial, también disminuye el grosor de la íntima-media aórtica. Sin embargo, no se evalúa si la reducción del remodelado de la aorta se debe al cambio de fenotipo de las VSMC. En base a todos estos antecedentes, en donde se muestra que el tratamiento con Ang-(1-9) disminuye el daño vascular provocado por los modelos de hipertensión, y a nuestros resultados *in vitro* de cambio de fenotipo de las VSMC, se sugiere que Ang-(1-9) protege del remodelado vascular mediante la acción directa sobre las VSMC. Queda pendiente, y es una limitación de nuestro trabajo, la pregunta de si Ang-(1-9) es capaz de prevenir el cambio de fenotipo a nivel *in vitro* frente a otros estímulos distintos a PDGF-BB, como TNF- α , Ang II o LDL oxidado.

VII.3. Ang-(1-9) y AT2R

Es importante mencionar, que los efectos preventivos de Ang-(1-9) sobre la desdiferenciación inducida por PDGF-BB son mediados por AT2R y no por MasR. AT2R fue descrito como el receptor endógeno para Ang-(1-9) [35, 40, 43]. Los efectos antihipertensivos y los de impedir el remodelado vascular en modelos de hipertensión por infusión de Ang II o de DOCA-sal también se inhibieron antagonizando AT2R [43, 74]. Esto sugiere que

Ang-(1-9), y no su conversión a Ang-(1-7) por la ECA [22], es el responsable de la inhibición del cambio de fenotipo de las VSMC. Por otro lado, se ha visto que Ang-(1-7) se puede unir al AT2R [75], y que al utilizar el antagonista PD123319 sus efectos se bloquean [76], sugiriendo que Ang-(1-7) también puede actuar por AT2R. Por lo que faltarían realizar más experimentos para confirmar que todos los efectos vistos sobre las VSMC se deben exclusivamente a la acción de Ang-(1-9).

Un aspecto importante a considerar es que nuestros resultados sugieren que Ang-(1-9) no activa al AT1R a pesar de que se ha descrito que Ang-(1-9) interactúa con el AT1R [35]. Esto porque cuando se bloquea el AT2R con PD123319 y se incubaba al mismo tiempo Ang-(1-9) no se observan efectos tanto a nivel de migración, proliferación o cambios en el contenido de proteínas contráctiles como tampoco de señalización, efectos ampliamente descritos que provoca la activación del AT1R en las VSMC [77].

Por otra parte, se ha visto que la presencia del AT2R es importante para evitar la progresión del remodelado vascular y para la diferenciación de las VSMC. En ratones AT2R KO, la formación de neointima es mayor en comparación a la que se genera en un ratón wild type [78], otorgándole un papel vasoprotector al AT2R. Desde otro punto de vista, cuando se sobreexpresa el AT2R se ha visto que disminuye la cantidad de colágeno en placas de ateroma en modelo de ratones KO para el receptor de LDL [79]. Aunque esto puede considerarse perjudicial debido a que atenta contra la estabilidad de la placa y aumentaría las probabilidades de ruptura y generación de coágulos, en este mismo trabajo y en otros se muestra que la sobreexpresión o la activación de AT2R disminuye la inflamación y, en general, la formación de placas [79, 80]. Estos datos sugieren que la presencia y activación de AT2R disminuye el remodelado vascular. En relación a la diferenciación de las VSMC, ocurre algo parecido con la correlación entre

expresión del AT2R y el efecto protector a nivel *in vitro*. La cantidad de proteínas contráctiles, como calponina o caldesmona, disminuye en un modelo de ratón KO para AT2R [81]. Además, en un modelo *in vitro* en donde se sobreexpresa AT2R se observa una menor proliferación de las VSMC posterior a la estimulación con Ang II [82]. Esto muestra un efecto anti-proliferativo posterior a su activación, del mismo modo que se observó en nuestros resultados. En el mismo sentido, no se observaron efectos de los antagonistas utilizados para bloquear AT2R o MasR con respecto al cambio de fenotipo de las VSMC. Tampoco se observó que estos antagonistas provocaran diferencias en los efectos de PDGF-BB, tanto en la migración como en la disminución de las proteínas contráctiles, comprobando que PDGF-BB no necesita de estos receptores para ejercer sus acciones desdiferenciadoras.

VII.4. Ang-(1-9) y Akt

Uno de los aspectos poco explorados con respecto al péptido Ang-(1-9) es la vía de señalización transduccional posterior a la activación del AT2R. Nuestros resultados, muestran que al estimular las VSMC con Ang-(1-9) se promueve una disminución en la fosforilación de Akt, la cual es dependiente del AT2R. Este efecto puede ser beneficioso en la prevención de la desdiferenciación de las VSMC, ya que se ha visto que otras moléculas que previenen la proliferación inducida por PDGF-BB, como AdipoRon, un agonista del receptor de adiponectina [62], disminuyen también la fosforilación de Akt. Este resultado permite especular que Ang-(1-9) podría prevenir el aumento de la proliferación celular característico de las VSMC cuando se encuentran en un estado desdiferenciado. Estos resultados van de la mano con lo que muestra la literatura, ya que al estimular el AT2R se ha visto que provoca la activación de tirosinas fosfatasa, como SHP-1 [32] y PTP1B [25]. Sin embargo, más relevante aún es que se ha visto que la activación de AT2R promueve la actividad de la serina/treonina fosfatasa PP2A [83], lo que

explicaría la disminución de la fosforilación de Akt en la serina 473, posterior a la estimulación con Ang-(1-9). Se ha descrito que esta fosfatasa tiene la capacidad de interactuar con Akt y promover su desfosforilación [84]. Cabe mencionar que existen dos fosfatasas más importantes en la regulación de Akt. Una es la familia de fosfatasas PHLPP y la otra es PTEN [85]. La familia de fosfatasas PHLPP se une a Akt y promueve su desfosforilación [85, 86]. En cambio, PTEN disminuye la formación de PIP3, el cual es necesario para que Akt se una a la membrana plasmática e inicie su activación gracias a la fosforilación de PDK1 y mTORC2 [86]. Por lo tanto, PHLPP disminuye la activación de Akt de forma directa y PTEN impide su activación [86]. Sin embargo, hasta este momento no hay estudios que demuestren que AT2R interactúa con estas dos fosfatasas. Esto deja abierta la pregunta sobre cómo el AT2R regula la fosforilación de Akt, si es a través de PP2A o a través de las clásicas fosfatasas que regulan Akt.

Por otra parte, hasta ahora en la literatura se muestra que AT2R promovería la fosforilación de Akt. Se ha visto que, tanto en hígado como en VSMC, al estimular la fosforilación de Akt, con insulina o con hormona tiroidea, el bloquear el AT2R promueve un nivel de fosforilación de Akt menor [87, 88]. Sugiriendo que AT2R estaría involucrado en la fosforilación de Akt. Además, recientemente, Mendoza-Torres y cols. demostró que Ang-(1-9) promueve la fosforilación de Akt en cardiomiocitos de rata neonatas [42]. Este resultado diferencial se podría explicar por la capacidad que tiene el AT2R para formar heterodímeros. De hecho, se ha descrito la heterodimerización de AT2R con AT1R [89], MasR [90] y con el receptor de bradiquinina B2 [91]. En el caso de la heterodimerización con AT1R, se ha visto que incluso en distintos tipos celulares tiene funciones distintas, ya que, en células HEK293, AT2R se une al AT1R e impide su internalización a pesar de unir Ang II [92]. En cambio, en células del epitelio renal, su heterodimerización promueve su internalización y con esto se provocan movimientos de calcio intracelular posterior a la unión

de Ang II [89]. Con respecto a la heterodimerización con MasR, se ha descrito que presentan una interdependencia en sus efectos. Cuando se activa el AT2R se pueden inhibir sus efectos bloqueando el MasR y viceversa [93, 94]. Con esto podríamos especular que en nuestro modelo no hay una heterodimerización de este tipo ya que cuando se utilizó el antagonista del MasR se mantuvo el efecto de Ang-(1-9). Por último, la heterodimerización con el receptor de bradiquinina B2 se ha visto que modifica la producción de NO posterior a la activación de AT2R, dependiendo si se utiliza con un antagonista o con un agonista del receptor de bradiquinina B2 [91].

También hay que destacar que el estudio de la señalización río debajo de AT2R ha sido difícil de describir, ya que recientemente se describió la estructura cristalina del AT2R humano. Este estudio sugiere que, a pesar de tener una estructura parecida a los receptores acoplados a proteína G, este receptor está impedido estructuralmente de unir una proteína G, e incluso, tampoco podría unir β -arrestina [95]. Por lo tanto, se requieren más estudios que expliquen la diferencia en la fosforilación de Akt entre los distintos tipos celulares, como VSMC o cardiomiocitos, posterior a la activación de AT2R por parte de Ang-(1-9). Como aproximación, se postula que el AT2R tenga una heterodimerización diferencial en cada tipo celular, que explique la activación o no de fosfatasas.

VII.5. Ang-(1-9) y FoxO1

Nuestros resultados muestran que Ang-(1-9) activa FoxO1 a través de dos mecanismos: una desfosforilación rápida de FoxO1 (30 min) seguida de un aumento en el contenido total de FoxO1 (> 3 h). FoxO1, al ser un blanco río abajo importante en la señalización de Akt, también regula la proliferación, a través de la expresión de inhibidores del ciclo celular [46]. De forma consecuente con lo encontrado en la fosforilación de Akt, se muestra que

FoxO1 a tiempos cortos disminuye su fosforilación. El estado de fosforilación en que se encuentre FoxO1 determina su localización celular [46]. Estímulos que aumentan su fosforilación, como insulina, promueven la traslocación de FoxO1 desde el núcleo hacia el citoplasma [96]. En nuestro estudio, se demuestra que la fosforilación de FoxO1 disminuye, y no solo eso, sino también que FoxO1 modifica su localización, encontrándose en mayor proporción en el núcleo. Si bien nuestros datos no muestran expresamente que la proteína FoxO1 que se encuentra en el núcleo está desfosforilada, se ha visto que el estado desfosforilado es necesario para permitir la traslocación [77]. Esto se debe a que la fosforilación por parte de Akt provoca el bloqueo de la secuencia de localización nuclear presente en FoxO1. Por lo tanto, cuando no se efectúa esta fosforilación ese sitio queda expuesto para su importación al núcleo [97].

En el mismo sentido, más relevante es que también se observó un aumento en la cantidad de proteína FoxO1, pero a las 3 h de incubación con Ang-(1-9). Este efecto no muestra cambios en los niveles de fosforilación de FoxO1, pero de todas formas cambia su localización celular, promoviendo un aumento de la cantidad de proteína que se encuentra a nivel nuclear. Este efecto no es nuevo, pero ha sido poco descrito. Se ha visto el aumento en los niveles de FoxO1 en tiempos cortos de 3 h [98] y en tiempos más largo de 24 h [49, 99]. El cambio en los niveles de una proteína se puede deber a un aumento en la síntesis o a una disminución en la degradación de la proteína. En el caso de FoxO1 se ha visto que su vida media es de 12 h, en un modelo de células de hígado humano [98], por otra parte, se ha descrito que FoxO1 se debe fosforilar, traslocar al citoplasma, y una vez allí, es degradado vía proteosoma [100]. Nuestros resultados no pueden explicar si hay un aumento en la síntesis de la proteína, pero al disminuir la fosforilación de FoxO1 a los 30 min nos permite especular que este se estabiliza en el núcleo y evita su degradación posterior en el citoplasma, provocando un aumento en la cantidad

de FoxO1 total a las 3 h. Vivar y cols. describieron un comportamiento similar, en donde había una desfosforilación de FoxO1 previa al aumento en sus niveles totales [49]. Cabe destacar que hasta ahora no hay estudios que muestren alguna relación entre Ang-(1-9) o del AT2R con el proteosoma, lo que contribuiría al entendimiento del aumento en los niveles de FoxO1 posterior a la incubación con Ang-(1-9).

La importancia de esta observación es que, se ha visto que la cantidad de proteína es trascendental en el destino celular, ya que el aumento de los niveles de proteína FoxO1 se asocia con la inhibición de la proliferación celular, mientras que la disminución de los niveles de FoxO1 promueve la proliferación [101]. Savai y cols, mostraron que la disminución de FoxO1 en células pulmonares humanas SMC promueve su proliferación [53]. Por otra parte, FoxO1 no solo está ligado a la proliferación celular, sino también se ha visto vinculado al proceso de diferenciación de distintos tipos celulares, tales como células madre [102], fibroblastos [49], en el desarrollo del hígado [47] y es importante en el desarrollo vascular embrionario [45]. Con respecto a la regulación de la diferenciación de las VSMC por parte de FoxO1, lo que se ha descrito es que la activación de FoxO1 promueve la expresión de myocardin [50]. Como se mencionó anteriormente, myocardin es importante para interactuar con el SRF y mantener el fenotipo diferenciado de las VSMC [20]. Pero hasta ahora, este es el primer trabajo que relaciona a FoxO1 con el estado de diferenciación de las VSMC, más allá de la regulación de la proliferación.

Nuestros resultados muestran que la presencia y la actividad de FoxO1 son necesarias para la acción de Ang-(1-9) en la prevención de la dediferenciación inducida por PDGF-BB. Esto porque al utilizar AS1842856, inhibidor de FoxO1, que se une a su forma activa impidiendo su interacción con el ADN [103], así como también al disminuir sus niveles con un siRNA, se

observó que Ang-(1-9) pierde sus efectos protectores sobre las VSMC. Para completar estos hallazgos, utilizamos la sobreexpresión de FoxO1 para imitar los efectos de Ang-(1-9) en los parámetros de migración y proteínas contráctiles, debido a que la regulación de la proliferación ya estaba descrita [101]. Nuestros resultados muestran que los niveles elevados de FoxO1 también bloquean la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB. Un aspecto importante a considerar es que la sobreexpresión de FoxO1 no produce un aumento en las proteínas contráctiles o una disminución en la migración, al igual que otros han visto que no disminuye la proliferación basal [53], esto sugiere que el modelo utilizado se encuentra en fenotipo diferenciado y que la acción de FoxO1 sea efectiva solo frente a un estímulo patológico o desdiferenciador.

Finalmente, con respecto a los efectos de Ang-(1-9), se ha demostrado que disminuye el grosor de la capa media de la aorta, que reduce la inflamación vascular y la fibrosis [40, 43, 74]. Además, se ha visto que tiene efectos cardioprotectores al reducir la muerte por cardiomiocitos después del infarto de miocardio [42] y al reducir la hipertrofia de cardiomiocitos [35]. Nosotros, en este trabajo, demostramos que Ang-(1-9) previene la desdiferenciación de las VSMC. En conjunto, todos estos efectos sugieren que Ang-(1-9) podría ser un buen candidato para ser explotado como un agente de protección cardiovascular general.

Nuestro estudio de los efectos de Ang-(1-9) sobre la desdiferenciación de las VSMC deja algunas preguntas abiertas que podrían ser abordadas en futuras investigaciones. A nivel de señalización, queda abierta la interrogante sobre la forma en que AT2R interactúa con Akt y de cómo regula los niveles de su fosforilación una vez que es activado. Se mencionó la posibilidad de que AT2R estuviera activando alguna fosfatasa que provoque la desfosforilación de Akt. Por otra parte, falta dilucidar la regulación que ocurre entre el AT2R y

los niveles proteicos de FoxO1, si este aumento en la cantidad de FoxO1 se debe solo a su localización nuclear y a una disminución en la degradación por vía proteosomal o a un aumento de su síntesis. Nuestros resultados aportan a esta discusión ya que muestran que la disminución en la fosforilación de Akt es necesaria para que aumenten los niveles de FoxO1. A nivel de respuesta celular, queda pendiente demostrar los efectos posteriores a la activación de FoxO1 para regular el fenotipo de las VSMC, qué genes específicos estarían actuando para promover el fenotipo diferenciado de las células. Y por último, nuestros resultados permiten sustentar un próximo estudio a nivel in vivo sobre los efectos de Ang-(1-9) frente a enfermedades vasculares distintas a hipertensión, tales como aterosclerosis o restenosis.

VIII. Conclusiones

1. Ang-(1-9) previene la disminución de las proteínas contráctiles y el aumento de la migración y proliferación inducido por PDGF-BB en las VSMCs.
2. Ang-(1-9) induce un aumento en los niveles de FoxO1 y una disminución en la fosforilación de FoxO1, provocando su traslocación al núcleo.
3. La actividad y la presencia de FoxO1 son necesarios para los efectos de Ang-(1-9) sobre la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB.
4. Los efectos de Ang-(1-9) sobre FoxO1 son mediados por la vía transduccional AT2R/Akt.
5. La sobreexpresión de FoxO1 previene la desdiferenciación de las VSMC inducida por PDGF-BB.

IX. Bibliografía

[1] Chaudhry R, Miao JH, Rehman A. Physiology, Cardiovascular. StatPearls. Treasure Island (FL)2020.

[2] Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70:1-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>.

[3] Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5:56. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>.

[4] Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2018;114:529-39. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvy023>.

[5] Benvenuto LJ, Krakoff LR. Morbidity and mortality of orthostatic hypotension: implications for management of cardiovascular disease. *Am J Hypertens.* 2011;24:135-44. <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2010.146>.

[6] Recarti C, Unger T. Prevention of coronary artery disease: recent advances in the management of hypertension. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15:311. <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-013-0311-2>.

[7] Chiong M, Morales P, Torres G, Gutierrez T, Garcia L, Ibacache M, et al. Influence of glucose metabolism on vascular smooth muscle cell proliferation. *Vasa.* 2013;42:8-16. <http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000243>.

[8] Milewicz DM, Kwartler CS, Papke CL, Regalado ES, Cao J, Reid AJ. Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: evidence for a hyperplastic vasculomyopathy. *Genet Med.* 2010;12:196-203. <http://dx.doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cdd687>.

[9] Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* 1985;42:139-62. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800\(85\)90023-1](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800(85)90023-1).

[10] Cecchetti A, Rocchiccioli S, Boccardi C, Citti L. Vascular smooth-muscle-cell activation: proteomics point of view. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;288:43-99. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386041-5.00002-9>.

[11] Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl A:A25-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2007.03.001>.

[12] Jackson CL, Raines EW, Ross R, Reidy MA. Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1218-26.

[13] Myllarniemi M, Calderon L, Lemstrom K, Buchdunger E, Hayry P. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibits vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *FASEB J.* 1997;11:1119-26.

[14] Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71:1207-10. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.71.4.1207>.

[15] Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 1991;253:1129-32.

[16] Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:692-702. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306361>.

[17] Garcia-Miguel M, Riquelme JA, Norambuena-Soto I, Morales PE, Sanhueza-Olivares F, Nunez-Soto C, et al. Autophagy mediates tumor necrosis factor-alpha-induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. *PLoS One*. 2018;13:e0197210. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0197210>.

[18] Torres G, Morales PE, Garcia-Miguel M, Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, Vidal-Pena G, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through mitochondrial dynamics regulation. *Biochem Pharmacol*. 2016;104:52-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.01.013>.

[19] Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7129-34. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1232341100>.

[20] Wang Z, Wang DZ, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A, Olson EN. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature*. 2004;428:185-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02382>.

[21] Yoshida T, Gan Q, Shang Y, Owens GK. Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL

factors and histone deacetylases to their promoters. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C886-95. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00449.2006>.

[22] Paz Ocaranza M, Riquelme JA, Garcia L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, et al. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:116-29. <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8>.

[23] Fountain JH, Lappin SL. *Physiology, Renin Angiotensin System.* StatPearls. Treasure Island (FL)2020.

[24] Eguchi S, Kawai T, Scalia R, Rizzo V. Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. *Hypertension.* 2018;71:804-10. <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10266>.

[25] Martinez-Meza S, Diaz J, Sandoval-Borquez A, Valenzuela-Valderrama M, Diaz-Valdivia N, Rojas-Celis V, et al. AT2 Receptor Mediated Activation of the Tyrosine Phosphatase PTP1B Blocks Caveolin-1 Enhanced Migration, Invasion and Metastasis of Cancer Cells. *Cancers (Basel).* 2019;11. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11091299>.

[26] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87:E1-9. <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>.

[27] Mendoza-Torres E, Oyarzun A, Mondaca-Ruff D, Azocar A, Castro PF, Jalil JE, et al. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2015;9:217-37. <http://dx.doi.org/10.1177/1753944715597623>.

[28] Li Y, Li XH, Yuan H. Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2012;2:56-62. <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2223-3652.2012.02.02>.

[29] Faria-Costa G, Leite-Moreira A, Henriques-Coelho T. Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor. *Rev Port Cardiol.* 2014;33:439-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.repc.2014.02.011>.

[30] Abadir PM, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice. *Hypertension.* 2003;42:600-4. <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.0000090323.58122.5C>.

[31] Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, Aziz H, Schoenhoff F, Bedja D, et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science.* 2011;332:361-5. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1192152>.

[32] Matsubara H, Shibasaki Y, Okigaki M, Mori Y, Masaki H, Kosaki A, et al. Effect of angiotensin II type 2 receptor on tyrosine kinase Pyk2 and c-Jun NH2-terminal kinase via SHP-1 tyrosine phosphatase activity: evidence from vascular-targeted transgenic mice of AT2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282:1085-91. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4695>.

[33] Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JY, et al. Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res.* 1999;84:876-82. <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.84.8.876>.

[34] Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously

hypertensive rats. J Hypertens. 2005;23:1037-45.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.hjh.0000166845.49850.39>.

[35] Flores-Munoz M, Smith NJ, Haggerty C, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. J Physiol. 2011;589:939-51.
<http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203075>.

[36] Drummer OH, Kourtis S, Johnson H. Effect of chronic enalapril treatment on enzymes responsible for the catabolism of angiotensin I and formation of angiotensin II. Biochem Pharmacol. 1990;39:513-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90058-s](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(90)90058-s).

[37] Ocaranza MP, Jalil JE. Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. Int J Hypertens. 2012;2012:594361.
<http://dx.doi.org/10.1155/2012/594361>.

[38] Ocaranza MP, Lavandero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, et al. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. J Hypertens. 2010;28:1054-64.

[39] Sotomayor-Flores C, Rivera-Mejias P, Vasquez-Trincado C, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, et al. Angiotensin-(1-9) prevents cardiomyocyte hypertrophy by controlling mitochondrial dynamics via miR-129-3p/PKIA pathway. Cell Death Differ. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-020-0522-3>.

[40] Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, et al. Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor.

Hypertension. 2012;59:300-7.
<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.177485>.

[41] Fattah C, Nather K, McCarroll CS, Hortigon-Vinagre MP, Zamora V, Flores-Munoz M, et al. Gene Therapy With Angiotensin-(1-9) Preserves Left Ventricular Systolic Function After Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2652-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2016.09.946>.

[42] Mendoza-Torres E, Riquelme JA, Vielma A, Sagredo AR, Gabrielli L, Bravo-Sagua R, et al. Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1-9) through an AT2R and Akt-dependent mechanism. *Pharmacol Res*. 2018;135:112-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.022>.

[43] Ocaranza MP, Moya J, Barrientos V, Alzamora R, Hevia D, Morales C, et al. Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J Hypertens*. 2014;32:771-83. <http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0000000000000094>.

[44] Coomans de Brachene A, Demoulin JB. FOXO transcription factors in cancer development and therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73:1159-72. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-2112-y>.

[45] Hosaka T, Biggs WH, 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, et al. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2975-80. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400093101>.

[46] Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:83-97. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3507>.

[47] Sekine K, Chen YR, Kojima N, Ogata K, Fukamizu A, Miyajima A. Foxo1 links insulin signaling to C/EBPalpha and regulates gluconeogenesis during liver development. *EMBO J.* 2007;26:3607-15. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601784>.

[48] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 2003;4:119-29. [http://dx.doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00401-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00401-x).

[49] Vivar R, Humeres C, Munoz C, Boza P, Bolivar S, Tapia F, et al. FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863:128-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.019>.

[50] Creemers EE, Sutherland LB, McAnally J, Richardson JA, Olson EN. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development. *Development.* 2006;133:4245-56. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02610>.

[51] Shin HS, Lee HJ, Nishida M, Lee MS, Tamura R, Yamashita S, et al. Betacellulin and amphiregulin induce upregulation of cyclin D1 and DNA synthesis activity through differential signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2003;93:302-10. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000086803.64109.9E>.

[52] Abid MR, Yano K, Guo S, Patel VI, Shrikhande G, Spokes KC, et al. Forkhead transcription factors inhibit vascular smooth muscle cell proliferation

and neointimal hyperplasia. *J Biol Chem.* 2005;280:29864-73. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M502149200>.

[53] Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, et al. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med.* 2014;20:1289-300. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3695>.

[54] Mahajan SG, Fender AC, Meyer-Kirchrath J, Kurt M, Barth M, Sagban TA, et al. A novel function of FoxO transcription factors in thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Thromb Haemost.* 2012;108:148-58. <http://dx.doi.org/10.1160/TH11-11-0756>.

[55] Norambuena-Soto I, Nunez-Soto C, Sanhueza-Olivares F, Cancino-Arenas N, Mondaca-Ruff D, Vivar R, et al. Transforming growth factor-beta and Forkhead box O transcription factors as cardiac fibroblast regulators. *Biosci Trends.* 2017;11:154-62. <http://dx.doi.org/10.5582/bst.2017.01017>.

[56] Mondaca-Ruff D, Riquelme JA, Quiroga C, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, Villar-Fincheira P, et al. Angiotensin II-Regulated Autophagy Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Front Pharmacol.* 2018;9:1553. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2018.01553>.

[57] Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes.* 2010;3:294. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-3-294>.

[58] Cha SA, Park BM, Gao S, Kim SH. Stimulation of ANP by angiotensin-(1-9) via the angiotensin type 2 receptor. *Life Sci.* 2013;93:934-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.020>.

[59] Campbell DJ, Zeitz CJ, Esler MD, Horowitz JD. Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. *J Hypertens*. 2004;22:1971-6. <http://dx.doi.org/10.1097/00004872-200410000-00020>.

[60] Zhou DM, Ran F, Ni HZ, Sun LL, Xiao L, Li XQ, et al. Metformin inhibits high glucose-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *Aging (Albany NY)*. 2020;12:5352-61. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.102955>.

[61] Ye D, Lou GH, Li AC, Dong FQ, Chen GP, Xu WW, et al. MicroRNA125amediated regulation of the mevalonate signaling pathway contributes to high glucoseinduced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep*. 2020;22:165-74. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2020.11077>.

[62] Fairaq A, Shawky NM, Osman I, Pichavaram P, Segar L. AdipoRon, an adiponectin receptor agonist, attenuates PDGF-induced VSMC proliferation through inhibition of mTOR signaling independent of AMPK: Implications toward suppression of neointimal hyperplasia. *Pharmacol Res*. 2017;119:289-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.016>.

[63] Ha JM, Yun SJ, Kim YW, Jin SY, Lee HS, Song SH, et al. Platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle phenotype via mammalian target of rapamycin complex 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464:57-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.097>.

[64] Nagayama K, Kyotani Y, Zhao J, Ito S, Ozawa K, Bolstad FA, et al. Exendin-4 Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Angiotensin II via the Inhibition of ERK1/2 and JNK Signaling Pathways.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137960>.

[65] Bethel MA, Patel RA, Merrill P, Lokhnygina Y, Buse JB, Mentz RJ, et al. Cardiovascular outcomes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:105-13. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30412-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30412-6).

[66] Wagner RJ, Martin KA, Powell RJ, Rzucidlo EM. Lovastatin induces VSMC differentiation through inhibition of Rheb and mTOR. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299:C119-27. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00429.2009>.

[67] Zhou F, Rao F, Deng YQ, Yang H, Kuang SJ, Wu FL, et al. Atorvastatin ameliorates the contractile dysfunction of the aorta induced by organ culture. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2019;392:19-28. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-018-1559-4>.

[68] Eriksson L, Saxelin R, Rohl S, Roy J, Caidahl K, Nystrom T, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Activation Does not Affect Re-Endothelialization but Reduces Intimal Hyperplasia via Direct Effects on Smooth Muscle Cells in a Nondiabetic Model of Arterial Injury. *J Vasc Res.* 2015;52:41-52. <http://dx.doi.org/10.1159/000381097>.

[69] Nguyen KT, Shaikh N, Wawro D, Zhang S, Schwade ND, Eberhart RC, et al. Molecular responses of vascular smooth muscle cells to paclitaxel-eluting bioresorbable stent materials. *J Biomed Mater Res A.* 2004;69:513-24. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30020>.

[70] Yang W, Ge J, Liu H, Zhao K, Liu X, Qu X, et al. Arsenic trioxide eluting stent reduces neointima formation in a rabbit iliac artery injury model.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.08.010>.

[71] Takahashi H, Nomiyama T, Terawaki Y, Kawanami T, Hamaguchi Y, Tanaka T, et al. GLP-1 Receptor Agonist Exendin-4 Attenuates NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Atheroscler Thromb*. 2019;26:183-97. <http://dx.doi.org/10.5551/jat.43414>.

[72] Daniel JM, Dutzmann J, Brunsch H, Bauersachs J, Braun-Dullaeus R, Sedding DG. Systemic application of sirolimus prevents neointima formation not via a direct anti-proliferative effect but via its anti-inflammatory properties. *Int J Cardiol*. 2017;238:79-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.03.052>.

[73] Norambuena-Soto I, Ocaranza MP, Cancino-Arenas N, Sanhueza-Olivares F, Villar-Fincheira P, Leiva-Navarrete S, et al. Angiotensin-(1-9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol*. 2020;180:114190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114190>.

[74] Gonzalez L, Novoa U, Moya J, Gabrielli L, Jalil JE, Garcia L, et al. Angiotensin-(1-9) reduces cardiovascular and renal inflammation in experimental renin-independent hypertension. *Biochem Pharmacol*. 2018;156:357-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.045>.

[75] Bosnyak S, Jones ES, Christopoulos A, Aguilar MI, Thomas WG, Widdop RE. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121:297-303. <http://dx.doi.org/10.1042/CS20110036>.

[76] Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats.

Hypertension. 2005;45:960-6.
<http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.0000160325.59323.b8>.

[77] Wang Y, Zhang X, Chen W, Gao L, Li J, Song T, et al. Cortistatin ameliorates Ang II-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting autophagy through SSTR3 and SSTR5. *Life Sci.* 2020;253:117726.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117726>.

[78] Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, et al. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation.* 2002;106:847-53.
<http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000024103.04821.86>.

[79] Dandapat A, Hu CP, Chen J, Liu Y, Khan JA, Remeo F, et al. Over-expression of angiotensin II type 2 receptor (agtr2) decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366:871-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.061>.

[80] Bai HY, Mogi M, Nakaoka H, Kan-No H, Tsukuda K, Wang XL, et al. Synergistic Inhibitory Effect of Rosuvastatin and Angiotensin II Type 2 Receptor Agonist on Vascular Remodeling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;358:352-8. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.116.233148>.

[81] Yamada H, Akishita M, Ito M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JY, et al. AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension.* 1999;33:1414-9.
<http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.33.6.1414>.

[82] Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer

study. *Life Sci.* 1998;63:PL289-95. [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00448-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00448-2).

[83] Bhat SA, Sood A, Shukla R, Hanif K. AT2R Activation Prevents Microglia Pro-inflammatory Activation in a NOX-Dependent Manner: Inhibition of PKC Activation and p47(phox) Phosphorylation by PP2A. *Mol Neurobiol.* 2019;56:3005-23. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-1272-9>.

[84] Rodgers JT, Vogel RO, Puigserver P. Clk2 and B56beta mediate insulin-regulated assembly of the PP2A phosphatase holoenzyme complex on Akt. *Mol Cell.* 2011;41:471-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.007>.

[85] Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* 2005;18:13-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.008>.

[86] Brognard J, Sierceki E, Gao T, Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell.* 2007;25:917-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.017>.

[87] Carrillo-Sepulveda MA, Ceravolo GS, Furstenau CR, Monteiro Pde S, Bruno-Fortes Z, Carvalho MH, et al. Emerging role of angiotensin type 2 receptor (AT2R)/Akt/NO pathway in vascular smooth muscle cell in the hyperthyroidism. *PLoS One.* 2013;8:e61982. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061982>.

[88] Munoz MC, Burghi V, Miquet JG, Cervino IA, Quiroga DT, Mazziotta L, et al. Chronic blockade of the AT2 receptor with PD123319 impairs insulin signaling in C57BL/6 mice. *Peptides.* 2017;88:37-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2016.12.003>.

[89] Ferrao FM, Cardoso LHD, Drummond HA, Li XC, Zhuo JL, Gomes DS, et al. Luminal ANG II is internalized as a complex with AT1R/AT2R heterodimers to target endoplasmic reticulum in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;313:F440-F9. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00261.2016>.

[90] Patel S, Hussain T. Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20:41. <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-018-0845-3>.

[91] Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension*. 2006;48:316-22. <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.0000228997.88162.a8>.

[92] Porrello ER, Pflieger KD, Seeber RM, Qian H, Oro C, Abogadie F, et al. Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles. *Cell Signal*. 2011;23:1767-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.06.011>.

[93] Leonhardt J, Villela DC, Teichmann A, Munter LM, Mayer MC, Mardahl M, et al. Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension*. 2017;69:1128-35. <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08814>.

[94] Patel SN, Ali Q, Samuel P, Steckelings UM, Hussain T. Angiotensin II Type 2 Receptor and Receptor Mas Are Colocalized and Functionally Interdependent in Obese Zucker Rat Kidney. *Hypertension*. 2017;70:831-8. <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09679>.

[95] Zhang H, Han GW, Batyuk A, Ishchenko A, White KL, Patel N, et al. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature*. 2017;544:327-32. <http://dx.doi.org/10.1038/nature22035>.

- [96] Gille A, Turkistani A, Tsitsipatis D, Hou X, Tauber S, Hamann I, et al. Nuclear trapping of inactive FOXO1 by the Nrf2 activator diethyl maleate. *Redox Biol.* 2019;20:19-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.010>.
- [97] Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* 2004;380:297-309. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040167>.
- [98] Yun H, Park S, Kim MJ, Yang WK, Im DU, Yang KR, et al. AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. *FEBS J.* 2014;281:4421-38. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12949>.
- [99] Zhao Y, Tran M, Wang L, Shin DJ, Wu J. PDK4-Deficiency Reprograms Intrahepatic Glucose and Lipid Metabolism to Facilitate Liver Regeneration in Mice. *Hepatology Commun.* 2020;4:504-17. <http://dx.doi.org/10.1002/hep4.1484>.
- [100] Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:11285-90. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1934283100>.
- [101] Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Schoors S, Oellerich MF, Lim R, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature.* 2016;529:216-20. <http://dx.doi.org/10.1038/nature16498>.
- [102] Yu F, Wei R, Yang J, Liu J, Yang K, Wang H, et al. FoxO1 inhibition promotes differentiation of human embryonic stem cells into insulin producing cells. *Exp Cell Res.* 2018;362:227-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.022>.

[103] Nagashima T, Shigematsu N, Maruki R, Urano Y, Tanaka H, Shimaya A, et al. Discovery of novel forkhead box O1 inhibitors for treating type 2 diabetes: improvement of fasting glycemia in diabetic db/db mice. *Mol Pharmacol.* 2010;78:961-70. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.110.065714>.