

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



**“ PAPEL DE LA PROTEINA 1 DE ADHESION DE LA CELULA
VASCULAR (VCAM-1) EN LA CARDIOMIOPATÍA INDUCIDA POR
OBESIDAD”**

MAYARLING FRANCISCA TRONCOSO MAGÑIN

TESIS

PROGRAMA DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Director de Tesis

Prof. Dr. SERGIO LAVANDERO

Marzo, 2023

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

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

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

NOMBRE CANDIDATA: **Mayarling Francisca Troncoso Magñin**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de marzo de 2023.

Prof. Dr. Sergio Lavandero
Director de Tesis

Programa Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Paulina Donoso

Facultad Medicina,
Universidad de Chile

Prof. Dra. Paola Llanos

Facultad Odontología,
Universidad de Chile

Prof. Dr. Luis Sobrevia

Facultad Medicina
P Universidad Católica de Chile

Prof. Dra. Marcela Hermoso

Facultad Medicina
Universidad de **Chile**
Presidenta Comisión Informante

*“Shine, dream, smile
Oh, let us light up the night.
We shine in our own ways.”
Mikrokosmos-BTS*

Agradecimientos

Para comenzar quiero agradecer al Dr. Sergio Lavandero, por abrirme las puertas de su Laboratorio y permitirme realizar la tesis de doctorado bajo su tutoría, con una absoluta y acogedora bienvenida a su equipo de trabajo y con un apoyo incondicional durante estos años de trabajo. Espero que sigamos manteniendo esta buena relación y que el futuro nos depare muchas más ideas, proyectos y conversaciones. También agradezco al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por aceptarme como su estudiante, permitir avanzar en mi formación y otorgarme una comisión de tesis conformada por las doctoras Paulina Donoso, Marcela Hermoso y Paola Llanos, como también el doctor Luis Sobrevía, ya que fueron un aporte significativo en la discusión, evaluación y sustento de este trabajo de tesis. Además, agradezco a Cecilia Carter, por el apoyo brindado en cada momento del doctorado, tanto en sus funciones como en conversaciones, siempre con un cariñoso consejo y honesta ayuda.

Adicionalmente, quiero agradecer al equipo humano del Laboratorio de Transducción de Señales y sus investigadora/es asociada/os, ya que sin todos ustedes nada de esto sería posible. Hago una mención a la/os profesora/es Mario Chiong, Jaime Riquelme y Valentina Parra, por liderar junto al profesor Sergio a este equipo maravilloso de personas, por la calidad y constructivas conversaciones con respecto al trabajo y también a la vida. Otro pilar fundamental del laboratorio son los funcionarios, donde Don Fidel, Señora Gindra y Sebastián Leiva, los cuales hicieron que estos años de trabajo se sintieran como ser parte de una gran familia con ustedes como pilares de la casa, organizando y cuidando a cada uno de nosotras/os. No puedo dejar de lado a mis compañeros de Laboratorio, donde fundamentalmente me tocó trabajar, codo a codo, con Jafet Ortiz, Felipe Muñoz, Fernanda Sanhueza, Carolina Hernández, Danica Jiménez y Ximena Calle, David Silva organizando y montando los experimentos, como también viviendo esta etapa en los mismos años. También agradezco muchísimo a Alejandra Guerrero y Eliana Pino, por su inmenso trabajo con los animales y el apoyo incondicional en todos los desafíos que tuvimos que desarrollar, entregándome siempre todo su cariño. Les agradezco por toda la paciencia, comprensión y contención durante las jornadas de trabajo. También quiero agradecer a los miembros del Laboratorio que me recibieron, que si bien no trabajamos mucho juntos, contribuyeron gratamente en mi formación, como Valeria Garrido, Mónica Villa, Ignacio

Norambuena, Andrea Ramírez, Pablo Morales y Matías Monsalves. No me olvido tampoco de los que llegaron luego de mi entrada a este grupo humano y que me aportaron mucha energía renovada e ideas nuevas para continuar, como lo son Claudia Muñoz y Javiera Martínez. Los quiero mucho y muchas gracias por su amistad.

Agradezco también a mis amigos, partiendo con Marioly Müller, Marisel González, Paola Faundez que han sido las que más han acompañado y aguantado este último proceso incondicionalmente; a Carolina Diaz con Jaimito y Catalina Kretchmar, sin su apoyo todo el doctorado habría sido más difícil; mi Javi Castillo y Gabriel Marín, que, a pesar de no vernos mucho, sé que están siempre conmigo. Muchas gracias por toda la paciencia, apoyo, risas, salidas, conversaciones y discusiones durante todo este proceso. Las/los quiero mucho!

Quiero agradecer a mi familia, por estar siempre apoyándome en mis decisiones y en los procesos que me tocan vivir para cumplir mis metas. Papá, Mamá, Mimi, Gaby, Maite, Mami Choly, Mami Marta, Andrea y Benja gracias estar siempre conmigo, por sus locuras de todas las semanas y siempre sacarme una sonrisa, los amo. También quiero agradecer a Pablo, por la compañía incondicional en estos años, por escucharme, entenderme y el amor que me has entregado.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Transducción de Señales a cargo del Dr. Sergio Lavandero perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y al Centro de Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

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

- Beca ANID para estudios de Doctorado en Chile 21180537
- Proyecto FONDAP 15130011 (SL)
- Proyecto FONDECYT 1200490 (SL)

DIFUSIÓN RESULTADOS TESIS

RECONOCIMIENTOS:

- Beca ANID para estudios de Doctorado en Chile, 21180537 (2018-2022).

PUBLICACIONES

1. **Troncoso MF**, Díaz-Vesga MC, Sanhueza-Olivares F, Riquelme JA, Müller M, Garrido L, Gabrielli L, Chiong M, Corbalan R, Castro PF, Lavandero S. “Targeting VCAM-1: a therapeutic opportunity for vascular damage”. *Expert Opin Ther Targets*. 2023 Mar 15:1-17. doi: 10.1080/14728222.2023.2187778.
2. **Troncoso MF**, Ortiz-Quintero J, Garrido-Moreno V, Sanhueza-Olivares F, Guerrero-Moncayo A, Chiong M, Castro PF, García L, Gabrielli L, Corbalán R, Garrido-Olivares L, Lavandero S. “VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease”. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1867(9):166170. Published 2021 Sep 1; doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166170.
3. **Troncoso MF**, Pavez M, Wilson C, et al. “Testosterone activates glucose metabolism through AMPK and androgen signaling in cardiomyocyte hypertrophy”. *Biol Res*, 54(1):3. Published 2021 Feb 5. doi:10.1186/s40659-021-00328-4
4. Sanhueza-Olivares F, **Troncoso MF**, Pino-de la Fuente F, Martínez-Bilbao J, Riquelme JA, Norambuena-Soto I, Villa M, Lavandero S, Castro PF, Chiong M. “A potential role of autophagy-mediated vascular senescence in the pathophysiology of HFpEF”. *Front Endocrinology (Lausanne)*, 13:1057349. Published 2022 Nov 17. doi:10.3389/fendo.2022.1057349.
5. Muñoz-Córdova F, Hernández-Fuentes C, Lopez-Crisosto C, **Troncoso MF**, Calle X, Guerrero-Moncayo A, Gabrielli L, Chiong M, Castro PF, Lavandero S. “Novel insights into the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and pharmacological strategies”. *Front Cardiovasc Med*, 2021; 8: 707336. Published 2021 Dec 23. doi: 10.3389/fcvm.2021.707336.
6. Morales PE, Monsalves-Álvarez M, Tadinada SM, Harris MP, Ramírez-Sagredo A, Ortiz-Quintero J, **Troncoso MF**, De Gregorio N, Calle X, Pereira RO, Lira VA, Espinosa A, Abel ED, Lavandero S. “Skeletal muscle type-specific mitochondrial adaptation to high-fat diet relies on differential autophagy modulation”. *FASEB J*, 35(10):e21933. Published 2021 Oct. doi: 10.1096/fj.202001593RR.
7. Basualto-Alarcón C, Llanos P, García-Rivas G, **Troncoso MF**, Lagos D, Barrientos G, Estrada M. “Classic and Novel Sex Hormone Binding Globulin Effects on the Cardiovascular System in Men”. *Int J Endocrinol*, 2021:5527973. Published 2021 Jul 21. doi:10.1155/2021/5527973

8. Castro-Sepulveda M, Fernández-Verdejo R, Tuñón-Suárez M, Morales-Zúñiga J, **Troncoso M**, Jannas-Vela S, Zbinden-Foncea H. “Low abundance of Mfn2 protein correlates with reduced mitochondria-SR juxtaposition and mitochondrial cristae density in human men skeletal muscle: Examining organelle measurements from TEM images”. *FASEB J*, 35(4):e21553. Published 2021 Apr. doi: 10.1096/fj.202002615RR.

PRESENTACIÓN A CONGRESOS

1. **Mayarling Francisca Troncoso**. Organización y coordinación de Simposio “Enfermedades cardiovasculares y modelos experimentales aplicados a la investigación.” en la XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. 22 al 25 de Noviembre, 2022, Chile.
2. **Mayarling Francisca Troncoso**. Presentación oral en Simposio “Desde los modelos animales hasta las entidades moleculares” el trabajo “Cardiac myocyte VCAM-1 prevents cardiac dysfunction induced by high-fat diet” en la XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. 22 al 25 de Noviembre, 2022, Chile.
3. **Mayarling Francisca Troncoso**. Organización y coordinación de Simposio “Advances in cardiac pathophysiology” en la XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. 29 de Noviembre al 3 de Diciembre, 2021, Chile.
4. **Mayarling Francisca Troncoso**. Presentación oral en Simposio “Advances in cardiac pathophysiology” el trabajo “Role of VCAM-1 in obesity-induced diabetic cardiomyopathy” en la XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. 29 de Noviembre al 3 de Diciembre, 2021, Chile.
5. Jafet Ortiz-Quintero, **Mayarling Francisca Troncoso**, Ramón Corbalán, Lorena García, Sergio Lavandero. . “VCAM-1 mediates the protective effect of TNF- a preconditioning against ischemia/reperfusion injury in cultures cardiomyocytes”. Comunicación Libre Poster durante la XLIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular 26-28 de Octubre, Chile.
6. Jafet Ortiz-Quintero, **Mayarling Francisca Troncoso**, Ramón Corbalán, Lorena García, Sergio Lavandero. “VCAM-1 mediates the protective effect of TNF- a preconditioning against ischemia/reperfusion injury in cultures cardiomyocytes”. Comunicación Libre Poster durante la XLIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular 26-28 de Octubre, Chile.

7. **Mayarling Francisca Troncoso**, Jafet Ortiz-Quintero, Felipe Muñoz-Córdova, Alejandra Guerrero-Moncayo, Ximena Calle-Chalco, Valeria Garrido-Moreno, Fernanda Sanhueza-Olivares, Lorena García, Ramón Corbalán, Sergio Lavandero. “**Cardiomyocyte specific VCAM-1 knock out exacerbates the cardiac hypertrophy in mouse model of diabetic cardiomyopathy**”. Comunicación Oral durante XXIX Congreso sudamericano de cardiología y el LVIIº congreso chileno de cardiología y cirugía cardiovascular. 27-30 de Noviembre 2021, Chile.

8. **Troncoso MF**, Ortiz-Quintero J, Garrido-Moreno V, Muñoz-Córdova F, Calle-Chalco X, Sanhueza-Olivares F, de Gregorio N, Silva D, Garcia L, Corbalán R, Lavandero S. “**Role of cardiac VCAM-1 in experimental diabetic cardiomyopathy**”. Comunicación Libre Poster durante la XXXV Reunión Anual Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas 2020. 16 – 20 de Noviembre, Chile

9. **Troncoso MF**, Ortiz-Quintero J, Morales PE, Corbalán R, Lavandero S. “**Cardiac VCAM1 expression is increased both in in vitro and in vivo inflammation models**”. Comunicación Libre Poster durante la XLII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular en conjunto con la XIV Reunión Anual de la Asociación Chilena de Biología. 8 al 11 de octubre del 2019, Chile.

10. Jafet Ortiz-Quintero, **Mayarling Francisca Troncoso**, Ramón Corbalán, Lorena García, Sergio Lavandero. “VCAM-1 mediates the protective effect of TNF- α preconditioning against ischemia/reperfusion injury in cultures cardiomyocytes”. Comunicación Libre Poster durante la XLIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular 26-28 de Octubre 2021, Chile.

11. Ortiz-Quintero J, Troncoso MF, Corbalán R, García L, Lavandero S. “VCAM-1 expression mediates the protective effect of TNF- α preconditioning against ischemia/reperfusion injury in cultured cardiomyocytes”. Comunicación Libre Poster durante la XXXV Reunión Anual Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. 16 – 20 de Noviembre 2020, Chile.

12. Ortiz-Quintero Jafet ,**Troncoso MF**, Garrido-Moreno V, López-Crisosto C, Corbalán R, Lavandero S, García L. “TNF- α preconditioning induces cardiomyocyte VCAM-1 expression and protection against ischemia/reperfusion injury”. Comunicación Libre Poster durante la XLII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular en conjunto con la XIV Reunión Anual de la Asociación Chilena de Biología. 8 al 11 de octubre del 2019, Chile.

ÍNDICE.

1. RESUMEN	11
2. ABSTRACT	14
3. INTRODUCCIÓN	16
4. DESARROLLO	17
4.1 MARCO TEÓRICO	17
4.1.1 <i>Cardiomiopatía diabética y cardiomiopatía inducida por obesidad.</i>	17
4.1.2 <i>VCAM-1 y sus efectos en el cardiomiocito.</i>	18
4.2. HIPÓTESIS	23
4.3. OBJETIVO GENERAL	23
4.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4.4.1. <i>Evaluar si los niveles de expresión de VCAM-1 aumentan en el corazón de ratones con cardiomiopatía inducida por dieta alta en grasa.</i>	23
4.4.2. <i>Determinar el papel de VCAM-1 en la función y estructura cardiaca en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.</i>	23
4.4.3. <i>Evaluar blancos moleculares hipertróficos y metabólicos presentes en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.</i>	23
4.5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.5.1 <i>Animales y dietas:</i>	24
4.5.2 <i>Test de tolerancia a la glucosa:</i>	24
4.5.3 <i>ELISA:</i>	24
4.5.4 <i>Determinación HOMA-IR:</i>	24
4.5.5 <i>Evaluación ecocardiográfica:</i>	25
4.5.6 <i>Evaluación histológica:</i>	25
4.5.7 <i>Determinación de los niveles de proteínas por Inmuno-blot:</i>	26
4.5.8 <i>Determinación de los niveles de mRNA por RT-qPCR:</i>	26
4.5.9 <i>Genotipificación de animales c-VCAM-1-KO:</i>	27
4.5.10 <i>Test de tolerancia al ejercicio:</i>	27
4.5.11 <i>Determinación de presión arterial:</i>	27
4.5.12 <i>Análisis estadístico:</i>	28
4.6. RESULTADOS	29
4.6.1 <i>Objetivo 1: Evaluar si los niveles de expresión de VCAM-1 aumentan en el corazón de ratones con cardiomiopatía inducida por dieta alta en grasa.</i>	29
4.6.2. <i>Objetivo 2: Determinar el papel de VCAM-1 en la función y estructura cardiaca en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.</i>	37
4.6.3. <i>Objetivo 3: Evaluar blancos moleculares hipertróficos y metabólicos presentes en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.</i>	50
4.6. DISCUSIÓN	55
5. CONCLUSIONES	65
6. BIBLIOGRAFÍA	66
7. ANEXOS	71
7.1 FIGURAS SUPLEMENTARIAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura molecular de VCAM-1 en humano y ratón.	19
Figura 2: VCAM-1 en contexto inflamatorio.	20
Figura 3: Dieta alta en grasas por 25 semanas de tratamiento induce aumento de peso corporal.	29
Figura 4: Dieta alta en grasas (25 semanas de tratamiento) induce aumento del peso del tejido adiposo subcutáneo y esteatosis en hígado.	30
Figura 5: Dieta alta en grasas por 25 semanas induce intolerancia a la glucosa.	31
Figura 6: Dieta alta en grasas por 25 semanas induce hiperinsulinemia, aumento del índice HOMA-IR y resistencia a la insulina en corazón.	32
Figura 7: Dieta alta en grasas (25 semanas de tratamiento) induce hipertrofia cardiaca.	33
Figura 8: Dieta alta en grasas por 25 semanas de tratamiento no produce disfunción diastólica.	34
Figura 9: Dieta alta en grasas por 25 semanas de tratamiento mantiene una función sistólica preservada.	35
Figura 10: Los niveles cardiacos de mRNA de Vcam-1 y sVCAM-1 plasmáticos aumentan en animales wild type alimentados con dieta alta en grasas por 25 semanas.	36
Figura 11: Generalidades animales alphaMHC-VCAM-1-KO.	37
Figura 12: Niveles cardiacos de VCAM-1 no aumentan en ratones c-VCAM-1-KO condiciones de HFD por 25 semanas.	39
Figura 13: Niveles plasmáticos de la proteína sVCAM-1 dependen de la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito.	40
Figura 14: c-VCAM-1-KO incrementa el peso corporal en animales alimentados con HFD al igual que los animal F/F HFD.	40
Figura 15: c-VCAM-1-KO HFD incrementa el peso del tejido epididimal.	41
Figura 16: c-VCAM-1-KO HFD presenta esteatosis hepática al igual que el F/F HFD.	42
Figura 17: c-VCAM-1-KO incrementa el peso del pulmón en condiciones de HFD.	43
Figura 18: c-VCAM-1-KO HFD no incrementa el peso de bazo, riñón y páncreas en comparación a los animales F/F HFD.	43
Figura 19: c-VCAM-1-KO altera la morfología normal del corazón en animales alimentados con HFD.	44
Figura 20: c-VCAM-1-KO incrementa el área de sección transversal del cardiomiocito en animales alimentados con HFD.	45
Figura 21: c-VCAM-1-KO incrementa la fibrosis en animales alimentados con HFD.	45
Figura 22: c-VCAM-1-KO incrementa el peso del corazón en animales alimentados con HFD.	46
Figura 23: c-VCAM-1-KO produce disfunción diastólica en animales alimentados con HFD.	47
Figura 24: c-VCAM-1-KO produce disfunción sistólica en animales alimentados con HFD.	48
Figura 25: Los ratones c-VCAM-1-KO no presentan cambios en las presiones sistólica y diastólica por la administración de la HFD.	48
Figura 26: c-VCAM-1-KO HFD presentan intolerancia al ejercicio.	49
Figura 27: Ratones c-VCAM-1-KO alimentados con HFD presentan aumentos en los niveles de mRNA de Anp y Bnp, como también niveles proteicos de ANP.	51
Figura 28: c-VCAM-1-KO no presenta cambios significativos en test de tolerancia a la glucosa en condiciones de dieta alta en grasa.	53
Figura 29: c-VCAM-1-KO HFD no presenta cambios en insulinemia ni HOMA-IR al compararlo con F/F HFD.	53
Figura 30: c-VCAM-1-KO HFD aumenta la pAKT/AKT luego de un pulso de insulina en el corazón.	54
Figura 31: c-VCAM-1-KO HFD no presenta cambios en los niveles de mRNA de FoxO1.	54
Figura 32: Aumentos de los niveles circulantes de la proteína sVCAM-1 se asocian al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.	61
Figura 33: VCAM-1 es un factor protector frente al daño inducido por dieta alta en grasas.	62

1. Resumen

Introducción: La cardiomiopatía inducida por obesidad es una condición clínica que presenta efectos perjudiciales sobre la función cardíaca. Sin embargo, los mecanismos moleculares asociados a su desarrollo permanecen no completamente estudiados. La proteína de adhesión de la célula vascular 1 (VCAM-1), es una molécula de adhesión canónicamente encontrada en el endotelio de vasos sanguíneos bajo contextos inflamatorios, donde la presencia de VCAM-1 en la membrana de células endoteliales permite la adhesión y trans migración de células inflamatorias a sitios de inflamación en los tejidos. Hasta la fecha, se desconoce la participación de VCAM-1 cardíaca asociada con fenotipos de cardiomiopatía inducida por obesidad.

Objetivos: Investigar los cambios en la función, morfología y marcadores moleculares asociados a VCAM-1 en un modelo experimental de cardiomiopatía inducida por obesidad en animales *wild type* y knock-out cardiomiocito específicos para VCAM-1 (c-VCAM-1-KO), con su respectivo control F/F.

Métodos: Animales macho *wild type*, F/F y c-VCAM-1-KO cepa *C57BL/6N* de 10 semanas de edad fueron utilizados y aprobados para experimentación por el protocolo de bioética 20387-CYQ-UCH. Estos animales se alimentaron por 25 semanas con una dieta alta en grasas (HFD) (60% Kcal grasas) o dieta control (10% Kcal grasas). Se realizaron análisis morfométricos: peso corporal y de órganos como tejido adiposo e hígado para determinar obesidad. Para el análisis del corazón se determinó el peso del corazón y parámetros histológicos como: área de sección transversal y perímetro con la tinción con wheat germ agglutinin (WGA) y fibrosis por la tinción Picro-Sirius Red. Se realizaron ecocardiografías en animales despiertos en Modo M para determinar función sistólica (fracción de eyección y de acortamiento) y animales anestesiados mediante Doppler y Doppler tisular para evaluar las relaciones E/A y E/E'. Para evaluar el estado metabólico se realizaron test de tolerancia glucosa, ELISA kit para insulinemia, índice HOMA-IR y niveles de pAKT Ser 473 por Inmuno-blot para determinar resistencia a la insulina bajo un pulso de insulina. Se realizó test de tolerancia al ejercicio para determinar el estatus cardiovascular frente a esfuerzo. Se realizaron experimentos de RT-qPCR y Inmuno-blot para determinar la expresión génica y proteica, respectivamente, de VCAM-1, ANP, BNP, β -MHC y FoxO1, como también la medición de niveles plasmáticos de VCAM-1 soluble mediante ELISA.

Resultados: Los animales *wild type* alimentados con HFD presentaron obesidad, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hipertrofia cardíaca, como también aumento de los niveles génicos y solubles de VCAM-1, estableciendo un modelo de cardiomiopatía inducida por obesidad. Los

animales c-VCAM-1-KO alimentados con dieta alta en grasas presentaron obesidad e intolerancia a la glucosa, sin embargo, la hiperinsulinemia y sensibilidad a la insulina mediante el aumento en la pAKT (Ser 473) bajo un pulso de insulina no fueron concluyentes. Además, presentaron disfunción diastólica con un aumento de la razón E/E' , disfunción sistólica con una disminución de la fracción de eyección y acortamiento, hipertrofia cardíaca con aumento del peso del corazón, área de sección transversal de los cardiomiocitos y marcadores patológicos como ANP y BNP, fibrosis e intolerancia al ejercicio, mostrando un fenotipo de cardiomiopatía inducida por obesidad acentuado y patológico, con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida. Los niveles circulantes de sVCAM-1 en los animales F/F HFD están aumentados, no así la condición c-VCAM-1-KO alimentados con HFD.

Conclusión: Los resultados muestran que los animales c-VCAM-1-KO alimentados con HFD exacerbaban el fenotipo hipertrófico inducido por la HFD, induciendo insuficiencia cardíaca con disfunción sistólica y diastólica, sugiriendo que los niveles de sVCAM-1 y VCAM-1 en el corazón serían una respuesta compensatoria al daño inducido por la HFD. Por lo tanto, VCAM-1 tendría un papel protector en el modelo de cardiomiopatía inducido por la dieta alta en grasas.

2. Abstract

Introduction: Obesity-induced cardiomyopathy is a clinical condition that has detrimental effects on cardiac function. However, the molecular mechanisms associated with its development have not been fully studied. Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), is an adhesion molecule canonically found in the endothelium of blood vessels under inflammatory contexts, the presence of VCAM-1 in the endothelial cell membrane allows adhesion and transmigration of inflammatory cells to sites of inflammation in tissues. To date, the role of cardiac VCAM-1 associated with obesity-induced cardiomyopathy phenotypes is unknown.

Objectives: To investigate the changes in the function, morphology, and molecular markers associated with VCAM-1 in an experimental model of cardiomyopathy induced by obesity in wild-type and cardiomyocyte knockout animals specific for VCAM-1 (c-VCAM-1-KO) with its respective F/F control.

Methods: Male wild type, F/F and c-VCAM-1-KO strain C57BL/6N animals of 10 weeks of age were used and approved for experimentation by bioethics protocol 20387-CYQ-UCH. These animals were fed for 25 weeks with a high-fat diet (HFD) (60% Kcal fat) or a control diet (10% Kcal fat). Morphometric analyzes were performed: body weight and organs such as adipose tissue and liver to determine obesity. For heart analysis, heart weight and histological parameters such as: cross-sectional area and perimeter were determined by wheat germ agglutinin (WGA) staining and fibrosis by Picro-Sirius Red staining. Echocardiography was performed in awake animals in M-Mode to determine the systolic function (ejection fraction and shortening); and in anesthetized animals using Doppler and tissue Doppler to evaluate the E/A and E/E' ratios. To evaluate the metabolic state, the glucose tolerance test, ELISA kit for insulinemia, determination of HOMA-IR index, and pAKT Ser 473 levels by Immuno-blot were performed to determine insulin resistance under an insulin pulse. An exercise tolerance test was performed to determine cardiovascular status against exertion. RT-qPCR and Immuno-blot experiments were performed to determine gene and protein expression, respectively, of VCAM-1, ANP, BNP, β -MHC, and FoxO1, as well as the measurement of soluble plasma VCAM-1 levels by ELISA.

Results: Wild-type animals fed with HFD presented obesity, glucose intolerance, hyperinsulinemia, insulin resistance and cardiac hypertrophy, as well an increase in soluble and gene levels of VCAM-1, providing a model of obesity-induced cardiomyopathy. c-VCAM-1-KO animals fed high-fat diet obesity

and glucose intolerance, however hyperinsulinemia and insulin sensitivity by an increase in pAKT (Ser 473) under pulse insulin were inconclusive. Additionally, diastolic dysfunction with increased E/E' ratio, systolic dysfunction with decreased ejection fraction and shortening, cardiac hypertrophy with increased heart weight, cardiomyocyte cross-sectional area, and pathologic markers such as ANP and BNP, fibrosis, and exercise intolerance, showing a phenotype of marked and pathological obesity-induced cardiomyopathy, with heart failure with reduced ejection fraction. Circulating levels of sVCAM in F/F HFD animals are increased, but not in condition c-VCAM-1-KO HFD.

Conclusion: The results show that c-VCAM-1-KO animals fed with HFD exacerbate the hypertrophic phenotype induced by HFD, inducing heart failure with systolic and diastolic dysfunction, suggesting that the levels of sVCAM-1 and VCAM-1 in the heart would be a compensatory response to the damage induced by HFD. Therefore, VCAM-1 has a protective role in a model of high-fat diet-induced cardiomyopathy.

3. Introducción

El corazón es el órgano principal del sistema circulatorio, el cual actúa como una bomba mecánica para poder distribuir la sangre a todos los tejidos y células de los organismos vertebrados. Dentro de las células que conforman este órgano se encuentran: células musculares lisas vasculares, células endoteliales, células epicárdicas, células marcapasos, fibroblastos y cardiomiocitos. Estos últimos son las células que confieren la capacidad contráctil al corazón [1] presentan una alta diferenciación y baja tasa de proliferación en el estadio adulto del desarrollo [1], [2]. Debido a lo anterior, el tejido cardiaco frente a un daño no presenta regeneración del tejido, lo que desencadena el reemplazo del tejido cardiaco por una cicatriz fibrosa de colágeno, evento que produce una disfunción cardíaca y el desarrollo de patologías cardiovasculares.

De todas las muertes anuales en nuestro planeta, el 30% corresponde a las enfermedades cardiovasculares [3], siendo también en Chile la principal causa de muerte. En el año 2014, las patologías cerebrovasculares e infarto del miocardio representaron el 28% del total de defunciones en el país [4]. Las enfermedades cardiovasculares más prevalentes son: la enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía diabética. Sus principales factores de riesgo incluyen la inactividad física, obesidad, niveles plasmáticos de colesterol alto, tabaquismo, presión arterial elevada, niveles altos de glucosa y diabetes [5]. Las estadísticas muestran que las enfermedades cardiovasculares van en aumento [5] y un meta-análisis del 2016 en Estados Unidos sugiere que uno de los principales riesgos de enfermedad cardiovascular es la obesidad, aumentando en 1,45 veces el riesgo relativo, mostrando la importancia de mantener un peso y consumir una dieta saludable como prevención [5].

Descubrir nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares es un desafío importante para la comunidad científica y el bienestar de la población mundial. Nuestro interés radica específicamente en buscar nuevos blancos terapéuticos que prevengan el desarrollo de la cardiomiopatía diabética asociada a obesidad, tomando en consideración la alta prevalencia de diabetes mellitus y obesidad tanto en Chile como el resto del mundo. Previamente en los laboratorios de los Dres. Sergio Lavandero y Joseph A. Hill descubrieron que la proteína VCAM-1 (Vascular adhesión molecul-1) está expresada en el corazón [6], [7] y su función en modelos de dieta alta en grasas en el corazón no han sido estudiada.

4. Desarrollo

4.1 Marco teórico

4.1.1 Cardiomiopatía inducida por obesidad.

La cardiomiopatía inducida por obesidad es una enfermedad multifactorial, que tiene como factores de riesgo la obesidad, hiperglicemia, resistencia a la insulina y disminución de la señalización de la insulina en el corazón. Estos factores conducen al desarrollo de desórdenes metabólicos y resistencia a la insulina en el tejido cardíaco, produciendo alteraciones celulares tales como hipertrofia y fibrosis, aumento del estrés oxidativo, inflamación crónica de bajo grado, estrés de retículo, señalización de insulina aberrante, lipotoxicidad y cambios en la bioenergética mitocondrial [8]. Si bien esta enfermedad está frecuentemente asociada a personas adultas, la prevalencia de DMT2 en jóvenes entre el año 2001 y 2009 ha aumentado en un 30%, y de estos jóvenes, un 1% presenta sobrepeso y un 79% tiene obesidad [5]. Los mecanismos que relacionan DMT2 y obesidad en el desarrollo de cardiomiopatías son un blanco de investigación prioritario dado el aumento de la prevalencia de la DMT2 y obesidad en todo el mundo. En relación a los mecanismos moleculares, la cardiomiopatía inducida por obesidad presenta como una de sus características principales el desarrollo de resistencia a la insulina y la alteración del metabolismo lipídico. Dentro de este estado se incluye la presencia de una deficiente señalización de insulina en los cardiomiocitos, acompañado de disminución en la actividad del *Insulin receptor substrate 1* (IRS-1) y proteína quinasa AKT, con la consecuente disminución de los transportadores de glucosa GLUT-4 en la membrana plasmática y de la captación de este sustrato en la membrana de los cardiomiocitos. Además, también se observa la acumulación de lípidos en diversos tejidos blanco, como también la reducción del metabolismo oxidativo mitocondrial [9].

Diferentes modelos experimentales se han usado para estudiar el desarrollo de la cardiomiopatía en contextos de obesidad, tales como: el modelo de ratones *ob/ob*, que tienen mutado el gen de la leptina; ratones *db/db* que tienen mutado el receptor de leptina en el hipotálamo; y ratones *C57BL/6* alimentados con dieta alta en grasa (HFD, por sus siglas en inglés *high-fat diet*) [10]. En estos animales se encuentran las características que definen la patología, las que incluyen: disminución de la función diastólica, aumento de la masa del ventrículo izquierdo, disminución de la eficiencia cardíaca, aumento en la oxidación de ácidos grasos, acumulación de lípidos y disminución de la bioenergética mitocondrial en los cardiomiocitos. Los ratones alimentados con HFD por 2 semanas presentan un cambio en el sustrato

metabólico preferente del cardiomiocito para obtener energía, oxidando más glucosa que ácidos grasos. Posterior a las 20 semanas de tratamiento con HFD se ha observado que hay una disminución en la función cardíaca por alteraciones en el metabolismo y cambio de sustrato metabólico [11], [12]. Otro estudio mostró que ratones alimentados con HFD por 25 semanas desarrollan cardiomiopatía diabética, en donde el factor transcripcional FoxO1 es uno de los blancos moleculares responsables de este fenotipo, observando que un aumento de la actividad de FoxO1 conduce a una mayor expresión de proteínas que favorecen la captación y acumulación de lípidos, favoreciendo el desarrollo de lipotoxicidad, como también una disminución en la sensibilidad a la insulina [12]. Para tener un acercamiento a los mecanismos por los que se desarrolla la cardiomiopatía inducida por obesidad, estamos interesados en el uso de la HFD para inducir este fenotipo, para tener un modelo que se correlacione a los altos índices de obesidad que presenta Chile [13]

Uno de los blancos que se está estudiando para tratar la cardiomiopatía inducida por obesidad es la inflamación crónica de bajo grado generada por una producción anormal de las citoquinas inflamatorias tales como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) e IL-6 (interleuquina-6) en modelos de obesidad y DMT2 [14]. En el siguiente punto abordaremos la contribución de VCAM-1 en el corazón y su posible relación con la cardiomiopatía inducida por obesidad.

4.1.2 VCAM-1 y sus efectos en el cardiomiocito

4.1.2.1 Estructura molecular de VCAM-1

VCAM-1 es una sialoglicoproteína de transmembrana, perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas (Ig) de tipo 1 [15], [16], y que posee 7 dominios Ig hacia el extracelular. Los dominios 1 y 4 se unen a la integrina $\alpha 4\beta 1$, o también llamado VLA-4 por sus siglas en inglés Very Late Antigen-4 (VLA-4)[17]. Además, el dominio citoplasmático de la proteína, se encuentra el dominio carboxilo terminal que contiene 19 aminoácidos y es altamente conservado, ya que presenta un 100% de identidad entre especies, tales como: rata, ratón, humano y conejo [18]. Existen dos isoformas de VCAM-1 en humanos, una de ellas posee los 7 dominios de Ig, que es la isoforma completa y otra de 6 dominios transmembrana, la que tiene la escisión del dominio 4. En ratones, VCAM-1 está expresado en su forma completa y una isoforma con 3 dominios de Ig. Existe homología entre los dominios Ig 1-4, 2-5 y 3-6 de VCAM-1, en donde los dominios 1 y 4 son sitios que presentan sitios de unión a la ligando (**Figura 1**). La homología entre los dominios Ig es fundamental para la interacción de VCAM-1 con sus posibles ligandos, siendo

el blanco primario la integrina $\alpha 4\beta 1$, pero también puede interactuar con $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$ $\alpha D\beta 2$ con menos afinidad [19], [20]. El dominio extracelular de la proteína VCAM-1 es blanco de las metaloproteinasas ADAM 17, ADAM 8 y ADAM 9 (por sus siglas en inglés: A desintegrin and metalloprotease (ADAM), produciendo la liberación de VCAM-1 hacia el intersticio y/o sangre, denominado VCAM-1 soluble (sVCAM-1)[18], [21] y que puede señalar mediante su unión a integrina $\alpha 4\beta 1$, por ejemplo, afectando la apoptosis en linfocitos T [22]. En humanos, los niveles de sVCAM-1 están aumentados en diferentes enfermedades tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus, insuficiencia cardiaca, neumonía aguda eosinófila, etc. [19]. La porción transmembrana de VCAM-1 funciona como una proteína de andamio para la migración de leucocitos en el endotelio de los vasos sanguíneos y además promueve la activación de vías de señalización en el endotelio mediante la generación de ROS por la NADPH oxidasa [18].

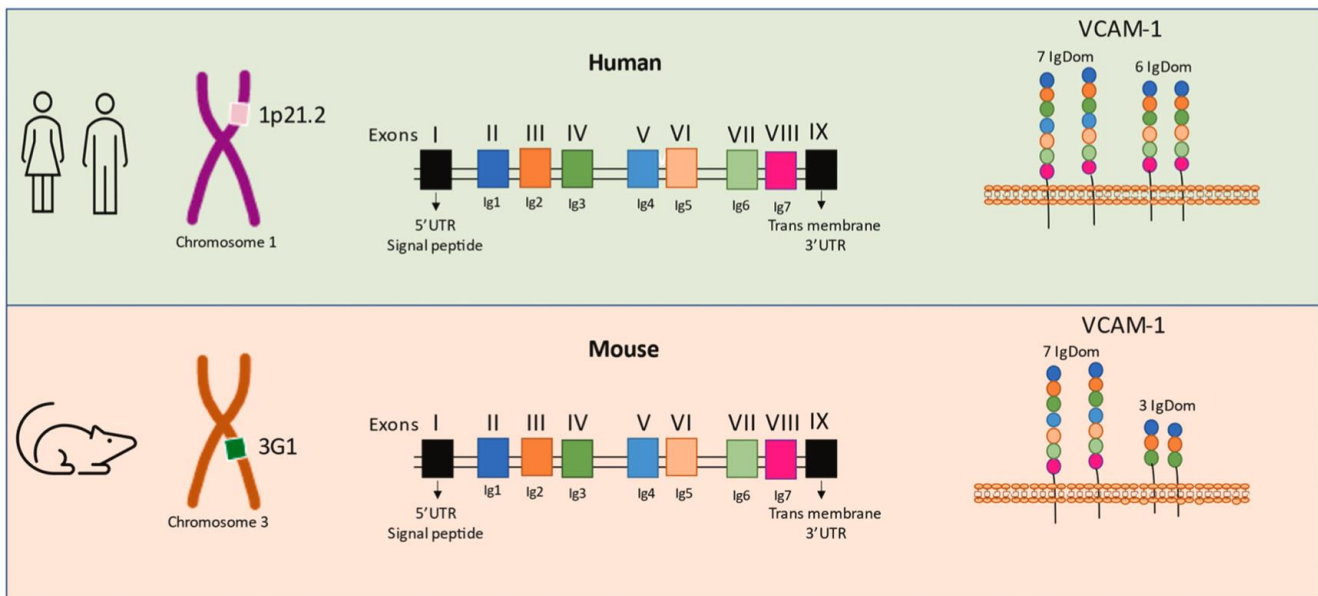


Figura 1: Estructura molecular de VCAM-1 en humano y ratón. VCAM-1 en humanos es codificado por el cromosoma 1, presenta 9 exones y dos variantes de splicing, una de 7 y 6 dominios Ig. En ratones, VCAM-1 es codificado por el cromosoma 3, presenta los mismos 9 exones pero presenta dos variantes de splicing con 7 y 3 dominios Ig. Figura extraída de la referencia [19].

4.1.2.2 Participación de VCAM-1 en inflamación

VCAM-1 es una proteína constitutivamente expresada en células dendríticas linfoides, fibroblastos de la médula ósea, algunos macrófagos tisulares y endotelio [15], [18]. Adicionalmente, su síntesis y expresión se puede inducir en diferentes tipos celulares. Clásicamente, durante inflamación aguda, las células inflamatorias liberan citoquinas tales como IL-1 o TNF- α . Estas citoquinas inducen la expresión de VCAM-1 en diferentes tipos celulares. En el caso de TNF- α , se activa la vía de TNFR1 y la cascada de señalización de IKK- NF κ B, promoviendo la transcripción de VCAM-1 y su consecuente traducción y expresión [23] (**Figura 2**).

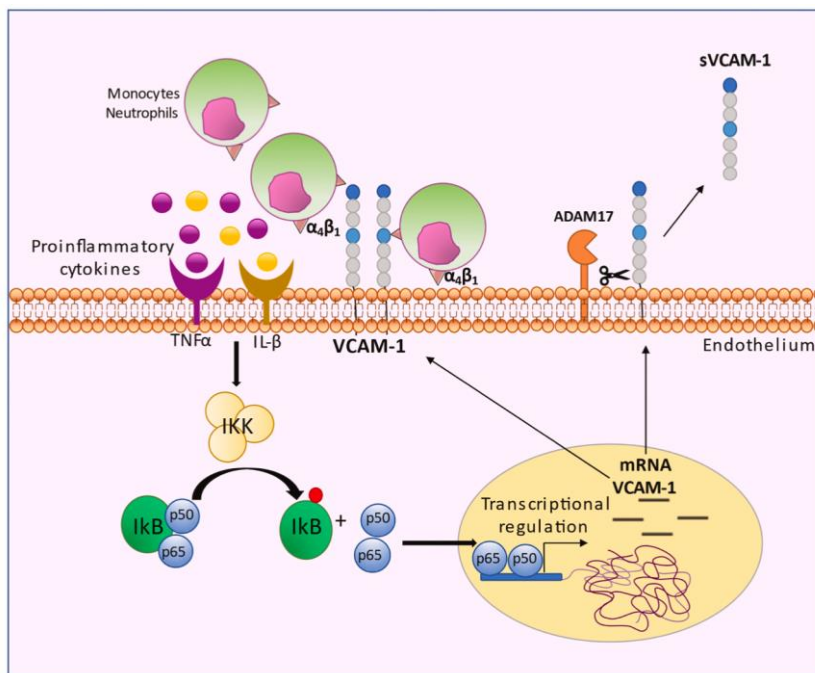


Figura 2: VCAM-1 en contexto inflamatorio. Bajo estímulos pro-inflamatorios como TNF- α y IL-1 β , VCAM-1 se expresa canónicamente en el endotelio mediante la vía de señalización IKK/NF- κ B, donde se induce su expresión transcripcional. Luego, el mRNA de VCAM-1 es traducido a proteína y se localiza en su mayoría en la membrana plasmática. Las células inflamatorias como leucocitos, presentan el ligando $\alpha_4\beta_1$, que es reconocido por VCAM-1 y favorece la adhesión y migración de las células inflamatorias desde la sangre al tejido dañado. Además VCAM-1 es blanco de ADAM-17, produciendo el shedding y la liberación de sVCAM-1 al intersticio y plasma. Figura extraída de la referencia [19].

Tanto TNF- α como IL-1 aumentan los niveles de VCAM-1 en las células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC), siendo TNF- α un inductor de la expresión de VCAM-1 más potente que IL-1 [15]. En contextos de inflamación crónica de bajo grado, tal como lo es la obesidad, se han observado aumentos en la expresión de VCAM-1 en conjunto con altos niveles de lipoproteínas, hiperglicemia e hiperinsulinemia [24], [25], los cuales se pueden deber al aumento de proteínas pro-inflamatorias como lo son TNF- α , IL-6, PAI-1 and C-reactive protein (CRP)[26]. Además, mujeres con obesidad presentan niveles plasmáticos incrementados de sVCAM-1 al comparar con mujeres de peso normal [27].

4.1.2.3 Participación de VCAM-1 en el corazón

En el corazón, VCAM-1 participa en varios estados de desarrollo, debido a que embriones knock-out completos para VCAM-1 presentan malformaciones en el desarrollo de la placenta, como también muestran células sanguíneas presentes en el saco pericárdico, impidiendo el correcto desarrollo del corazón y haciendo que estos animales no sean viables [28], [29]. En concordancia a estos resultados, los ratones knock-out para la integrina $\alpha 4$ muestra una negativa interacción célula-célula entre el epicardio y el miocardio, apareciendo sangrado alrededor del corazón en estadio E12,5 de los embriones [30]. Adicionalmente, Feudous et al. mostraron que embriones *knock-out* para FoxO1, un factor transcripcional altamente descrito en patologías como diabetes, presentaban un fenotipo similar al encontrado con el ratón knock-out para VCAM-1 e integrina $\alpha 4$, observando alteraciones en el desarrollo de la placenta de los embriones. Interesantemente, en este trabajo se encontró que los niveles proteicos de VCAM-1 estuvieran disminuidos en los corazones de los animales knock-out con respecto a los animales control. De esta forma, se sugiere que la expresión de VCAM-1 podría estar modulada por FoxO1 [7].

Sumado a la evidencia descrita anteriormente, también se ha descrito la participación de VCAM-1 en patologías como la enfermedad isquémica, el infarto del miocardio y la insuficiencia cardiaca [19]. Los niveles de mRNA de VCAM-1 se encuentran aumentados en pacientes con cardiomiopatía isquémica [31], como también los niveles circulantes de sVCAM-1 luego de un infarto al miocardio[32], [33]. Por otra parte, los niveles de sVCAM-1 se encuentran relacionados a la incidencia de riesgo de la insuficiencia cardiaca, siendo el fenotipo de insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada (HFpEF) el con mayor asociación [34]. El trabajo de Kolijn et al. muestra que animales con HFpEF presentan un aumento en los niveles de VCAM-1 y que estos niveles bajan con el tratamiento de los animales con empaglifozina, un inhibidor del cotransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2) [35].

Adicionalmente, se ha propuesto al sVCAM-1 como marcador predictivo independiente en pacientes con eventos de fibrilación auricular postoperatorios (POAF por sus siglas en inglés) ante una cirugía de bypass de arterias coronarias [6]. Esta evidencia muestra que VCAM-1 está siendo descrito como una proteína contribuidora al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, su papel en las enfermedades cardiovasculares aún no ha sido descrito.

Hasta la fecha, no se ha precisado cuál es la función de VCAM-1 en el corazón, qué señales inducen su expresión y cuáles son sus mecanismos de señalización en el cardiomiocito. Debido a los antecedentes presentados anteriormente, nuestro objetivo consiste en estudiar el rol de VCAM-1 en el desarrollo de resistencia a la insulina en el cardiomiocito inducido por dieta alta en grasas.

4.2.Hipótesis

El aumento de los niveles de VCAM-1 en el cardiomiocito media el desarrollo de cardiomiopatía inducida por dieta alta en grasa, alterando la señalización de insulina en el cardiomiocito.

4.3.Objetivo general

“Estudiar el papel de VCAM-1 cardíaco en el desarrollo de cardiomiopatía inducida por la administración de dieta alta en grasa en el ratón”

4.4.Objetivos específicos

4.4.1. Evaluar si los niveles de expresión de VCAM-1 aumentan en el corazón de ratones con cardiomiopatía inducida por dieta alta en grasa.

4.4.2. Determinar el papel de VCAM-1 en la función y estructura cardíaca en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.

4.4.3. Evaluar blancos moleculares hipertróficos y metabólicos presentes en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.

4.5. Materiales y Métodos

4.5.1 Animales y dietas:

Se utilizaron ratones C57BL/6N macho de 10 semanas de edad. Los animales están aprobados por el comité de ética de la Universidad de Chile, bajo el código 20387-CYQ-UCH. Un grupo de animales fueron alimentados con dieta estandarizada de alto contenido calórico proveniente de grasa (Research Diet #D12492, HFD). En esta dieta un 60 % de kcal proviene de grasas (54% de kcal se obtienen de manteca de cerdo, y un 6% de kcal se obtienen de aceite de soya). Como control se utilizó una dieta de bajo contenido de grasas (Research Diet #D124505), de la cual un 10% de kcal son de origen graso. El tratamiento con ambas dietas se realizó por 25 semanas. La disposición del alimento y agua fue *ad libitum*.

4.5.2 Test de tolerancia a la glucosa:

Los animales fueron sometidos a ayuno por 6 h antes de realizar el experimento. Se les administró una carga intraperitoneal de glucosa disuelta en PBS 1x 0,1M , pH 7.4 a una concentración de 1 g de glucosa/kg de animal. Las mediciones se realizaron a los tiempos 0', 15', 30', 60', 90' y 120'. Las mediciones se realizaron a las 0 semanas, 5 semanas, 15 semanas y 25 semanas de dieta para determinar curva de tolerancia a la glucosa, glucosa basal y área bajo la curva.

4.5.3 ELISA:

Los niveles de sVCAM-1 se determinaron utilizando el kit Quantikine ELISA Mouse VCAM-1/CD106 Immunoassay de R&D Biosystem y los niveles de insulinemia a través del kit Mouse Insulin ELISA 10-1247-01 - Mercodia. Se utilizó plasma sanguíneo obtenido de los animales en su sacrificio y su recolección fue acompañada del uso de EDTA como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron por 20 min a 2000 g para obtener el plasma. Las muestra se almacenaron a temperaturas -80°C y se descongelaron solo al momento de utilizar para el ensayo.

4.5.4 Determinación HOMA-IR:

Se utilizaron las mediciones realizadas en los puntos anteriores correspondientes a glucosa basal e insulinemia para aplicar la fórmula: $(\text{Insulina en ayuno} * \text{Glucosa en ayuno}) / 22.5$. Este último valor sería el factor corrector utilizado en ratones [36].

4.5.5 Evaluación ecocardiográfica:

Los ecocardiogramas se realizaron en ratones despiertos, previamente entrenados durante una semana para tal fin o anestesiados con isoflurano 2% constante. Previamente, se depilaron en la zona torácica y fueron monitoreados por ECG a través de electrodos adheribles. Se utilizó el sistema de ultrasonido Vivid i de General Electric con el transductor iRL-RS que tiene una frecuencia de 5-13MHz, profundidad de campo de 6 cm y campo de visión de 25 mm. Se evaluaron dos vistas durante el estudio cardíaco: 1. Mediciones en el eje largo de cuatro cámaras que corresponden a la evaluación de la función diastólica en modo Doppler donde se incluye la determinación de: Onda E, llenado ventricular rápido; onda A, contracción auricular, índice E/A para determinar la función diastólica y onda E' mediante Doppler tisular. 2. Mediciones realizadas en el eje corto a nivel de los músculos papilares en modo M para determinar el grosor de la pared anterior y posterior del corazón (mm); DVID: diámetro ventrículo izquierdo en diástole (mm); DVIs: diámetro ventrículo izquierdo en sístole (mm); FE: fracción de eyección (a través del Método de Teich); y FA: fracción de acortamiento (expresado en %) para determinar función sistólica.

4.5.6 Evaluación histológica:

Para observar los cambios histológicos en los animales, se extrajo el corazón luego de cumplir el tiempo de tratamiento. Los corazones fueron seccionados mediante un corte transversal (*2-chamber view*) para visualizar los ventrículos, como también un corte longitudinal (*4-chamber view*), para visualizar ventrículos y atrios. Luego, fueron fijados en paraformaldehído 4% p/v en PBS 1x a 0.1M, pH 7.4 por 24 h a temperatura ambiente. Se realizó un procesamiento de rutina para estas muestras y se obtuvieron cortes de 3 µm de espesor. Se realizaron las técnicas de Hematoxilina-Eosina (H/E) para observar la morfología básica de los tejidos, Wheat Germ Agglutinin (WGA) para observar los límites de los cardiomiocitos y determinar área de sección transversal y perímetro. Se realizó la técnica de Picro-Sirius Red (PSR) para evaluar fibrosis cardiaca. Además, se realizó inmunohistoquímica mediante recuperación antigénica con buffer citrato 0,1M pH 6.0 utilizando el anticuerpo VCAM-1 (1:200). Se obtuvieron imágenes representativas de los campos de interés y se obtuvieron 10 fotos por muestra para realizar los análisis en el programa Image J.

4.5.7 Determinación de los niveles de proteínas por Inmuno-blot:

Las proteínas se obtuvieron a partir de lisados totales de ventrículo izquierdo con RIPA e inhibidores de proteasa y fosfatasas. La cuantificación de proteínas se realizó con el método de BCA protein kit (Thermo). Las proteínas fueron separadas en geles de acrilamida al 10-15% v/v. Se realizaron electroforesis por 3 h a 80 V y transferencia en membrana de nitrocelulosa por 10 min en equipo de transferencia semiseca (BioRad). Posteriormente se realizó la tinción con Rojo Ponceau para visualizar las proteínas en la membrana. Luego, la membrana se bloqueó con leche descremada 5% p/v en TBS-Tween-20 0.01% v/v por 1 h. Finalmente, se incubaron los anticuerpos durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS-Tween-20 0.01% v/v y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa para posteriormente visualizar las proteínas con un sistema quimio luminiscente de revelado (EZ-ECL) en el equipo LICOR. Los análisis de densitometría de las imágenes se realizaron en el programa Image J. Las proteínas evaluadas y sus correspondientes diluciones en solución de bloqueo fueron: VCAM-1 (1:1000), pAKT (ser-473) (1:1000), AKT total (1:1000), ANP (1:5000), y beta-tubulina (1:5000). El anticuerpo de VCAM-1 utilizado reconoce los últimos 13 aminoácidos del C-terminal de VCAM-1 (clon EPR5047, ab134047, Abcam).

4.5.8 Determinación de los niveles de mRNA por RT-qPCR:

Se determinaron los niveles de mRNA de los genes *Vcam-1*, *FoxO1*, *Anp*, *Bnp*, *β-Mhc* (**Tabla 1**) utilizando como control de carga *18s*. Para este fin, el mRNA fue extraído a partir de lisados totales de corazón mediante el uso de TRIzol (Invitrogen) y se procedió a extraer el RNA. Las muestras fueron cuantificadas en el equipo Nanodrop y luego se utilizó 1 µg de RNA para la síntesis de cDNA con el master mix SuperScript III (Invitrogen). La determinación de la cantidad de mRNA se realizó mediante el método $2^{\Delta\Delta CT}$ en el equipo Step One Plus (Applied Biosystem).

Tabla 1: Secuencia de partidores utilizados.

Partidor	Sentido	Anti-sentido
<i>Vcam-1</i>	5'- CCCACCATTGAAGATACCGGGA -3'	5'- TAGTATAGGAGAGGGGCTGACC -3'
<i>FoxO1</i>	5`-GCAGCCAGGCATCTCATAA-3`	5`-CCTACCATAGCCATTGCAGC-3`
<i>Anp</i>	5-TCGTCTTGGCCTTTTGGCT-3`	5`-TCCAGGTGGTCTAGCAGGTTCT-3`
<i>Bnp</i>	5`-CATGGATCTCCTGAAGGTC-3`	5`-CCTTCAAGAGCTGTCTCTGG-3`
<i>β-Mhc</i>	5'-AAGCAGCAGTTGGATGAGCG-3'	5'-CCTCGATGCGTGCCTGAAGC-3'
<i>18s</i>	5`-CCCTGCCCTTTGTACACACC-3`	5`-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3`

4.5.9 Genotipificación de animales c-VCAM-1-KO:

Para determinar si los animales a utilizar correspondían a animales F/F o VCAM-1-KO, se realizó genotipificación de la secuencia LOX-P asociada a VCAM-1, la cual debe estar presente en todos los animales, como también la secuencia CRE, correspondiente a la recombinasa presente bajo el promotor de la alpha-myosin heavy chain (α -MHC) específicamente expresada en cardiomiocitos. Se realizó la extracción de DNA a partir de muestra de oreja de ratón con DNAzol (Invitrogen). La secuencia de los partidores se detalla en la **Tabla 2**. El PCR para la amplificación de las secuencias se realizó con el kit GoTaq Green Master Mix 2X bajo el protocolo en termociclador correspondiente a 95° x 5 min / 30 ciclos de: 95° x 30", 55° x 45", 72° x 45"/ 72° x 10 min/ 4° mantención. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1% p/v con 10 μ l de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) en buffer TAE 0,5X, a 80 V por 40 min.

Tabla 2: Secuencias de partidores para genotipificación de animales c-VCAM-1-KO.

Partidor	Sentido	Anti-sentido
<i>LOXP-VCAM-1</i>	5'-GGGACGGATTTTCTTCCAC -3'	5'-GACTTTGAAGCCCATTGCAC-3'
<i>α-MHC CRE</i>	5'- AGGTTCGTTCACTCATGG-3'	5'- CGACCAGTTTAGTTACCC-3'

4.5.10 Test de tolerancia al ejercicio:

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

4.5.11 Determinación de presión arterial:

Los animales se aclimataron por 4 días, 5 min diarios en el equipo CODA® High Throughput System (Kent Scientific Corporation) con el restrictor en la cola de cada uno de los animales. El día del experimento se determinó la presión sistólica y diastólica de los animales realizando al menos 10 mediciones por animal.

4.5.12 Análisis estadístico:

Los resultados se expresaron promedio \pm SD (desviación estándar). Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición experimental. Se realizaron comparaciones entre los distintos grupos experimentales mediante el uso del software GraphPad Prism 6 realizando t-Student no paramétrico para comprar entre los grupos control y HFD. También utilizamos ANOVA de dos vías para las condiciones experimentales F/F y c-VCAM-1-KO, comparado con las condiciones de dieta control y HFD, con test *post hoc* Dunnet o Tukey según corresponda cuando las muestras presentamos distribución normal. También realizamos ANOVA de una vía no paramétrico para experimentos con bajo n y que no cumplen distribución normal de los datos. Se consideró un valor de $p \leq 0,05$ como nivel de significancia.

4.6. Resultados

4.6.1 Objetivo 1: Evaluar si los niveles de expresión de VCAM-1 aumentan en el corazón de ratones con cardiomiopatía inducida por dieta alta en grasa.

Este trabajo se inició realizando los experimentos correspondientes al desarrollo del modelo de cardiomiopatía inducida por obesidad. Para este fin, ratones macho *wild type C57BL/6N*, de 10-12 semanas de edad, se alimentaron con dieta control (Research diet, 10% Kcal fat) o dieta alta en grasas (Research diet, 60% Kcal fat) por 25 semanas. Los animales se revisaron semanalmente para monitorear su peso. La **Figura 3A** muestra que los animales subieron de peso en forma progresiva en las semanas de tratamiento y al finalizar las 25 semanas de suministro de dieta, los animales HFD aumentaron su peso significativamente con respecto al control (**Figura 3B**). Al utilizar la dieta control pareada de la HFD, podemos decir que las diferencias encontradas entre ambas condiciones se deben solamente a la diferencia en grasas que poseen las dietas.

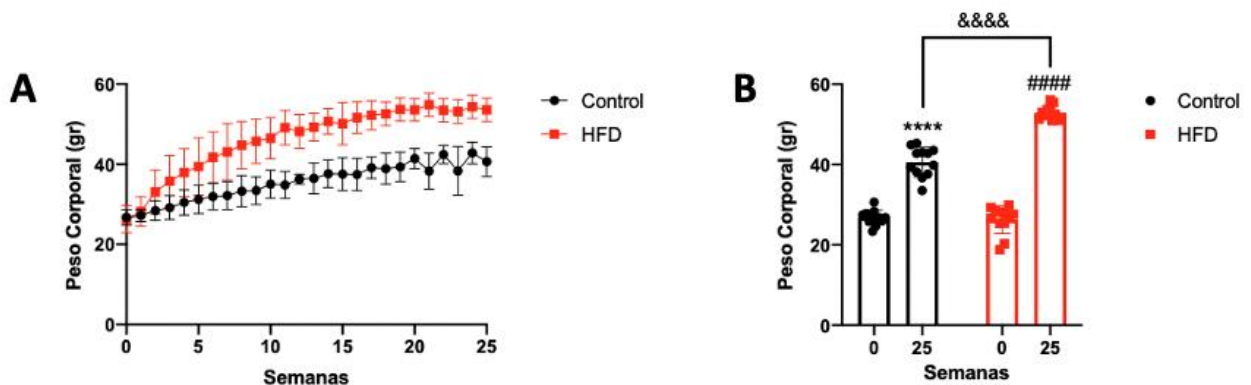


Figura 3: Dieta alta en grasas por 25 semanas de tratamiento induce aumento de peso corporal.

Animales *C57BL/6N* machos de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta alta en grasas (HFD) por 25 semanas. (A) Seguimiento semanal del peso de los animales. (B) Peso de los animales control y HFD al inicio y término del tratamiento. **** $p < 0,0001$, #### $p < 0,001$, &&&& $p < 0,001$ analizado por 2-way ANOVA. $n = 7/14$ animales por grupo.

Adicionalmente, se evaluaron parámetros como la morfología general y el peso de la grasa subcutánea (**Figura 4A**) y epididimal (**Figura 4B**), aumentando significativamente el peso en los animales con HFD con respecto al control solamente en el tejido adiposo subcutáneo. Además, como indicador de lipotoxicidad tisular se determinó la esteatosis hepática mediante morfología con H/E, donde se observó

un aumento significativo de los espacios ópticamente vacíos correspondiente a estructuras asociadas a lípidos en el parénquima hepático, como también un aumento del peso del hígado en comparación al control (**Figura 4C**). Estos resultados indican que los animales alimentados con HFD presentan un aumento significativo de peso corporal, adiposidad y esteatosis hepática comparado con la dieta control, indicando que estos animales presentan un fenotipo obeso (**Figuras 3-4**).

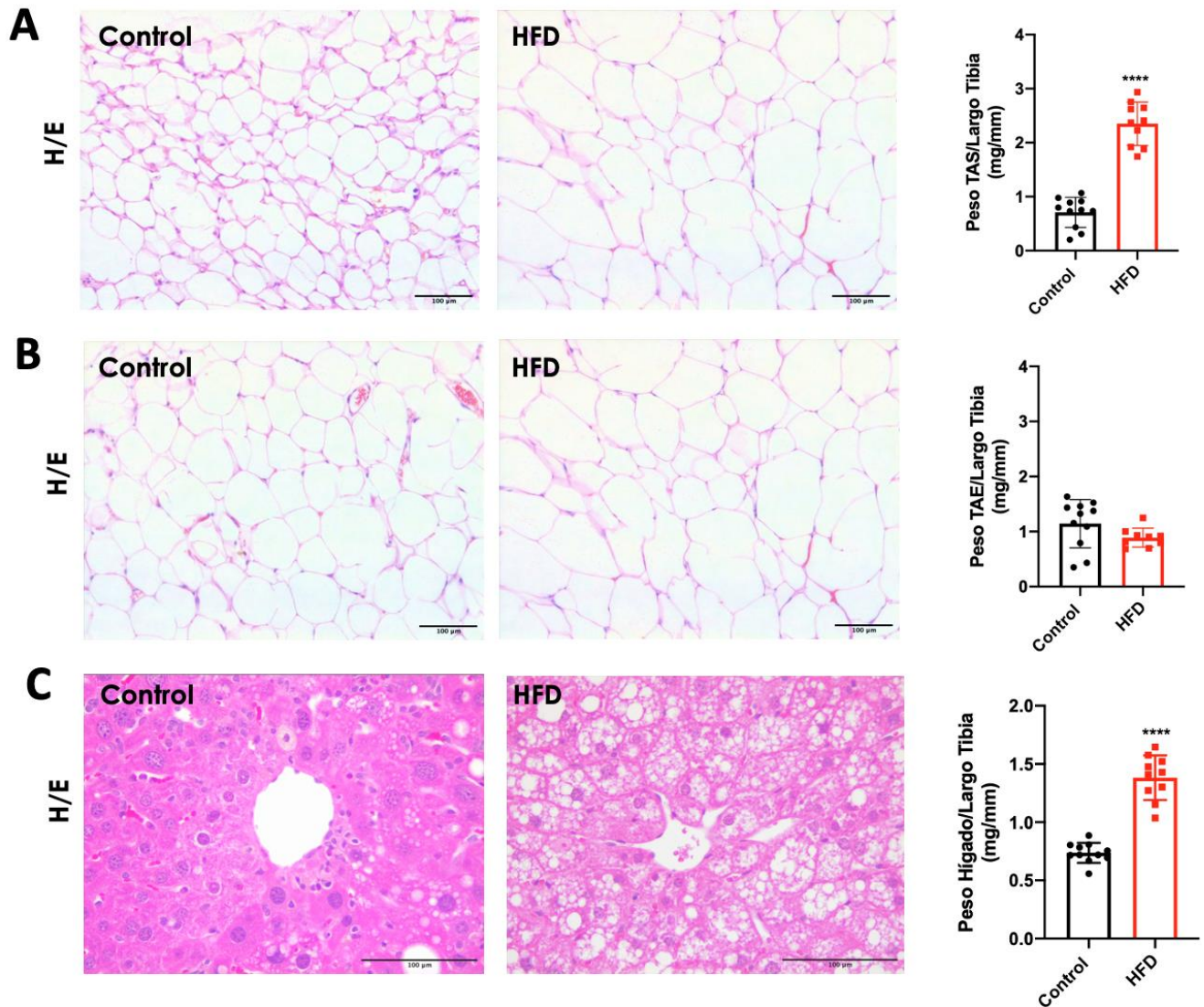


Figura 4: Dieta alta en grasas (25 semanas de tratamiento) induce aumento del peso del tejido adiposo subcutáneo y esteatosis en hígado. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad fueron alimentados con dieta alta en grasas (HFD) por 25 semanas de tratamiento. TAS: tejido adiposo subcutáneo. TAE: tejido adiposo epididimal. Barra 100 μ m. **** $p < 0,0001$ analizado por t-test no paramétrico. $n = 7/14$ animales por grupo.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de test de tolerancia a la glucosa para evaluar el estado metabólico general de los animales. Los animales al inicio del tratamiento no presentaron diferencias en los parámetros medidos, por lo que todos los animales iniciaron con un estatus normal en tolerancia a la glucosa (**Figura suplementaria 1A**). Luego de 5 semanas de tratamiento, los animales HFD presentaron un alza en la curva de glicemia, área bajo la curva y glucosa basal con respecto al control, pero al tiempo final, la glicemia alcanzó los niveles basales correspondientes a cada condición al final del experimento (**Figura suplementaria 1B**). A las 15 semanas, se observó un fenotipo intolerante a la glucosa en los HFD, en donde la glicemia aumentó a las 15 min post-inyección y permaneció alta hasta el final del experimento. Además, el área bajo la curva y glucosa basal permanecen aumentados significativamente en la condición HFD con respecto al control (**Figura suplementaria 1C**). En el tiempo final de experimentación, 25 semanas, los animales con dieta alta en grasa presentaron una mejora con respecto al tiempo de 15 semanas, ya que se observa una curva que regresa a los niveles basales en el tiempo final de medición, sin embargo, los parámetros de área bajo la curva y glucosa basal permanecen siendo significativamente altos en la condición HFD con respecto a la condición control (**Figura 5**), mostrando que a las 25 semanas de HFD los animales son intolerantes a la glucosa.

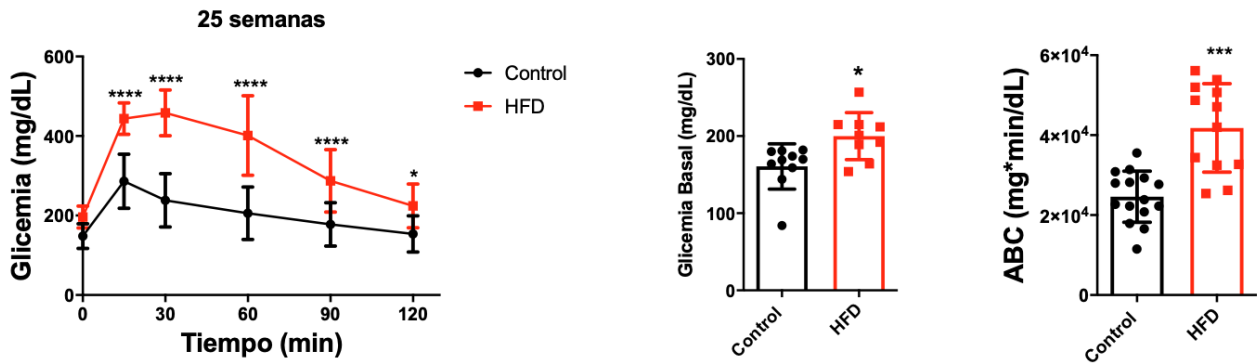


Figura 5: Dieta alta en grasas por 25 semanas induce intolerancia a la glucosa. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta alta en grasas (HFD) durante 25 semanas para luego realizar test de tolerancia a la glucosa a las semanas correspondientes. Los animales se ayunaron por 6 h, se les midió la glicemia basal y luego se administró una carga de glucosa de 1 g/Kg intraperitoneal para medir la glicemia durante 120 min. (A) La curva de glicemia, (B) glicemia basal y (C) área bajo la curva (ABC) se presentan a las 25 semanas (D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ analizado por t-test. $n = 9/15$ animales por grupo.

Estas diferencias mostradas en la figura anterior, se podrían deber a una compensación de insulina por parte del páncreas para sobrellevar el aumento de la glicemia, por lo que al medir la insulinemia, observamos que los animales HFD presentan un aumento significativo de la insulina plasmática y el índice HOMA-IR comparado con la condición control (**Figuras 6A y C**). Para evidenciar el estado metabólico del tejido cardiaco se determinó la fosforilación de AKT en la serina 473, fosforilación que se ve afectada en resistencia a la insulina y diabetes mellitus, disminuyendo sus niveles de fosforilación en comparación a la condición control con un pulso de insulina [37]. Nuestros resultados muestran que bajo un pulso de insulina por 15 min, los niveles de pAKT aumentaron significativamente en los ratones controles, no así los alimentados con HFD (**Figura 6D**), indicando que los animales tratados con dieta alta en grasa presentan un fenotipo de intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en el corazón, respectivamente.

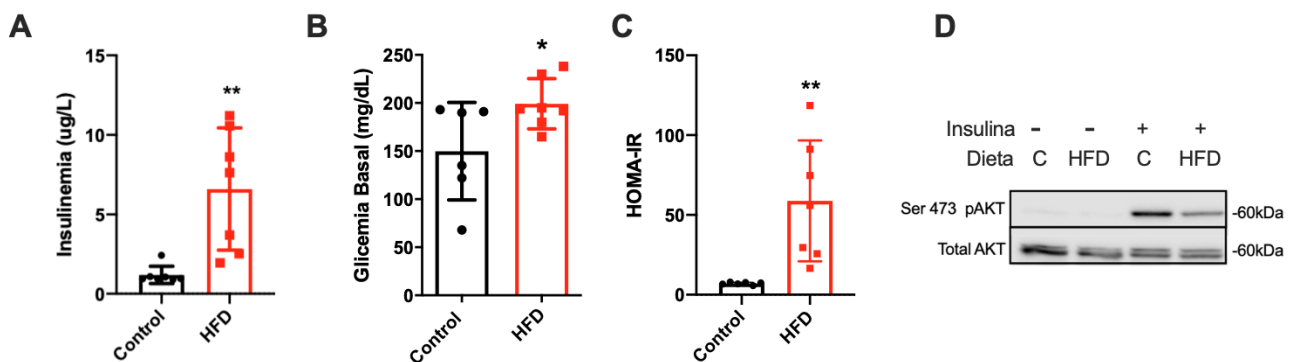


Figura 6: Dieta alta en grasas por 25 semanas induce hiperinsulinemia, aumento del índice HOMA-IR y resistencia a la insulina en corazón. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta alta en grasas (HFD) durante 25 semanas para luego realizar test de tolerancia a la glucosa a las semanas correspondientes. **(A)** Se obtuvo el plasma para la determinación de insulinemia mediante kit ELISA, **(B)** Glicemia basal en sangre completa y **(C)** HOMA-IR. **(D)** Se realizó un estímulo de insulina por 15 min antes del sacrificio de los animales previamente ayunados y se obtuvo un lisado de corazón completo para evaluar los niveles proteicos de pAKT Ser 473. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ analizado por t-test no paramétrico. $n = 7/10$ animales por grupo.

Posteriormente, se evaluó la morfología del corazón en cortes histológicos mediante la tinción de H/E (**Figura 7A**), y evaluación del área y perímetro de los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo mediante la tinción WGA (**Figuras 7 B-D**) aumentando significativamente con respecto a los animales con dieta control. Además, macroscópicamente y en las vistas *2-chamber view* y *4-chamber view* los corazones se

observan más grandes en las condiciones HFD (**Figura 7E**) y presentan un aumento del peso del corazón relativizado por el largo de la tibia (**Figura 7F**). Todos los parámetros muestran que los animales alimentados con dieta alta en grasas por 25 semanas presentan hipertrofia cardiaca.

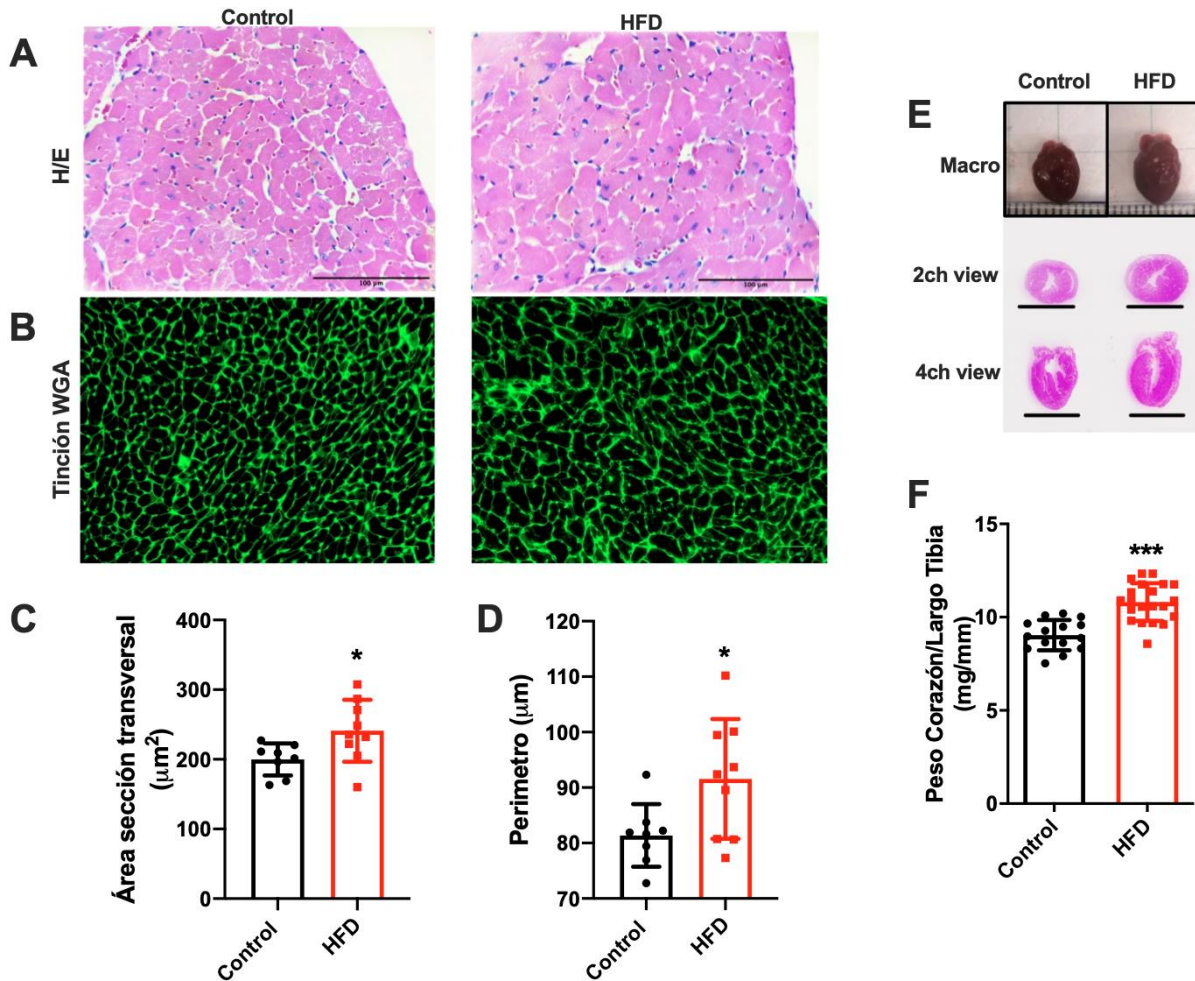


Figura 7: Dieta alta en grasas (25 semanas de tratamiento) induce hipertrofia cardiaca. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad fueron alimentados con dieta alta en grasas (HFD) por 25 semanas. (A) Imágenes representativas de la tinción H/E. (B) Imágenes representativas de la tinción WGA y la determinación de (C) área de sección transversal y (D) perímetro. (E) Imágenes macroscópicas del corazón completo, 2-chamber-view y 4-chamber-view. (F) Peso del corazón normalizado por el largo de la tibia. Barra negra 100 μm , barra blanca 50 μm . * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ analizado por t-test no paramétrico. $n = 7/14$ animales por grupo.

Para evaluar la función cardiaca se realizaron ecocardiografías transtorácicas de los animales a las 25 semanas de tratamiento. Se evaluó la función diastólica de los animales. Las imágenes muestran dos

peaks correspondiente a la onda E, producida por la velocidad de llenado isovolumétrico del ventrículo izquierdo; y la Onda A, producida por la velocidad de llenado del ventrículo izquierdo producto de la contracción auricular (**Figura 8A**). Se determinó velocidad de la onda E (**Figura 8C**) sin cambios entre las condiciones. No se observaron diferencias en la onda A ni relación E/A (**Figura suplementaria 7**). Además, se tomaron imágenes en el modo Doppler Tisular para obtener la velocidad de llenado isovolumétrico del corazón dependiente de la función tisular (**Figura 8B**), parámetro que se utiliza como indicador de disfunción diastólica en la relación E/E' [38]. Se cuantificó el *peak* obtenido correspondiente a la onda E' (**Figura 8D**) y se determinó el índice E/E' (**Figura 8E**), no obteniendo cambios significativos entre las condiciones experimentales. Basados en estos resultados nuestro modelo de cardiomiopatía inducida por obesidad no presenta disfunción diastólica.

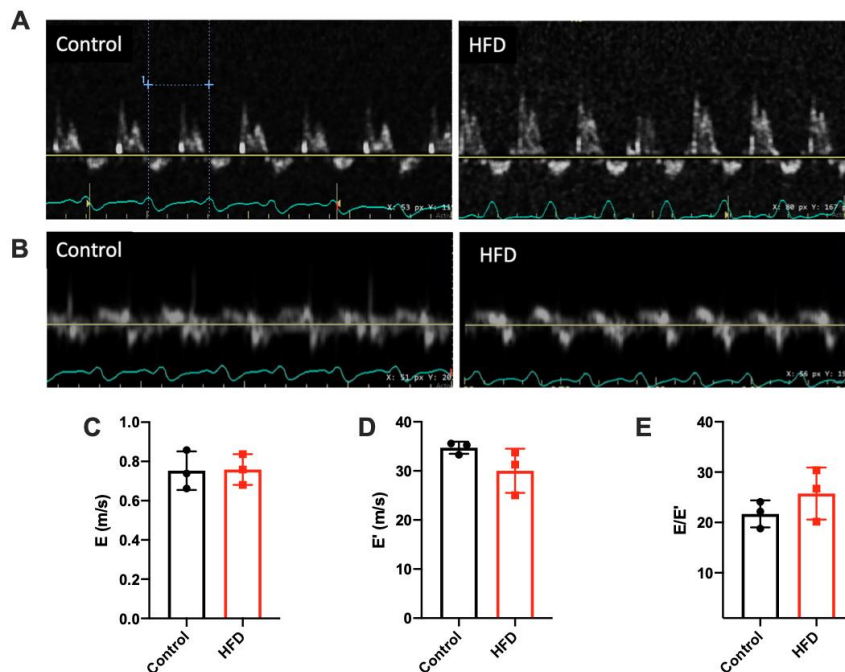


Figura 8: Dieta alta en grasas por 25 semanas de tratamiento no produce disfunción diastólica. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta alta en grasas (HFD) por 25 semanas de tratamiento para luego realizar ecocardiografía con animales anestesiados. (A) Imagen modo Doppler y (B) Doppler tisular para obtener curvas de velocidades de flujo sanguíneo como la onda E de llenado rápido (C), onda E' (D) y la razón entre ambas E/E' como indicador de disfunción diastólica (E). n=3 animales por grupo. No se realizó análisis estadístico por falta de experimentos independientes.

Para la evaluación de la función sistólica se obtuvieron imágenes en Modo M (**Figura 9A**) y se determinó la fracción de acortamiento y fracción de eyección, donde los animales HFD no presentaron cambios con respecto al control (**Figura 9B, C**). Además, estos animales no presentaron cambios en el grosor de la

pared anterior (**Figura 9D**), ni grosor de la pared posterior de los animales HFD con respecto al control (**Figura 9E**), ni en el diámetro del ventrículo izquierdo en sístole y diástole (**Figura suplementaria 8**). Estos resultados indican que los animales alimentados con HFD por 25 semanas presentan un fenotipo hipertrófico con función sistólica preservada.

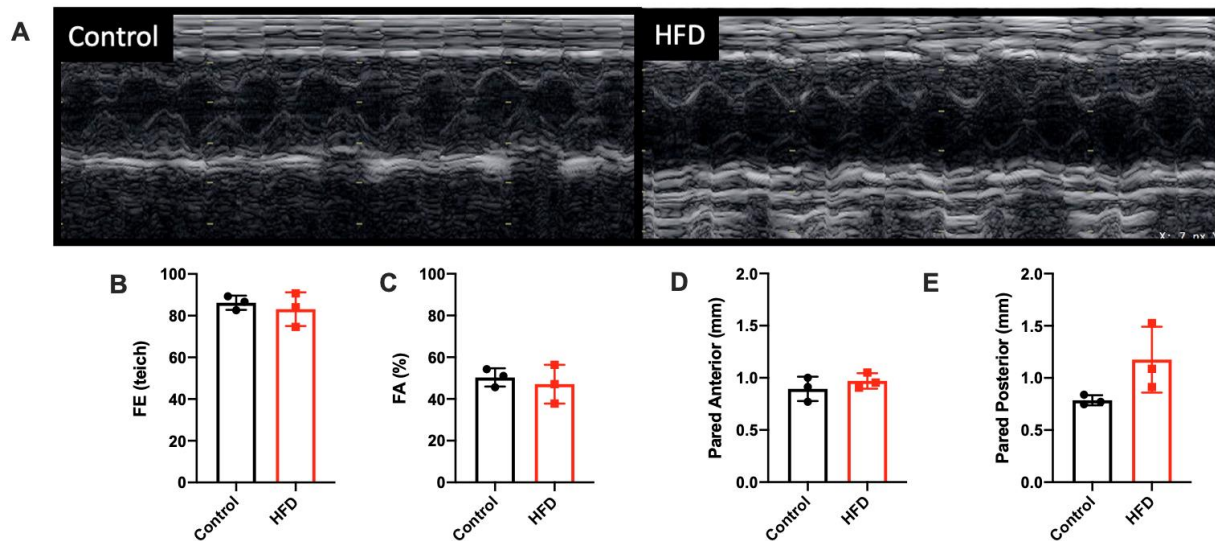


Figura 9: Dieta alta en grasas por 25 semanas de tratamiento mantiene una función sistólica preservada. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta alta en grasas (HFD) por 25 semanas de tratamiento para luego realizar ecocardiografía con animales despiertos y previamente anestesiados para la medición. (A) Imágenes representativas de la ecocardiografía Modo M, (B) Fracción de eyección, (C) Fracción de acortamiento, (D) Grosor de la pared anterior, (E) grosor de la pared posterior. n=3 animales por grupo. No se realizó análisis estadístico por falta de experimentos independientes.

A continuación, se determinaron los niveles de expresión génica y niveles proteicos de VCAM-1 en las muestras de tejido cardiaco total en los animales alimentados con dieta alta en grasas por 25 semanas. Los resultados muestran un aumento significativo de los niveles de mRNA de VCAM-1 en animales HFD con respecto al control (**Figura 10A**), sin cambios en los niveles proteicos de VCAM-1 (**Figura 10B**). Los partidores utilizados para la determinación génica de VCAM-1 reconocen una secuencia correspondiente al exón 7 y exón 8 (**Figura Suplementaria 2**), por lo que estaría reconociendo la variante de splicing de 7 dominios de inmunoglobulina (**Figura 1**). La generación de pares de partidores de VCAM-1 específico para las variantes de splicing podría aportar información adicional sobre la síntesis de VCAM-1 por parte de las células presentes en el corazón y otros tejidos.

Por otro lado, el anticuerpo de VCAM-1 utilizado reconoce los últimos 13 aminoácidos del C-terminal de la proteína VCAM-1 (**Figura suplementaria 3**), reconociendo teóricamente ambas isoformas de VCAM-1 presente en ratón. Sin embargo, debido a la estandarización del anticuerpo por parte de la empresa y nuestro laboratorio, solamente podemos observar con certeza la banda de 100 kDa correspondiente a la isoforma completa de VCAM-1, pero también se observa una banda desconocida en 37 kDa aproximadamente (**Figuras Suplementarias 3 y 4**). La empresa abcam validó el anticuerpo de VCAM-1, donde observa la especificidad de la banda de 100 kDa, ya que no se observa en células knock out. Sin embargo, las células knock out si presentan la banda en 37 kDa, mostrando que esta banda es inespecífica (**Figura Suplementaria 5**).

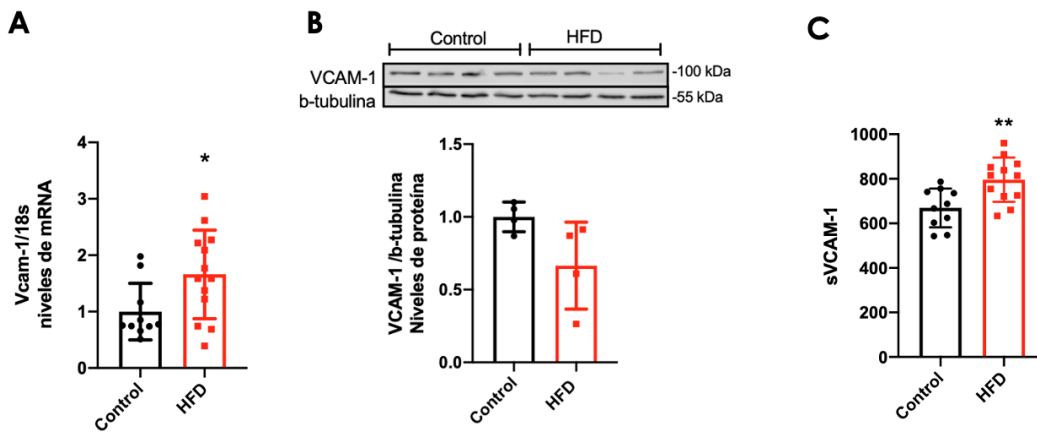


Figura 10: Los niveles cardiacos de mRNA de Vcam-1 y sVCAM-1 plasmáticos aumentan en animales wild type alimentados con dieta alta en grasas por 25 semanas. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta alta en grasas (HFD) durante 25 semanas de tratamiento para luego obtener un lisado de corazón completo para evaluar los niveles cardiacos de mRNA de Vcam-1 mediante RT-qPCR (**A**), proteicos cardiacos de VCAM-1 por Inmuno-blot (**B**). Los niveles plasmáticos de la proteína de VCAM-1 soluble (sVCAM-1) se midieron mediante kit ELISA (**C**). n=4/16 animales por grupo. *p<0,05, **p<0,01 analizado por t-test no paramétrico.

Además, se determinaron los niveles de sVCAM-1 en muestras de plasma, observando que animales HFD aumentan los niveles de la proteína sVCAM-1 respecto al control (**Figura 10C**). La utilización de anticuerpos VCAM-1 que reconozcan como antígeno secuencias específicas de las variantes de splicing podría complementar estos resultados, ya que no podemos concluir por completo acerca de los niveles de VCAM-1 en el corazón si no detectamos todas las isoformas. El kit ELISA utilizado en este trabajo

no informa el antígeno que reconoce, pero según la información recopilada con los fabricantes, se podría deber a la conformación de 7 dominios de inmunoglobulina, reconociendo el dominio N-terminal entre los aminoácidos Phe25-Glu698 (**Figura Suplementaria 6**).

4.6.2. Objetivo 2: Determinar el papel de VCAM-1 en la función y estructura cardiaca en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.

Para abordar este objetivo se utilizó como estrategia experimental el uso de ratones *knockout* cardiomiocito específicos para VCAM-1 (c-VCAM-1-KO). Estos animales presentan una sección del gen VCAM-1 floxeado con regiones Lox-P (F/F), sección que es removida por la proteína Cre que se encuentra bajo el promotor de α -MHC (alpha-myosin heavy chain), proteína específica del corazón. Por lo tanto, los animales KO deben presentar en su genotipo tanto la región F/F como la recombinasa Cre. Los animales F/F utilizados como control deben presentar la región F/F y ausencia de la recombinasa Cre. Se realizaron genotipificaciones (**Figura 11A**) para determinar los grupos experimentales (**Figura 11B**). Además, se evaluó la supervivencia de los animales durante las semanas de dieta, no observando diferencias significativas entre los grupos experimentales (**Figuras 11C y D**).

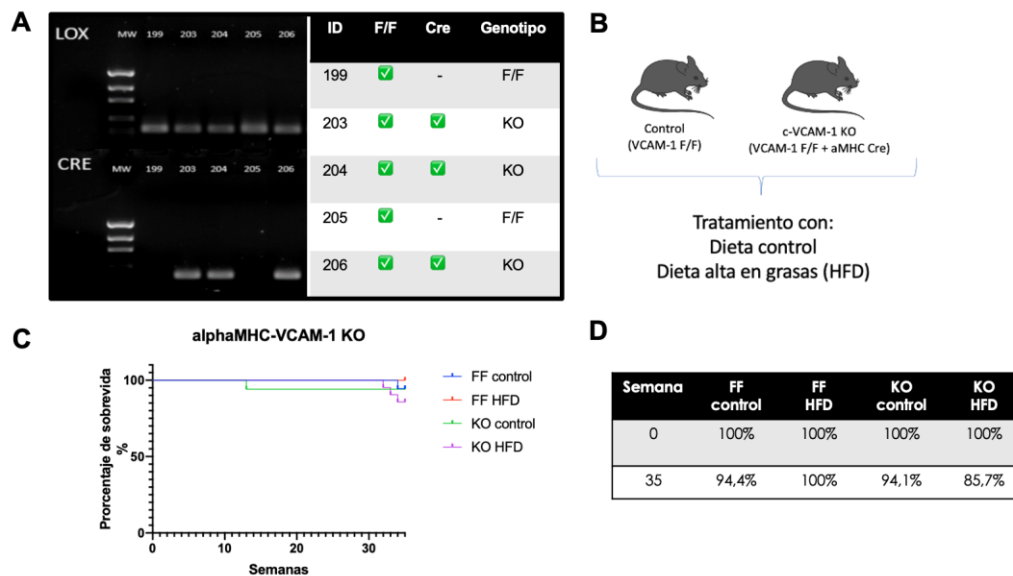


Figura 11: Generalidades animales alphaMHC-VCAM-1-KO. (A) Genotipificación por PCR convencional para la secuencia LOX-P y CRE. (B) Animales machos VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD) para realizar los futuros experimentos. (C) Curva de kaplan-meier para los animales en experimentación. (D) Porcentaje de supervivencia de animales en protocolo. n=16/18. No hay diferencia significativa entre grupos.

Para evaluar el papel de VCAM-1 en la cardiomiopatía inducida por obesidad, se determinaron los niveles de mRNA de VCAM-1 en muestras de corazón completo, no observando cambios significativos en su expresión (**Figura 12A**), resultado contrario a lo que observamos en los animales *wild type* HFD, donde si observamos un aumento del transcrito de VCAM-1. Además, se midieron los niveles proteicos de VCAM-1 en muestras de corazón mediante Inmuno-blot, observando que los animales F/F HFD y c-VCAM-1-KO HFD presentan aumentos significativos con respecto a sus condiciones controles, sin embargo, no se observan cambios significativos entre las condiciones HFD (**Figura 12B**). Estos resultados no muestran la ausencia de VCAM-1 en los cardiomiocitos provenientes de animales c-VCAM-1-KO, sin embargo, el corazón presenta además de los cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales, células vasculares musculares lisas y células inflamatorias, las que podrían estar expresando VCAM-1 observados en estos lisados totales. Al realizar una inmunohistoquímica (IHQ) en los animales F/F HFD, logramos discriminar cardiomiocitos de otros tipos celulares, observando una marca positiva de VCAM-1, localizado en el citoplasma de los cardiomiocitos. Este inmuno-marcaje no se observa en las muestras de corazón provenientes de corazones con el genotipo c-VCAM-1 KO HFD (**Figura 12C**). Estos resultados muestran que VCAM-1 está expresado en condiciones de HFD en cardiomiocitos, pero está ausente en c-VCAM-1-KO HFD, validando nuestro modelo.

Además, VCAM-1 es susceptible a shedding y liberación de sVCAM-1 al intersticio, por lo que se determinaron los niveles plasmáticos solubles de la proteína VCAM-1 (sVCAM-1) (**Figura 13**), observando un aumento de los niveles sVCAM-1 en los animales F/F HFD con respecto al control, no así en los animales c-VCAM-1-KO control y HFD. Además, los animales c-VCAM-1-KO HFD presentaron una disminución significativa de sVCAM-1 con respecto a la condición HFD F/F, indicando que los niveles de VCAM-1 aumentados en HFD dependen de la expresión de VCAM-1 en los cardiomiocitos. No se vieron afectadas las condiciones con dieta control en ambas condiciones experimentales (F/F y c-VCAM-1-KO).

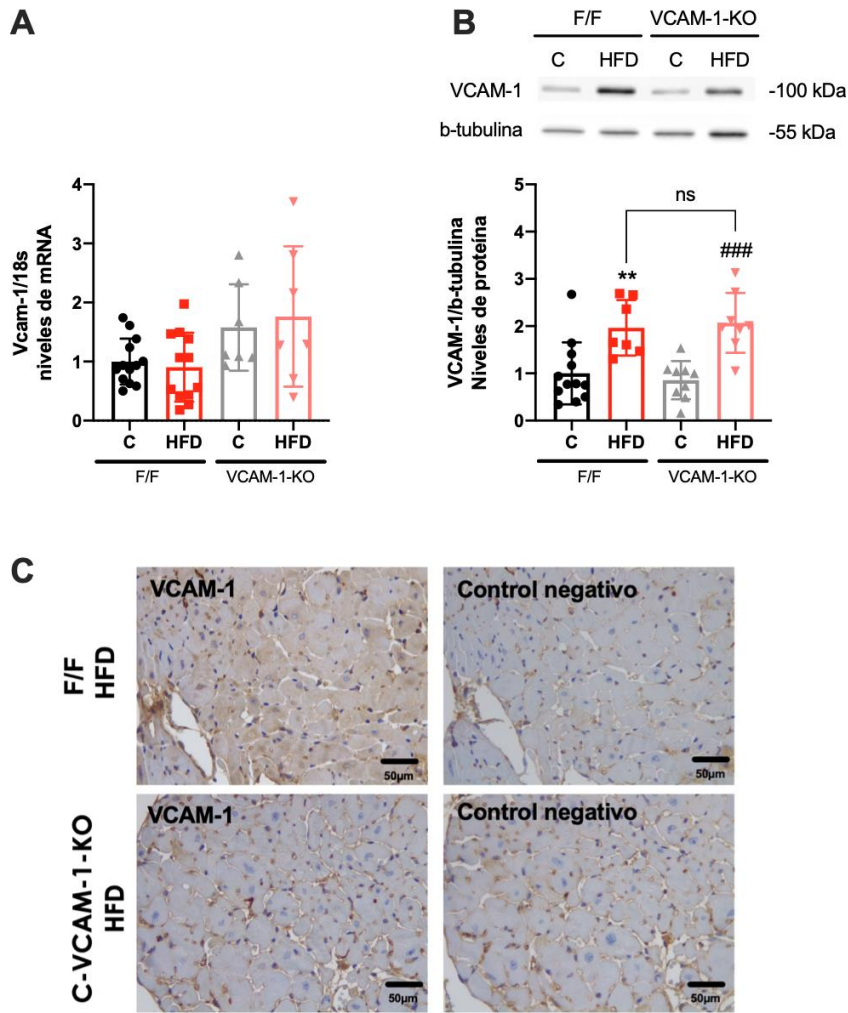


Figura 12: Niveles cardiacos de VCAM-1 no aumentan en ratones c-VCAM-1-KO condiciones de HFD por 25 semanas. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). Niveles cardiacos de (A) mRNA para Vcam-1 mediante RT-qPCR. (B) Niveles cardiacos de proteína VCAM-1 mediante Inmuno-blot. (C) Inmunohistoquímica para VCAM-1 en cortes histológicos de corazón. n=6/13 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2 way-ANOVA. **p<0,01 comparado con F/F Control. ###p<0,001 comparado con VCAM-1-KO Control.

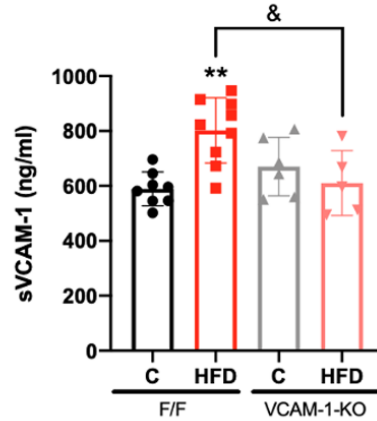


Figura 13: Niveles plasmáticos de la proteína sVCAM-1 dependen de la expresión de VCAM-1 en el cardiomiocito. Animales machos *C57BL/6N* VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD) por 25 semanas. Se determinaron los niveles plasmáticos de sVCAM-1 a las 25 semanas de dieta en las 4 condiciones experimentales mediante kit ELISA. n=6/9 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. **p<0,01 comparado con F/F Control, &p<0,05 comparando F/F HFD con VCAM-1-KO HFD.

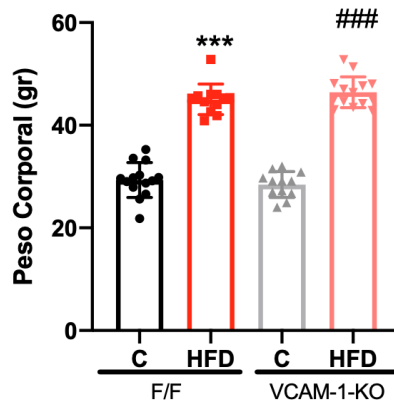


Figura 14: c-VCAM-1-KO incrementa el peso corporal en animales alimentados con HFD al igual que los animal F/F HFD. Animales machos VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de dieta se registró el peso corporal. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA, ***p<0,001 comparado con el F/F control, ###p<0,001 comparado con el VCAM-1-KO control.

Adicionalmente, los animales c-VCAM-1-KO aumentaron el peso corporal significativamente con respecto al control (**Figura 14**), pero sin diferencia entre las condiciones HFD. Además, ambas condiciones HFD aumentan el tamaño de los adipocitos y el peso del tejido adiposo subcutáneo (**Figuras 15 A y B**). Sin embargo, hay un aumento significativo del peso del tejido epididimal solamente en la condición c-VCAM-1-KO HFD (**Figuras 15 C y D**), sugiriendo que este animal además de la obesidad subcutánea, presenta obesidad visceral, característica que se relaciona con resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y riesgo cardiovascular [39]. Seguido a esto, evaluamos el hígado como principal tejido blanco de lipotoxicidad tisular, observando que ambas condiciones HFD presentan esteatosis (**Figura 16A**) y aumento en el peso del hígado (**Figura 16B**), sin diferencias entre ellas.

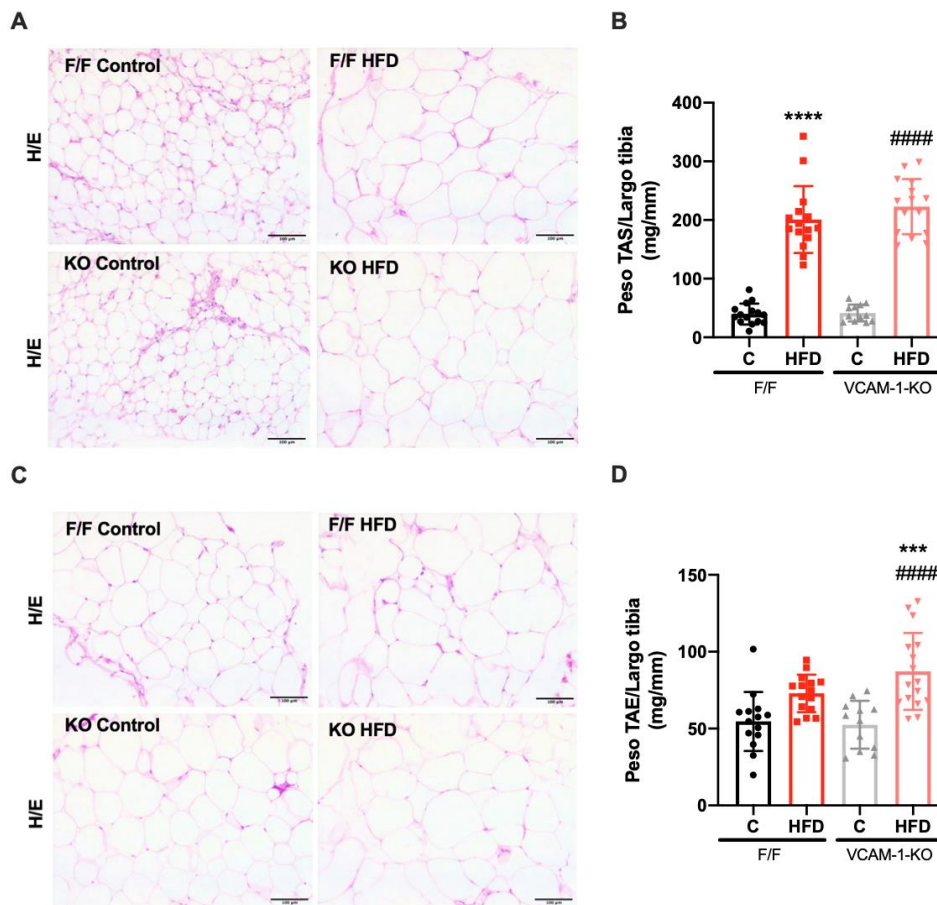


Figura 15: c-VCAM-1-KO HFD incrementa el peso del tejido epididimal. Animales machos VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de dieta se determinó la histología general por H/E y peso normalizado por el largo de la tibia de Tejido adiposo subcutáneo: TAS (**A y B**) y Tejido adiposo epididimal: TAE (**C y D**). n=12/15 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. ***p<0,001, ****p<0,0001 comparado con F/F Control; ####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control.

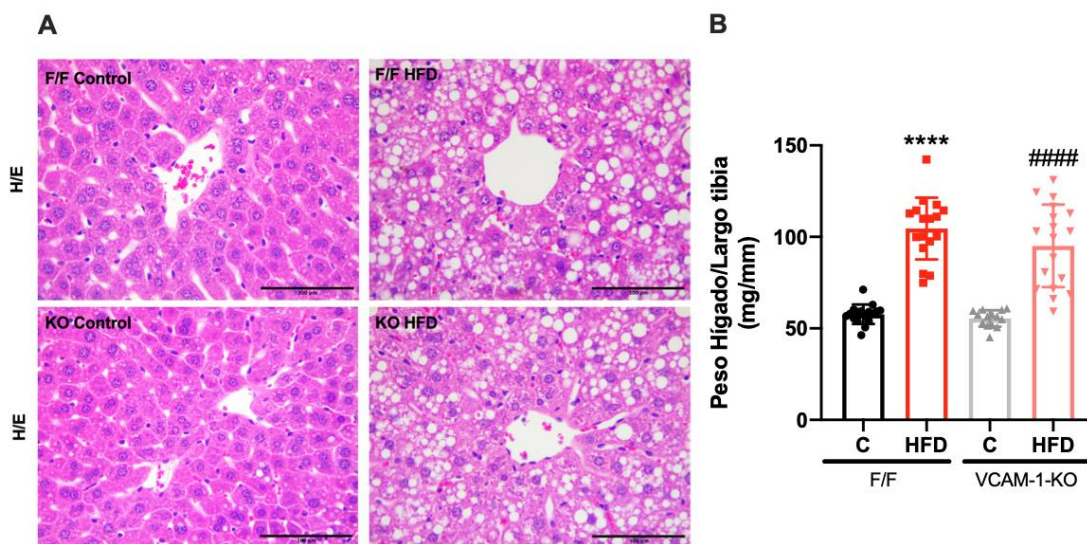


Figura 16: c-VCAM-1-KO HFD presenta esteatosis hepática al igual que el F/F HFD. Animales machos VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de dieta se determinó la (A) histología general por H/E y (B) peso del hígado normalizado por el largo de la tibia. n=12/15 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA, ****p<0,0001 comparado con F/F Control; ####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control.

Determinamos también el peso de órganos, tales como pulmón, bazo, riñón y páncreas para evidenciar si los c-VCAM-1-KO presentaban diferencias bajo el estímulo de dieta alta en grasas. Sorprendentemente, solo el pulmón presentó un aumento diferencial en el c-VCAM-1-KO HFD con respecto al c-VCAM-1-KO dieta control (**Figura 17**), sugiriendo la presencia de daño a nivel pulmonar debido a la función cardiovascular deteriorada de los c-VCAM-1-KO HFD. Los demás tejidos aumentaron el peso en ambas condiciones HFD, sin diferencias entre ellas (**Figura 18**), por lo que su efecto solo se debe a la dieta alta en grasas y no al genotipo.

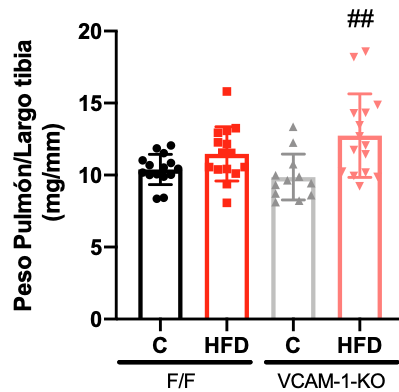


Figura 17: c-VCAM-1-KO incrementa el peso del pulmón en condiciones de HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se registró el peso del pulmón normalizado por la tibia. n=12/15 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2 way-ANOVA. ##p<0,01, comparado con VCAM-1-KO Control.

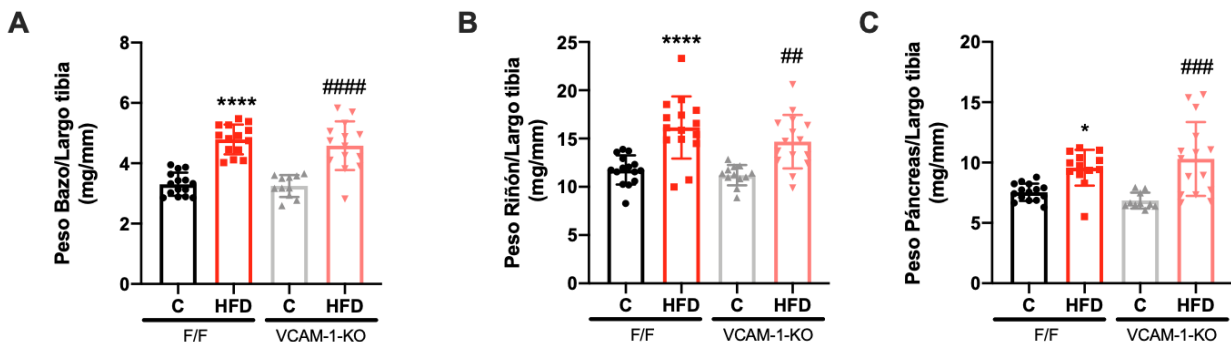


Figura 18: c-VCAM-1-KO HFD no incrementa el peso de bazo, riñón y páncreas en comparación a los animales F/F HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se registró el peso de los órganos incluyendo: (A) Bazo, (B) Riñón (C) Páncreas. n=12/15 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. *p<0,05, ****p<0,0001 comparado con F/F Control; ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control.

Para determinar la hipertrofia cardíaca en este modelo, se determinó mediante cortes histológicos la morfología general del corazón (**Figura 19**), observando que los animales c-VCAM-1-KO HFD presentan una gran desorganización del parénquima cardíaco, con células de distinto tamaño destacando las hipertrofiadas, estructuras fibrilares sugerentes de fibrosis, células muertas con pérdida de la integridad de membrana y morfología, como también la presencia de núcleos hipercromáticos entre los cardiomiocitos, los que podrían corresponder a células inflamatorias. Posteriormente, se determinó el área de la sección transversal de los cardiomiocitos ventriculares determinada por tinción de WGA (**Figura 20**) y la fibrosis por PSR (**Figura 21**), observando un aumento significativo de ambos parámetros en la condición c-VCAM-1-KO HFD con respecto a sus controles y un aumento significativo en la condición c-VCAM-1-KO HFD con respecto a F/F HFD. Estos datos sugieren que la ausencia de VCAM-1 en cardiomiocitos produce una hipertrofia y fibrosis exacerbada en condiciones HFD. Además, observamos imágenes macroscópicas, 2-chamber view y 4-chamber view con una clara hipertrofia en c-VCAM-1-KO HFD (**Figura 22A**). Finalmente, la determinación del peso del corazón normalizado por la tibia demostró un aumento significativo en ambas condiciones HFD con respecto a sus controles, y un aumento significativo entre el peso del corazón del animal c-VCAM-1-KO HFD con respecto al animal F/F HFD (**Figura 22B**), mostrando que la ausencia de VCAM-1 en cardiomiocitos incrementa el tamaño del corazón en condiciones de HFD. Resultado contrario a lo planteado en la hipótesis, ya que la falta de VCAM-1 promueve el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

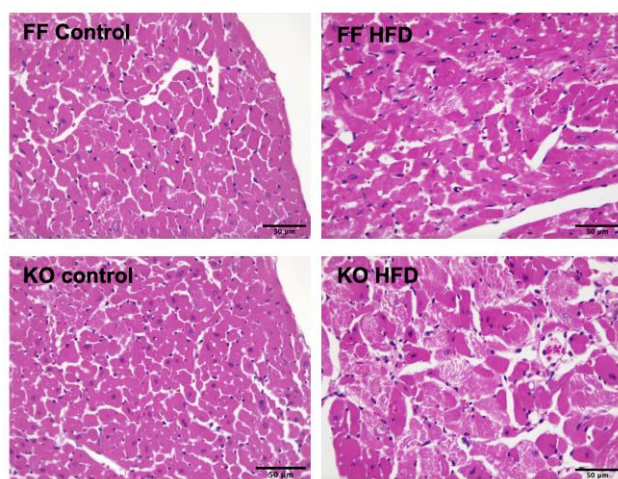


Figura 19: c-VCAM-1-KO altera la morfología normal del corazón en animales alimentados con HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizaron tinciones de H/E para evaluar la morfología general.

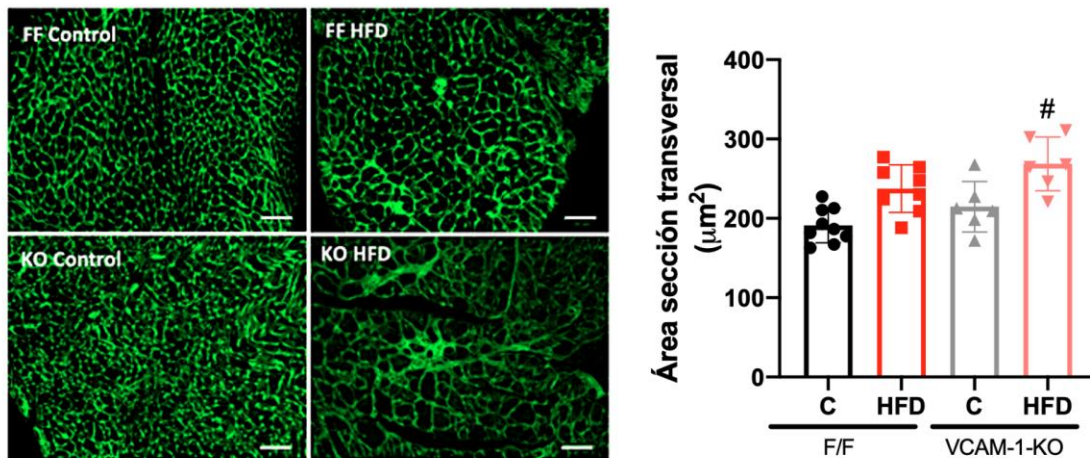


Figura 20: c-VCAM-1-KO incrementa el área de sección transversal del cardiomiocito en animales alimentados con HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se determinó el área de la sección transversal de los cardiomiocitos mediante la tinción WGA. Barra blanca 50 µm. n=6/9 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. #p<0,05 comparado con VCAM-1-KO Control.

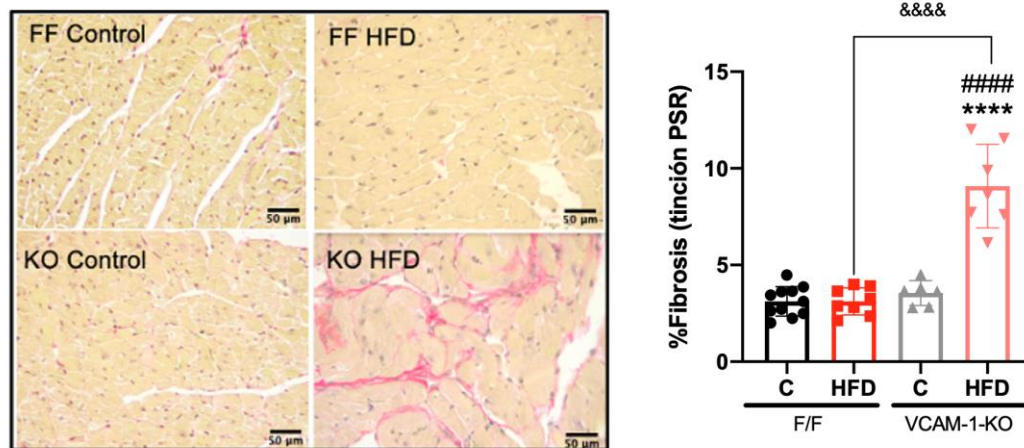


Figura 21: c-VCAM-1-KO incrementa la fibrosis en animales alimentados con HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se determinó el área de la sección transversal de los cardiomiocitos mediante la tinción WGA. Barra negra 50 µm. n=6/9 animales por grupo. Los datos se analizaron por 2 way-ANOVA. ****p<0,0001 comparado con F/F Control, #####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control, &&&&p<0,0001 comparando F/F HFD con VCAM-1-KO HFD.

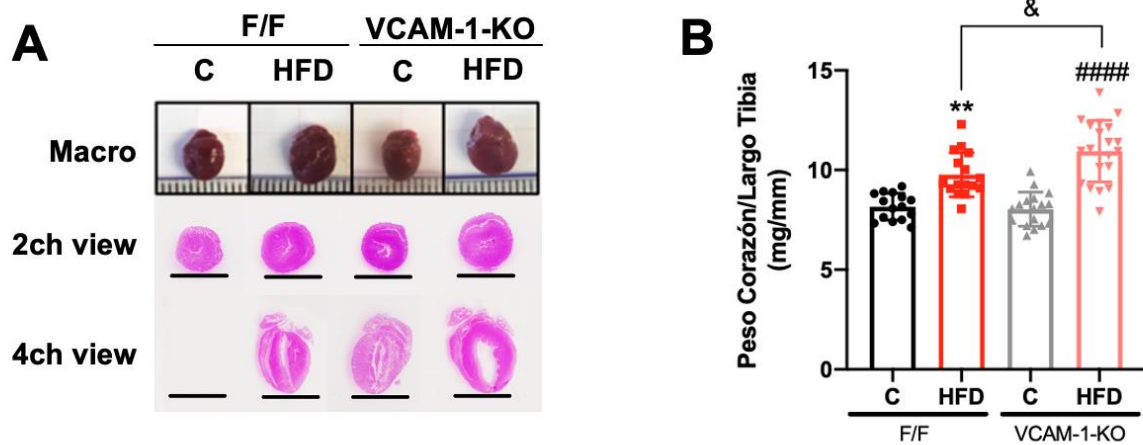


Figura 22: c-VCAM-1-KO incrementa el peso del corazón en animales alimentados con HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se presentan imágenes macroscópicas del corazón, cortes “2-chamber view” y cortes “4-chamber view”, barra 50 μ m (A). Se determinó el peso del corazón normalizado por el largo de la tibia (B). n=13/20 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2 way-ANOVA. **p<0,01 comparado con F/F control, #####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control, &p<0,05 comparado con el F/F HFD.

Para evaluar la función cardiovascular se determinó la función diastólica y sistólica por ecocardiografía. Las imágenes tomadas en modo Doppler para evaluar disfunción diastólica no mostraron cambios en los parámetros: ondas E, A y relación E/A (Figura 23A, C; Figura suplementaria 9), pero si encontramos una disminución significativa de la onda E` (Figura 23B, D) y un aumento significativo en la E/E` en los animales c-VCAM-1-KO HFD con respecto al c-VCAM-1-KO con dieta control (Figura 23E), indicando que los animales c-VCAM-1-KO HFD presentan disfunción diastólica validada por el aumento de la relación E/E`.

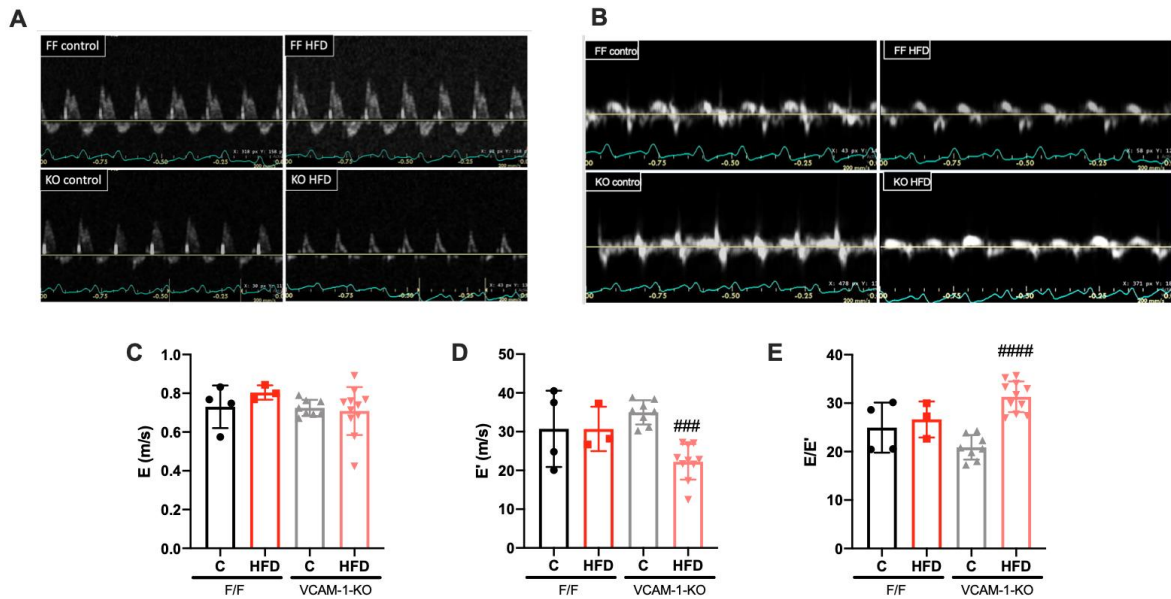


Figura 23: c-VCAM-1-KO produce disfunción diastólica en animales alimentados con HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizaron ecocardiografías en animales anestesiados con una frecuencia cardíaca entre 400-450 latidos por minuto. **(A)** Imágenes representativas de la ecocardiografía modo Doppler, **(B)** Imágenes representativas de la ecocardiografía modo Doppler Tisular, **(C)** Onda E, **(D)** Onda E', **(E)** Relación E/E'. n=3/11 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. ###p<0,001, ####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control.

Para evaluar la función sistólica se tomaron imágenes en modo M del ecógrafo para cuantificar los parámetros de función sistólica (**Figura 24A**). Los datos muestran que tanto la fracción de eyección (**Figura 24B**) y fracción de acortamiento (**Figura 24C**) están disminuidas en los ratones c-VCAM-1-KO HFD con respecto al c-VCAM-1-KO control. No encontramos diferencia significativa en el grosor de las paredes anterior y posterior del ventrículo izquierdo (**Figura Suplementaria 10**). Estos resultados indican que los animales c-VCAM-1-KO HFD presentan disfunción sistólica y podrían estar presentando insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (HFrEF, por sus siglas en inglés Heart Failure with Reduced Ejection Fraction). Esto se relaciona a los datos mostrados del peso de pulmón aumentado (**Figura 17**), que se podría correlacionar a un edema pulmonar producido por la congestión pulmonar generada por la alteración de la función diastólica y sistólica del corazón [40].

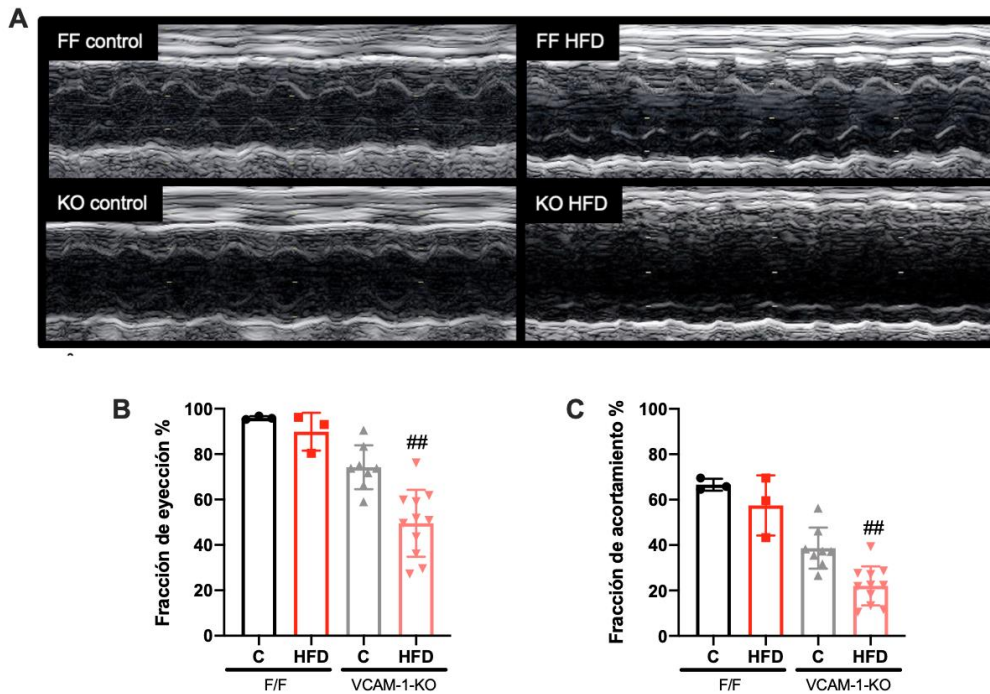


Figura 24: c-VCAM-1-KO produce disfunción sistólica en animales alimentados con HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizaron ecocardiografías en animales despiertos previamente entrenados para realizar las mediciones. (A) Imágenes representativas de la ecocardiografía Modo M, (B) Fracción de eyección, (C) Fracción de acortamiento. n=3/11 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 comparado con VCAM-1-KO Control.

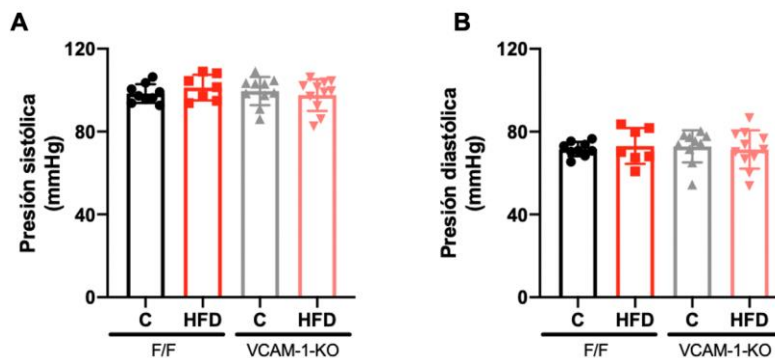


Figura 25: Los ratones c-VCAM-1-KO no presentan cambios en las presiones sistólica y diastólica por la administración de la HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizaron mediciones de presión arterial mediante restrictor y detector en la cola de los ratones. (A) Presión sistólica y (B) Presión diastólica. n=7/11 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA.

También realizamos experimentos para determinar la presión arterial de los animales, debido a que el fenotipo de cardiomiopatía inducida por obesidad/cardiomiopatía diabética debe ser independiente de presión arterial [41]. No observamos cambios significativos en la presión sistólica ni diastólica para las condiciones experimentales evaluadas (**Figura 25**).

Además, para evaluar el comportamiento de los animales frente a un estrés de alta demanda de energía y función cardiovascular, realizamos los *tests* de tolerancia al ejercicio para determinar la distancia recorrida en metros, mostrando que ambas condiciones HFD presentan una disminución en la tolerancia al ejercicio con respecto a sus controles. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre ambas HFD condiciones comparando todas las condiciones (**Figura 26A**). Al separar los datos y analizarlos por t-test no paramétrico, observamos que las condiciones con dieta control no presentan cambios entre ellas (**Figura 26B**), pero si observamos una diferencia significativa entre las condiciones con dieta HFD, disminuyendo la distancia corrida en los animales c-VCAM-1-KO HFD con respecto a los F/F HFD (**Figura 26C**).

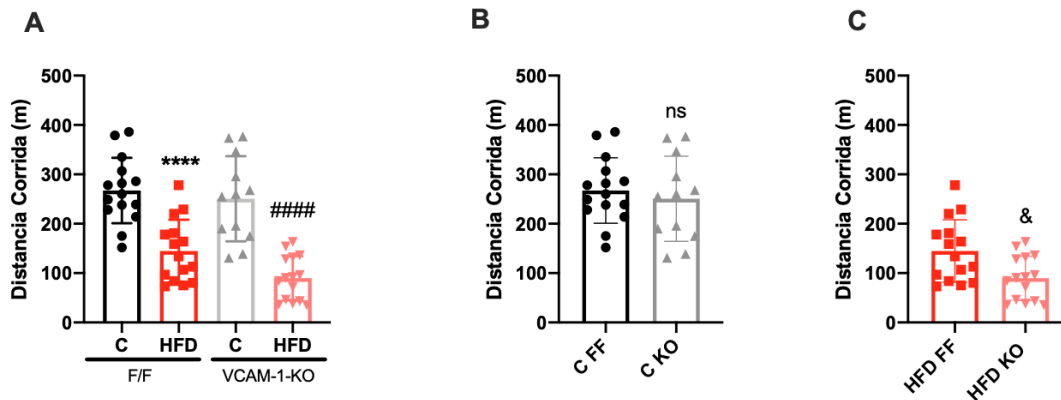


Figura 26: c-VCAM-1-KO HFD presentan intolerancia al ejercicio. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizó el test de tolerancia al ejercicio. **(A)** Distancia corrida con todas las condiciones experimentales. Los datos se analizaron por 2way-ANOVA, **** $p < 0,0001$ comparado con F/F Control; #### $p < 0,0001$ comparado con VCAM-1-KO Control, $n = 12/15$. **(B)** Distancia corrida solo en condiciones control y análisis por t-test **(C)** Distancia corrida solo en condiciones HFD y análisis por t-test, & $p < 0,05$ comparando F/F HFD con VCAM-1-KO HFD.

Con los resultados presentados desde la **Figura 19** a la **Figura 26** demostramos que los animales c-VCAM-1-KO HFD presentan un fenotipo de insuficiencia cardiaca con fracción de eyección reducida, disfunción diastólica, fibrosis ventricular e hipertrofia cardiaca, independiente de hipertensión e intolerante al ejercicio, sugiriendo que VCAM-1 juega un papel fundamental en la homeostasis del corazón en condiciones de estrés, ya que al no estar presente en los cardiomiocitos de los animales c-VCAM-1-KO sometidos a dieta alta en grasa, empeora el fenotipo en cuanto a función cardiovascular comparado con los animales F/F con dieta alta en grasa. De esta forma, rechazamos la hipótesis donde se propone a VCAM-1 como mediador de la cardiomiopatía inducida por obesidad, pero concluimos que el VCAM-1 proveniente de los cardiomiocitos tiene un papel protector en el desarrollo de hipertrofia inducido por dieta alta en grasas.

4.6.3. Objetivo 3: Evaluar blancos moleculares hipertróficos y metabólicos presentes en ratones knockout cardiomiocito específico de VCAM-1 alimentados con dieta alta en grasa.

Para la evaluación de los blancos moleculares hipertróficos se realizó la determinación de los niveles de expresión génica mediante RT-qPCR de *Anp*, *Bnp* y β -*Mhc*, que son marcadores clásicos de hipertrofia (**Figura 27**). Los resultados muestran que el mRNA de *Anp* aumenta significativamente en las condiciones c-VCAM-1-KO, comparado con los animales F/F, independiente de la dieta (**Figura 27A**). Los niveles de mRNA de *Bnp* presentan una diferencia significativa entre las condiciones HFD, aumentando en la condición c-VCAM-1-KO HFD con respecto a la condición F/F HFD (**Figura 27B**). No se observaron cambios significativos en los niveles de mRNA de β -*Mhc* (**Figura 27C**). También se evaluaron los niveles proteicos de ANP por Inmuno-blot, encontrando que solo hay expresión en los animales c-VCAM-1-KO HFD (**Figura 27D**). Estos resultados nos muestran que los animales c-VCAM-1-KO HFD presentan aumento en marcadores de hipertrofia cardiaca, complementando los resultados obtenidos por peso del corazón e histología (**Figuras 19-22**).

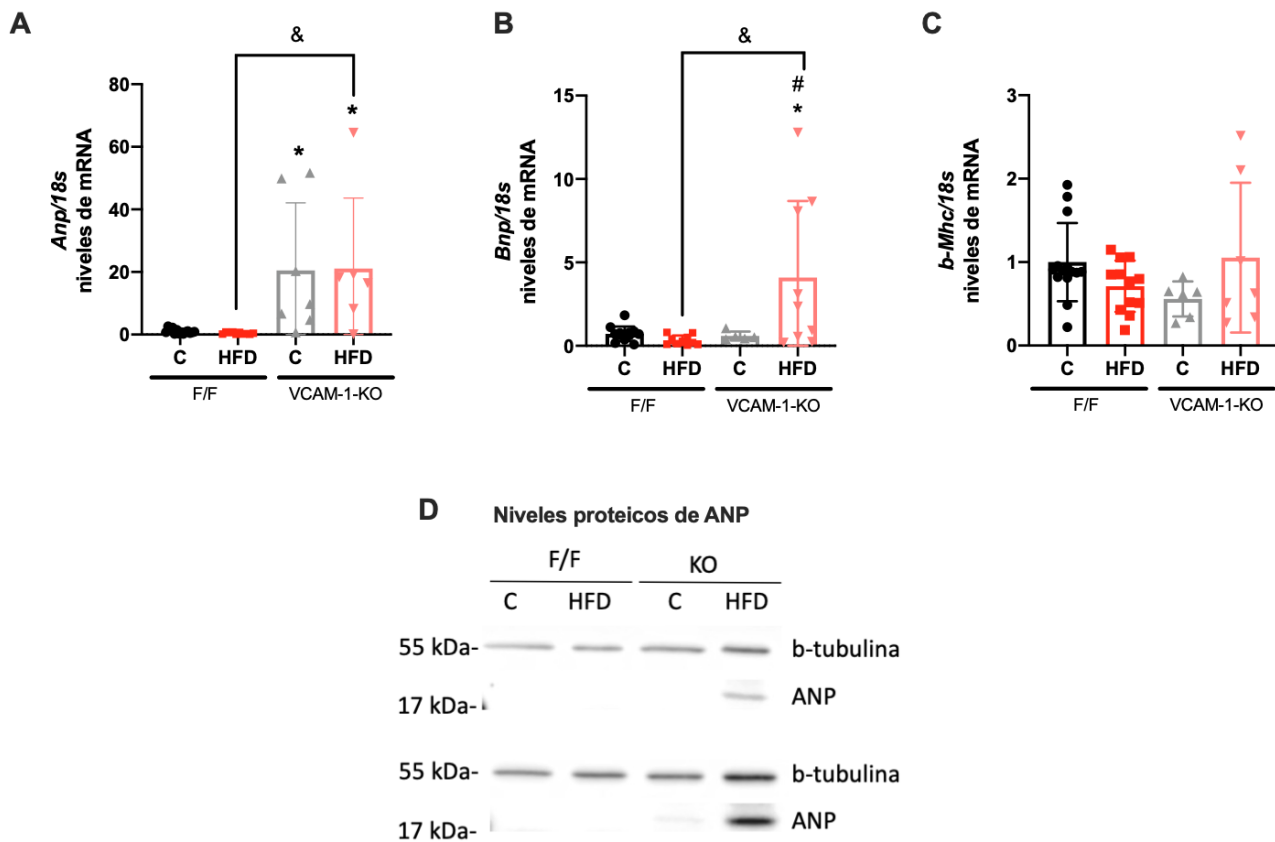


Figura 27: Ratones c-VCAM-1-KO alimentados con HFD presentan aumentos en los niveles de mRNA de Anp y Bnp, como también niveles proteicos de ANP. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizó RT-qPCR de lisados totales de corazón. **(A)** Niveles de mRNA de Anp, **(B)** Bnp, **(C)** β -Mhc, utilizando como control de carga 18s. Se muestran los niveles proteicos de ANP de dos experimentos independientes representativos **(D)**. $n=6/12$. Los datos se analizaron por 2way-ANOVA, * $p<0,05$ comparado con F/F; # $p<0,05$ comparado con VCAM-1-KO control, & $p<0,05$ comparando F/F HFD con VCAM-1-KO HFD.

Para determinar el estado metabólico de los animales c-VCAM-1-KO se realizaron test de tolerancia a la glucosa al inicio, 5 y 15 semanas, observando un fenotipo similar a los animales *wild type* (**Figura suplementaria 7**) con un avance progresivo y un fenotipo intolerante severo a las 15 semanas. A las 25 semanas de tratamiento, sin cambios en la glucosa basal y con un aumento significativo del área bajo la curva en ambas condiciones HFD con sus respectivos controles, sin diferencias entre ellas (**Figura 28**).

Además, se evaluó la insulinemia, donde los animales F/F HFD presentan un aumento significativo de los niveles plasmáticos de insulina con respecto al F/F con dieta control (**Figura 29A**), sin embargo, no se obtuvieron diferencias en las condiciones c-VCAM-1-KO debido a la alta dispersión de los datos, por lo que se requerirán experimentos adicionales para tener una conclusión. Además, se determinó el índice HOMA-IR (observando que solo la condición F/F HFD tiene un aumento significativo con respecto al control (**Figura 29C**), correspondiente a condiciones de obesidad y resistencia a la insulina, sin cambios en las condiciones c-VCAM-1-KO. Como blanco molecular de la respuesta a la insulina en el corazón, determinamos los niveles de fosforilación de AKT en la serina 473 en lisados de corazón completo observando que los animales F/F con dieta control son sensibles a un pulso de insulina en cuanto a la fosforilación de AKT, no así los animales F/F HFD (**Figura 30**), concluyendo que los animales F/F HFD presentan resistencia a la insulina. Sin embargo, esta resistencia no fue vista en la condición c-VCAM-1-KO HFD, sino todo lo contrario, ya que en estos animales encontramos que la condición c-VCAM-1-KO HFD presentan sensibilidad a la insulina en cuanto a la fosforilación de AKT. La condición c-VCAM-1-KO con dieta control y pulso de insulina debería haber arrojado diferencias, ya que no esperamos que haya una alteración en la señalización, sin embargo, la desviación de los datos es alta y será necesario realizar más experimentos para confirmar este hallazgo y evaluar nuevos blancos río abajo a la señalización de insulina, tales como AS160 y la translocación de los transportadores GLUT-4 a la membrana de los cardiomiocitos.

Estudios realizados en microarreglos de muestras de corazón bajo el modelo de cardiomiopatía diabética inducida por 25 semanas de dieta alta en grasa, mostraron que VCAM-1 era una de las moléculas que aumentaba su expresión en el corazón y que su expresión podría depender de la actividad transcripcional del factor de transcripción FoxO1 (datos no publicados, laboratorio Joseph Hill). A partir de estos antecedentes, realizamos una búsqueda de sitios de unión para FoxO1 en el promotor de VCAM-1, encontrando la secuencia de consenso 5' TGTTTAC 3'. Por esto, se evaluó como otro blanco metabólico los niveles de expresión génica de FoxO1. Los resultados muestran que los niveles transcripcionales de FoxO1 no cambian entre las condiciones experimentales evaluadas (**Figura 31**), sin embargo, es necesario evaluar los niveles proteicos y actividad transcripcional de FoxO1 en nuestro modelo para determinar su participación en el modelo de cardiomiopatía diabética inducida por obesidad.

Finalmente, futuros experimentos deberán ser realizados para determinar el papel molecular de VCAM-1 en la hipertrofia cardiaca y el metabolismo. Este trabajo nos muestra por primera vez que VCAM-1 tendría un rol protector frente a estímulos crónicos como la dieta alta en grasas por 25 semanas, ya que al no tener VCAM-1 en los cardiomiocitos, los animales presentaron una disfunción sistólica y diastólica con un fenotipo de insuficiencia cardiaca.

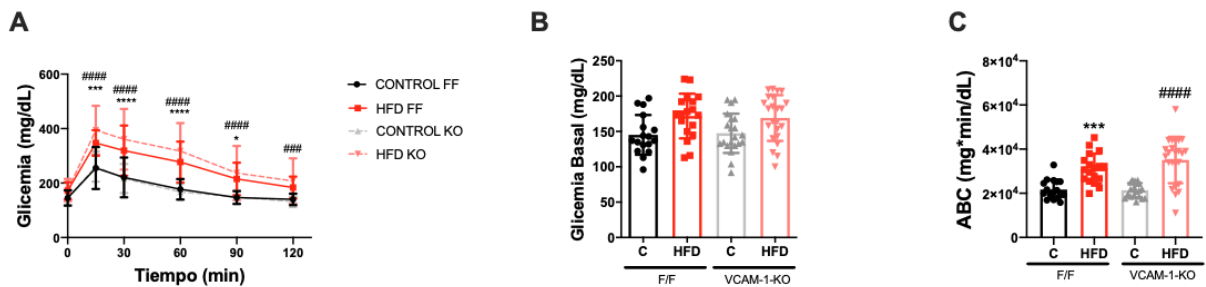


Figura 28: c-VCAM-1-KO no presenta cambios significativos en test de tolerancia a la glucosa en condiciones de dieta alta en grasa. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizó el test de tolerancia a la glucosa (6 horas de ayuno, 1 g/kg de glucosa), en donde se muestra (A) la curva de glicemia, (B) glucosa basal y (C) área bajo a curva (ABC) a las 25 semanas (D). n=17/24 animales por grupo. Los datos se analizaron por 2way-ANOVA. ***p<0,01, ****p<0,0001 comparado con F/F Control; #p<0,05, ##p<0,01, ####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control.

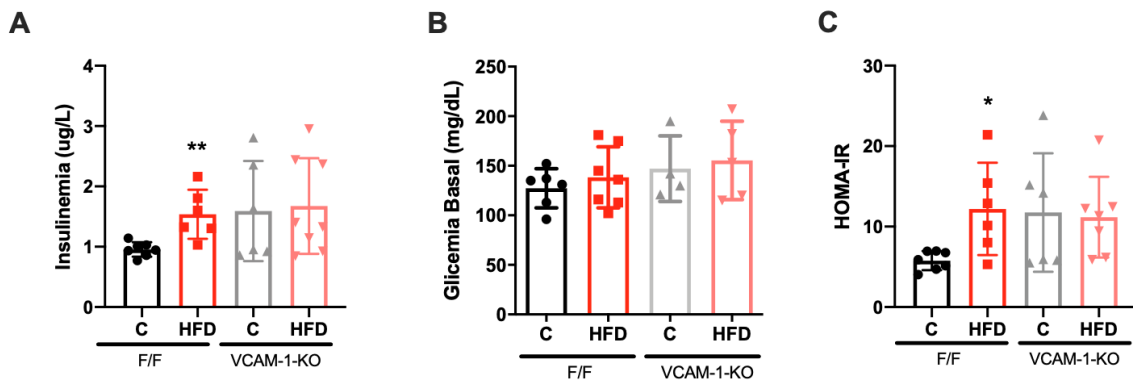


Figura 29: c-VCAM-1-KO HFD no presenta cambios en insulinemia ni HOMA-IR al compararlo con F/F HFD. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de tratamiento se extrajo el corazón para obtener sangre y plasma. (A) Niveles plasmáticos de insulina en animales ayunados, (B) Glicemia basal de animales pareados con gráfico A. (C) Índice HOMA/-IR en animales ayunados. n=6/7. Los datos se analizaron por 2way-ANOVA y t-test entre las condiciones F/F dieta control y F/F HFD. *p<0,05 comparado con el F/F dieta control.

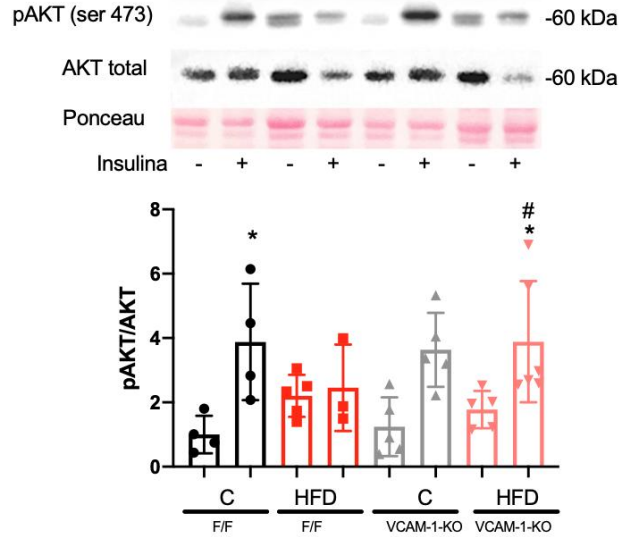


Figura 30: c-VCAM-1-KO HFD aumenta la pAKT/AKT luego de un pulso de insulina en el corazón. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de tratamiento se extrajo el corazón y se determinaron los niveles proteicos de pAKT(Ser-473)/AKT en tejido cardiaco de animales ayunados y con pulso de insulina (5U/Kg). n=6/7. Los datos se analizaron por 1way-ANOVA. *p<0,05 comparado con el F/F dieta control sin insulina, #p<0,05 comparado con el c-VCAM-1-KO dieta control sin insulina.

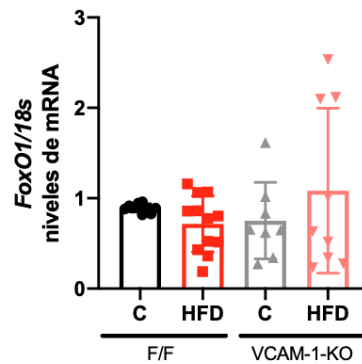


Figura 31: c-VCAM-1-KO no presenta cambios en los niveles de mRNA de FoxO1. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizó RT-qPCR de lisados totales de corazón para FoxO1 normalizados con el gen 18s. n=6/12. Los datos se analizaron por 2way-ANOVA.

4.6. Discusión

VCAM-1 es una sialoglicoproteína expresada canónicamente en el endotelio de los vasos sanguíneos para permitir la adhesión y trans migración de células inflamatorias a focos de inflamación en los tejidos [35, 42]. VCAM-1 presenta un dominio intracelular corto de 19 aminoácidos, altamente conservado entre las especies; un dominio de transmembrana y un dominio extracelular que está compuesto por 7 o 6 dominios inmunoglobulina debido a las variantes de *splicing*. Además, VCAM-1 puede ser cortado proteolíticamente en un proceso llamado *shedding* por diferentes metaloproteinasas, obteniendo una versión soluble de VCAM-1 (sVCAM-1) [18], [19]. Actualmente, se ha relacionado a sVCAM-1 con enfermedades cardiovasculares, tales como infarto cerebro vascular, infarto al miocardio, aterosclerosis, hipertensión, fibrilación auricular e insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada [19]. La mayoría de estos trabajos asocian la producción de sVCAM-1 al endotelio y su liberación en condiciones patológicas, sin embargo, la función de VCAM-1 en los cardiomiocitos permanece desconocida [19].

VCAM-1 es una proteína que aumenta su expresión en condiciones inflamatorias inducidas por $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, LPS, etc., experimentos altamente descritos que estimulan la vía de señalización $\text{NF-}\kappa\text{B}$, estimulando la transcripción, traducción y expresión de VCAM-1 en la membrana de celular, predominantemente endoteliales o células musculares vasculares lisas. En esta tesis, el estímulo patológico utilizado fue la dieta alta en grasas, la cual indujo obesidad y resistencia a la insulina en nuestros animales. La literatura muestra que en individuos obesos y con cardiomiopatía diabética, la inflamación de bajo grado se encuentra presente, aumentando los niveles solubles de citoquinas proinflamatorias [42], por lo que el aumento en los niveles cardiacos de VCAM-1 en mRNA y proteína, como también el aumento de sVCAM-1 plasmático, lo atribuimos al contexto inflamatorio inducido por la dieta alta en grasas, sin embargo, experimentos que demuestren esta inflamación crónica de bajo grado serán necesarios para conocer qué citoquinas proinflamatorias expresan los animales y si esto cambia en las condiciones c-VCAM-1-KO. Se ha reportado que una sobreexpresión de $\text{TNF}\alpha$ en modelos de obesidad induce un remodelamiento patológico del corazón conduciendo a cardiomiopatía dilatada [43] y animales KO para $\text{TNF}\alpha$ disminuyen la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión [44], demostrando que estímulos proinflamatorios afectan la función cardiaca.

Con estos antecedentes, hipotetizamos que VCAM-1 mediaría la hipertrofia cardiaca inducida por dieta alta en grasa en nuestro modelo y que al utilizar el animal c-VCAM-1-KO revertiríamos el efecto, sin

embargo, el c-VCAM-1-KO acentúa la patología, mostrando que la falta de VCAM-1 en condiciones de dieta alta en grasa produce hipertrofia cardiaca, desorganización del parénquima, fibrosis entre los cardiomiocitos, los cuales están altamente hipertrofiados y desorganizados, con presencia de disfunción sistólica y diastólica, pero independiente de hipertensión arterial. Es por lo anterior, que a pesar que VCAM-1 sea una molécula río debajo de la señalización proinflamatoria, la pérdida de expresión de VCAM-1 en los cardiomiocitos es perjudicial en condiciones de HFD, no así en las condiciones con dieta control. Dentro de los trabajos publicados que relacionan a VCAM-1 en cardiomiocitos se encuentra el de Verdejo et al., donde muestra que pacientes con fibrilación auricular presentan niveles de expresión de VCAM-1 aumentados en tejido cardiaco, localizándose en los cardiomiocitos [6]. También se ha visto que cardiomiocitos derivados de células pluripotenciales de pacientes con distrofia muscular de Duchenne muestran que los cardiomiocitos atroficos, que presentan menor área celular tienen bajos niveles de VCAM-1 [45], sin embargo, la función de VCAM-1 en los cardiomiocitos permanece no estudiada y a continuación discutiremos los efectos encontrados.

La hipertrofia cardiaca se define como una respuesta adaptativa a un estímulo, ya sea fisiológico o patológico, en donde aumenta el tamaño del corazón y de los cardiomiocitos [46]. La hipertrofia cardiaca es un rasgo característico de la cardiomiopatía diabética inducida por comorbilidades como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 [46]. Inicialmente los pacientes son asintomáticos y presentan hipertrofia cardiaca como mecanismo adaptativo al estímulo patológico. Al comparar con la literatura, nuestros animales estarían en un estadio previo a la disfunción diastólica del fenotipo reportado, solo presentando características de hipertrofia, sin alterar la función de relajación ni contráctil del corazón [41], [47], lo que se condice con lo encontrado en los animales *wild type* y F/F HFD. Luego, el fenotipo avanza desarrollando alteraciones en la función diastólica, afectando las velocidades de llenado sanguíneo del ventrículo izquierdo producto de una fibrosis en el tejido ventricular y aumento en las presiones de llenado del ventrículo [47]. Posteriormente pasan a una fase sintomática, en donde el corazón desarrolla disfunción sistólica por problemas en el acople excitación-contracción, manejo del calcio intracelular, etc., reduciendo la fracción de eyección del corazón y afectando el gasto cardiaco [41]. La hipertrofia patológica presenta un aumento concéntrico del tamaño del corazón que puede avanzar a una dilatación de la cámara del ventrículo izquierdo, adelgazamiento de las paredes, alargamiento de los cardiomiocitos, fibrosis intersticial y perivascular y muerte de los cardiomiocitos, desencadenando disfunción contráctil e insuficiencia cardiaca [46]. Dentro de los blancos moleculares más conservados y presentes en la hipertrofia cardiaca patológica encontramos: vías de señalización dependientes de calcio, como

Calmodulina-CAMKII-HDAC4 y Calcineurina-NFAT-MEF2/GATA4 [46], como también la expresión del programa fetal de genes, donde se promueve la expresión de ANP, BNP y beta-MHC [48], [49].

En nuestro modelo, los animales c-VCAM-1-KO con HFD presenta aumento del peso del corazón, área de sección transversal, fibrosis, disfunción diastólica y sistólica, aumento de peso del pulmón, intolerancia al ejercicio y presencia de blancos moleculares clásicos de la expresión del programa fetal de genes como lo son ANP y BNP, mostrando un fenotipo de hipertrofia patológica significativa (**Figuras 19-27**). La literatura muestra que en condiciones de HFpEF los cardiomiocitos presentan hipertrofia concéntrica aumentando el ancho de los cardiomiocitos y en HFrfEF los cardiomiocitos presentan hipertrofia excéntrica, aumentando el largo de los cardiomiocitos, como también presencia de muerte celular por apoptosis [46]. En esta tesis al determinamos que el peso del corazón aumenta aproximadamente un 22-25% en los animales *wild type* y F/F con HFD respectivamente (**Figuras 7 y 22**), lo que se relaciona con lo encontrado a Tong et al [50], donde obtuvo un 37% cambio en este parámetro con 24 semanas de HFD, sin embargo, no menciona la edad de inicio de las dietas, lo que podría estar generando la diferencia encontrada. La hipertrofia encontrada en los c-VCAM-1-KO HFD comparado con el control aumenta en un 37%, mostrando un aumento en comparación a las condiciones F/F HFD y controles (**Figura 22**). Comparando el área de sección transversal, Battiprolu et al. [12]., en las condiciones HFD 25 semanas observó un aumento de 60% comparado con los controles, sin embargo, nuestras aproximaciones con este parámetro aumentan en un 20% en animales *wild type* y un 42% en los animales c-VCAM-1-KO HFD, mostrando que las diferencias que observamos son distintas en magnitud a las mostradas por Battiprolu, pero significativamente distintas comparadas con nuestras condiciones control. Además, se podrían determinar parámetros adicionales que complementen los hallazgos de disfunción sistólica e hipertrofia. Uno de ellos podría ser la medición de caspasa 3 clivada en los cardiomiocitos por inmunohistoquímica, ya que los modelos de HFrfEF presentan de muerte celular por apoptosis [46]. Estos resultados muestran que frente a condiciones de dieta alta en grasa, la falta de VCAM-1 empeora el fenotipo hipertrófico y promueve el fenotipo de insuficiencia cardiaca con fracción de eyección reducida, sugiriendo, por primera vez, que VCAM-1 podría tener un papel protector frente al daño inducido por HFD.

Otros modelos que presentan disfunción sistólica similar a la encontrada en nuestros animales son los modelos de hipertensión arterial. Modelos de constricción aortica torácica (TAC, por sus siglas en ingles Transtoracic Aortic Constriction) muestran que a los 7, 14, y 30 días luego del TAC, los animales aumentan el tamaño del corazón, área transversal de los cardiomiocitos, presentan fibrosis cardiaca y una

disminución de la fracción de eyección luego de los 14 días de TAC. Además, al ocupar un KO cardiomiocito específico para Drp1, proteína participante en la fisión mitocondrial, los animales TAC presentan una disminución en la fracción de eyección luego de los 3 días de la TAC, mostrando que Drp1 tiene un rol protector ante el daño inducido por sobrecarga de presión [51]. Resultados similares fueron encontrados por Arany *et al*, donde el animal KO cardiomiocito específico para PGC-1 α , coactivador transcripcional esencial para la función mitocondrial, acelera la patología inducida por TAC [52]. Adicionalmente, se ha mostrado que la angiotensina II induce hipertrofia y fibrosis en el corazón [53]. Recientemente, Ze-Yang Qiu *et al*. mostraron que la utilización de un anticuerpo neutralizante para VCAM-1, disminuye la infiltración de macrófagos VLA4+ al corazón, inhibiendo el remodelado cardiovascular inducido por angiotensina II y postulando el bloqueo de VCAM-1 como una nueva estrategia terapéutica para los efectos cardiacos de la hipertensión arterial [54]. Además, la literatura muestra que bajo dieta alta en grasas a las 24 semanas de tratamiento, los animales no presentan alteraciones en la fracción de acortamiento, pero cuando se utilizan animales KO cardiomiocito específico para *atg7*, proteína esencial para la autofagia, la fracción de acortamiento disminuye aproximadamente un 50% con respecto a la condición control, mostrando que bajo estímulos de dieta alta en grasas *atg7* participa como un factor protector para este tipo de daño en el sistema cardiovascular [50]. Estos resultados son similares a lo que observamos en nuestros animales KO cardiomiocito específico para VCAM-1, ya que también utilizamos un estímulo de obesidad mediante dieta alta en grasas, encontrando un fenotipo de insuficiencia cardiaca. De los trabajos citados en este párrafo, todos tienen relación con la función mitocondrial en el desarrollo de la insuficiencia cardiaca, ya sea por sobrecarga de presión o por exceso de calorías en la dieta, por lo que evaluar blancos mitocondriales en nuestros animales nos podría entregar información del mecanismo por el cual estamos observando este fenotipo de insuficiencia cardiaca con fracción de eyección reducida en nuestros animales c-VCAM-1-KO.

Adicionalmente, la hipertrofia cardiaca presenta alteraciones metabólicas, ya que los cardiomiocitos presentan un “switch” metabólico donde pasan de oxidar ácidos grasos para la obtención de energía a utilizar glucosa [55]. En estadios avanzados de disfunción, la maladaptación del corazón lleva a una disminución de la oxidación de glucosa, con un aumento en la glicólisis, anaplerosis y acumulación de sustratos en los cardiomiocitos (lípidos y glicógeno) [55]. Clínicamente, la cardiomiopatía inducida por dieta alta en grasas y cardiomiopatía diabética, presentan características que incluyen la hiperglicemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, condiciones que afectan sistémicamente a los pacientes

afectando la funcionalidad de órganos, donde destacamos el corazón [41], [56]. El estudio de Framingham muestra que la diabetes otorga 4 a 5 veces de aumento en el riesgo de padecer insuficiencia cardiaca [57], por lo que estudiar el estado metabólico nos aportaría información para complementar el fenotipo inducido por dieta alta en grasas. En este trabajo demostramos que la HFD induce intolerancia a la glucosa a las 25 semanas de dieta, con un máximo de intolerancia a las 15 semanas (**Figuras 5 y 28**). En la literatura se muestra que los niveles de glucosa en tratamientos con HFD aumentan significativamente a lo largo de las semanas de tratamiento [58]–[60], sin embargo, pocos trabajos muestran la progresión de la tolerancia a la insulina en el tiempo. Hong Soon Kang et al., muestran la progresión de la intolerancia a la glucosa a las 6, 12, 21 semanas de tratamiento, llegando a un máximo a las 21 semanas [61], resultado distinto al observado en nuestros animales que alcanzaron el máximo de intolerancia a la glucosa a las 15 semanas. Por otra parte, Battiprolu et al. muestran que los animales tratados con HFD a las 25 semanas de tratamiento presentan valores similares a los que encontramos en este trabajo, donde los animales vuelven a los niveles basales de glucosa luego de las 2 h de medición [12], similar a lo encontrado en nuestros animales. Otra de las características que observamos fue la hiperinsulinemia de los animales *wild type* HFD y F/F HFD (**Figuras 6 y 25**), mostrando que ambas condiciones estarían respondiendo a las alzas de hiperglicemia encontradas a las semanas previas de tratamiento. No encontramos diferencias en las condiciones c-VCAM-1-KO, probablemente por la alta dispersión de los datos. Battiprolu et al., muestra que los animales a las 25 semanas presentan niveles de insulinemia cercanos a los 13 ng/ml, con un aumento significativo con respecto al control [12]. Nuestros animales HFD alcanzan los 6 ug/l en *wild type* y 2 ug/ml en F/F, unidades menores pero equivalentes en el cambio con el experimento de Battiprolu et al., lo que se puede deber a la diferencia de cepas de los animales, siendo el animal *C57BL/6J* más susceptible a los estímulos HFD [62]. Además, realizamos la medición del índice HOMA-IR, el cual estima la sensibilidad a la insulina mediante la medición matemática del producto de la insulina y glucosa basal, dividido por un factor normalizador según los niveles ideales para un individuo. Si bien su uso en ratones presenta un factor predictivo positivo bajo, la utilización de un factor corrector 22,5 para ratones se ha estado realizando en condiciones de ayuno [36]. La literatura muestra que en condiciones de HFD el índice HOMA-IR aumenta significativamente con respecto a las condiciones control [36], [63]–[65]. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en animales *wild type* y F/F con HFD (**Figuras 6 y 25**), sin embargo, no se observaron cambios en la condición c-VCAM-1-KO HFD, por lo que serán necesarios más experimentos para visualizar si es que existe un cambio, ya que el n utilizado en estas condiciones es bajo para la alta dispersión de los datos. Para complementar estos resultados, realizamos la determinación de la serina

473 de AKT, fosforilación que se induce cuando las células o tejidos son sometidos a un pulso de insulina y es reconocida por su receptor, proceso que desencadena la vía de señalización de la insulina [66], observando que los animales *wild type* y F/F HFD presentan una resistencia al estímulo de insulina en tejido cardiaco, no activando la fosforilación de la serina 473 de AKT como la condición control (**Figuras 6 y 30**), situación que se ha descrito previamente en corazones de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina [66], sin embargo, los c-VCAM-1-KO presentan una sensibilidad a la insulina por este parámetro, medición que no va acorde a los resultados de test de tolerancia a la glucosa e insulinemia, donde hay una tendencia a que aumenten estos parámetros. La literatura muestra que para definir la resistencia a la insulina a nivel molecular es necesario incluir la evaluación de varias proteínas que participan en la vía de señalización, tales como mTOR, FoxO1, AS160 y la translocación de los transportadores GLUT-4 a la membrana de las células a evaluar [67], como también niveles de blancos moleculares integradores de vías de señalización proinflamatorias y de resistencia a la insulina, tales como JNK y fosforilación del IRS-1 en la serina 307 [68]. Por esta razón, no podemos concluir acerca de la resistencia a la insulina a nivel molecular en el tejido cardiaco del modelo c-VCAM-1-KO

Se ha propuesto en la literatura que unos de los blancos río abajo de VCAM-1 es Ezrin y AKT [18], como también se ha relacionado la expresión de VCAM-1 a la actividad transcripcional de FoxO1[7], factor de transcripción clave en el desarrollo de diabetes, ya que bajo un exceso de nutrientes, se promueve la permanencia de FoxO1 en el núcleo, fomentando la transcripción de genes relacionados con la acumulación de lípidos, lipotoxicidad y disminución de la sensibilidad a la insulina [69]. Previamente se ha demostrado que FoxO1 tiene una relación con VCAM-1, donde un modelo KO para FoxO1 presenta disminución de los niveles de mRNA de VCAM-1 [7]. Con estos antecedentes, realizamos una evaluación del promotor de VCAM-1 encontrando secuencias de unión a FoxO1 (datos no mostrados), por lo que la expresión y actividad transcripcional de FoxO1 en contextos de obesidad y diabetes, podrían afectar los niveles de expresión de VCAM-1. Sin embargo, futuros experimentos deben ser realizados para establecer la participación de FoxO1 y VCAM-1 en contextos de diabetes e hipertrofia en cardiomiocitos.

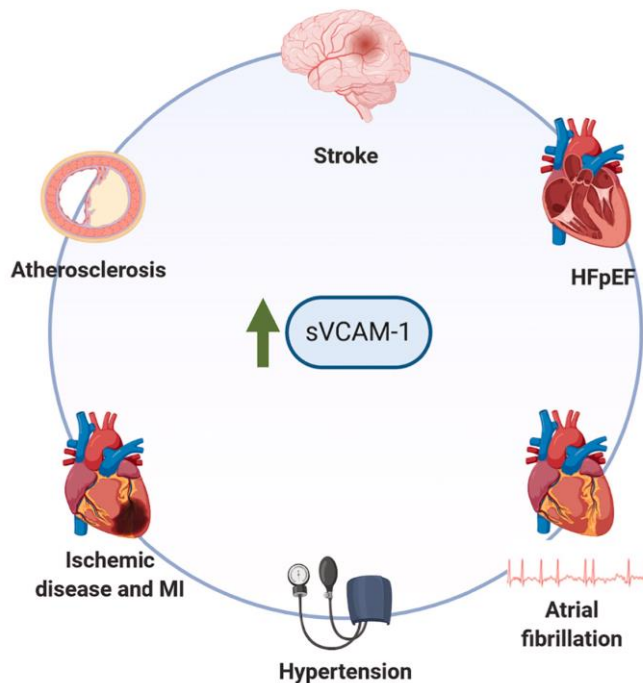


Figura 32: Aumentos de los niveles circulantes de la proteína sVCAM-1 se asocian al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Niveles de sVCAM-1 están relacionados con aterosclerosis, infartos y enfermedad isquémica del miocardio, insuficiencia cardiaca, hipertensión arterial y fibrilación auricular. Figura extraída de la referencia [19].

Otro aspecto importante a discutir es la asociación de los niveles de sVCAM-1 como biomarcador en enfermedades cardiovasculares, donde la literatura ha mostrado que los niveles de sVCAM-1 están aumentados en aterosclerosis, infarto cerebrovascular, infarto al miocardio, hipertensión, fibrilación auricular e insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada (**Figura 32**) [19]. En esta tesis se midieron los niveles solubles de VCAM-1 en ratones *C57BL/6N wild type* alimentados por 25 semanas con dieta alta en grasas y el modelo c-VCAM-1-KO, observando por primera vez que los niveles de sVCAM-1 aumentados en condiciones de dieta alta en grasa, provienen del VCAM-1 secretado por cardiomiocitos. Los niveles de sVCAM-1 encontrados en nuestro modelo se relacionan con los niveles plasmáticos de VCAM-1 reportados para la literatura en condiciones patológicas, en donde en fibrilación auricular post operatoria (POAF, por sus siglas en inglés) se considera a VCAM-1 como factor predictor sobre los 763,5 ng/ml [70]. Sin embargo, otros trabajos muestran que sobre los 1000 ng/ml es el punto de corte para detectar POAF [6]. En este caso, los animales utilizados en este modelo alcanzan aproximadamente los 800 ng/ml como promedio máximo en las condiciones HFD, no cumpliendo con el punto de corte mencionado. Estos resultados abren varias interrogantes sobre la función de esta molécula soluble, preguntándonos si la restitución de los niveles plasmáticos de VCAM-1 serían

protectores frente a estas enfermedades o si la función cardiaca de VCAM-1 radica en el VCAM-1 expresado en los cardiomiocitos y no solubilizándose en el intersticio. Futuros experimentos deberán ser realizados para responder a estas interrogantes.

Basados en los presentes hallazgos, sugerimos que VCAM-1 es una molécula que aumenta su expresión como mecanismo de compensación/adaptación al daño inducido por la dieta alta en grasas, ya que al no estar presente, empeora el fenotipo. Así, podemos concluir que VCAM-1 es un factor protector frente al daño inducido por dieta alta en grasas en un modelo de cardiomiopatía inducida por obesidad (**Figura 33**).

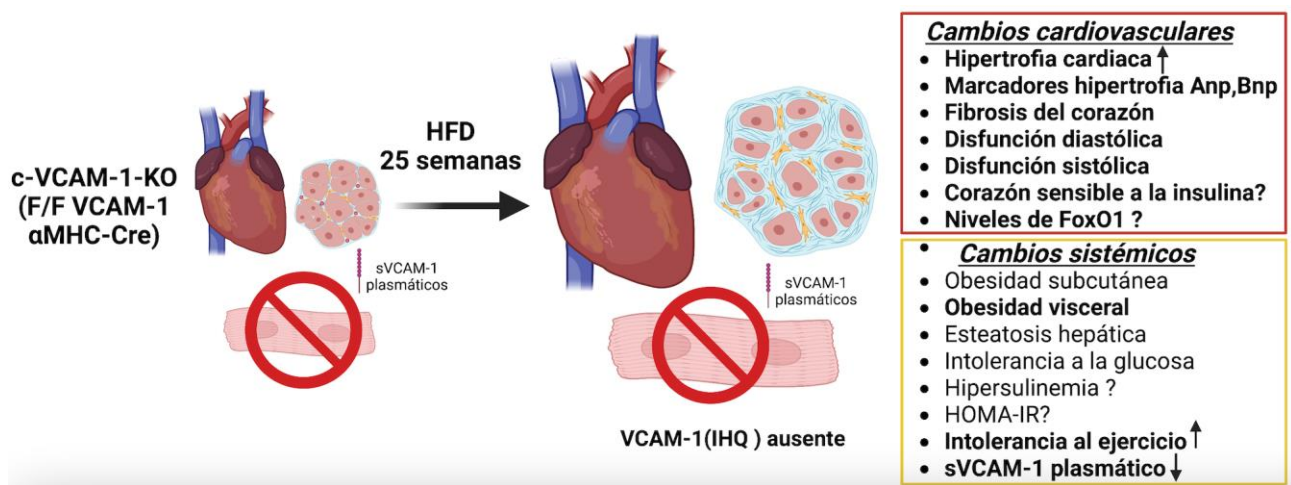


Figura 33: VCAM-1 es un factor protector frente al daño inducido por dieta alta en grasas. Definiciones: αMHC: alpha-myosin heavy chain, HFD: dieta alta en grasas por sus siglas en inglés High Fat Diet. sVCAM-1: VCAM-1 soluble. IHQ: inmunohistoquímica. Signo?: conclusión con falta de experimentos independientes para determinar cambios. Figura realizada en Biorender.

Discutiendo la **implementación del modelo de cardiomiopatía inducida por obesidad**, tenemos como antecedente que la mayoría de los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 son obesos o presentan un aumento en el porcentaje del tejido adiposo abdominal. La dislipidemia diabética es el factor de riesgo cardiovascular predominante en estos pacientes, donde hay un aumento de los niveles de ácidos grasos libres en la circulación y resistencia a la insulina en adipocitos, aumentando el flujo de triglicéridos y lipoproteínas de baja y alta densidad [8]. Debido a los múltiples factores presentes en esta enfermedad y los variados modelos de estudio, se han desarrollado modelos murinos que imitan esta condición tanto en fenotipos de diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 tardía, con disminución de la función pancreática y

disminución de la insulinemia como lo son los modelos que utilizan estreptozotocina, fármaco que causa citotoxicidad pancreática. Por otro lado, existen los modelos murinos relacionados a la diabetes mellitus tipo 2, causada por la secreción anormal de insulina por las células β pancreáticas y la resistencia a la insulina a nivel tisular, tales como los modelos *ob/ob*, *db/db*, que al tener mutado el gen o el receptor de leptina, respectivamente, generan fenotipos obesos y diabéticos de forma espontánea [10]. Sin embargo, estas características no igualan a lo que ocurre en los seres humanos, por lo que se desarrollaron modelos de inducción de obesidad y diabetes mediante dietas calóricas, donde se cree el exceso de calorías sería suficiente para inducir los estímulos patológicos asociados a diabetes [10], [71], [72]. Es por estos antecedentes que nos enfocamos en un modelo de cardiomiopatía inducida por obesidad [73].

La literatura muestra que para establecer modelos de cardiomiopatía por obesidad y/o diabetes es importante tener las siguientes consideraciones generales en los animales tales como: cepa, edad y sexo de los animales, como también la formulación y duración de la dieta [74]. Para esta tesis se utilizaron machos de la cepa *C57BL/6N*, los cuales difieren de los animales *C57BL/6J* ampliamente utilizados en modelos de obesidad, ya que no presentan mutación en la nicotinamina nucleótido transhidrogenasa (NNT) [62]. La NNT es una de las enzimas que contribuye en la producción de NADPH, molécula utilizada en biosíntesis y detoxificación de radicales libres en las células. Los animales *C57BL/6J* presentan una mutación espontánea en esta proteína, produciendo una mayor cantidad de radicales libres, reducción de los niveles de glutatión reducido/oxidado, aumento de la liberación de peróxido de hidrógeno, entre otras [62], condición que exacerba condiciones patológicas presentadas en modelos de dieta alta en grasa [43,45]. En cuanto al sexo, utilizamos animales machos para evitar las fluctuaciones producidas por el ciclo menstrual de las hembras en la obtención de resultados y comenzamos las dietas a las 10-12 semanas de edad, debido a que los animales presentan un estadio adulto de desarrollo. Se ha discutido ampliamente la edad para inicios de tratamiento en roedores ya que aún no está totalmente claro cuál sería la equivalencia de los procesos de desarrollo con la vida humana, pero se menciona que es importante informar el rango ocupado para poder comparar los experimentos y obtener reproducibilidad de los resultados [76].

Los animales utilizados en este trabajo son de la cepa *C57BL/6N*. Si bien los animales *wild type* y los F/F utilizados son de la misma cepa, observamos diferencias en nuestros resultados con el mismo tratamiento de dieta y realizados los experimentos en la misma Unidad de Mantenimiento Animal, observamos fenotipos distintos frente al tratamiento con dieta alta en grasas, ya que los animales F/F presentan aumentos en

los niveles proteicos de VCAM-1, no así el mRNA, contrario a lo encontrado en los animales *wild type*, que aumenta el mRNA y no la proteína. En cuanto a parámetros hipertróficos, los animales F/F HFD no presentan aumentos significativos en el área de sección transversal de los cardiomiocitos, cambios que sí se observaron en los animales *wild type* HFD comparados con la condición control. Es por estas razones que creemos que la procedencia de los animales puede estar generando las diferencias encontradas, siendo los F/F VCAM-1 donados del laboratorio de Joseph Hill, *UT Southwestern Medical Center*; y los *wild type* utilizados provienen directamente de los proveedores *Charles River Laboratories* a nuestro país. Otro de los factores que puede influir es el F de las generaciones de los animales, sin embargo, desconocemos el de ambos tipos de animales, solo sabemos que están en cruza *inbred* bajo el F10. Solicitar esta información a los veterinarios correspondiente ayudaría a saber si puede ser un factor considerable. Finalmente, solicitar la información de la posición de las secuencias LOXP nos ayudaría a saber cuál es la parte del gen de VCAM-1 que se deleta y si esto podría influir en el fenotipo de los animales. La literatura muestra que los factores que influyen las camadas y resultados de las crías se ven afectadas por el ambiente, como también por el *background* genético de los animales [77], sin embargo, el sistema Cre-LOXP tiene una manipulación simple y no requiere de factores adicionales a las estrategias de cruce y mantenimiento para una recombinación eficiente [78].

Por otro lado, en esta tesis se utilizó la dieta control pareada de la HFD, en donde ambas se encuentran equiparadas en sacarosa y solo difiere en ellas las calorías aportadas por los componentes grasos, permitiéndonos obtener resultados que solo tienen como variable el porcentaje de grasa (Control 10% grasa, HFD 60% grasa). Un artículo reciente muestra que la grasa presente en las dietas es el mayor contribuyente al aumento de peso y obesidad en animales murinos, sin tener efectos significativos la cantidad de proteínas e hidratos de carbono [79], por lo que reafirma que la diferencia encontrada en nuestros animales se debe solamente a la cantidad de grasa suministrada en las dietas. Debido a estos antecedentes, los datos generados en este trabajo son importantes como implementación del modelo de cardiomiopatía diabética en animales *C57BL/6N* inducido por dieta alta en grasa con una dieta pareada en azúcares.

5. Conclusiones

- Los animales *wild type* sometidos a dieta alta en grasas por 25 semanas desarrollaron obesidad, esteatosis hepática, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hipertrofia cardiaca, sin cambios en la función cardiaca respecto a los animales con dieta control. Estos antecedentes sugieren que bajo estas condiciones experimentales se alcanza un estadio inicial del desarrollo de la cardiomiopatía diabética (cardiomiopatía inducida por obesidad). Respecto a VCAM-1, los ratones *wild type* sometidos a dieta alta grasa presentan aumentos de los niveles cardiacos de mRNA de VCAM-1 y de los niveles séricos de la proteína VCAM-1 soluble.
- Los animales carentes genéticamente de VCAM1 en el cardiomiocito (knockout cardiomiocito específico para VCAM-1, c-VCAM-1-KO) alimentados con dieta alta en grasas presentaron un fenotipo obeso similar al animal F/F HFD, pero presentan un aumento del tejido adiposo epididimal. Estos animales KO presentan un fenotipo intolerante a la glucosa, con hiperinsulinemia, sin aumento en el HOMA-IR y con sensibilidad a la insulina en el tejido cardiaco.
- Dado que los animales knock out cardiomiocito específico para VCAM-1 (c-VCAM-1-KO) alimentados con dieta alta en grasas presentaron un aumento de los niveles proteicos de VCAM-1 en el corazón, es posible que otros tipos celulares contribuyan a este aumento (fibroblastos cardiacos, células endoteliales y células vasculares musculares lisas).
- Los animales c-VCAM-KO VCAM-1, alimentados con HFD, a diferencia de los ratones *wild type* y controles F/F alimentados con dieta alta en grasa mostraron una disminución de los niveles plasmáticos de la proteína VCAM-1 soluble, sugiriendo que este aumento de VCAM-1 soluble en condiciones de HFD podrían provenir del cardiomiocito.
- El hallazgo más relevante de la tesis fue el desarrollo de disfunción sistólica y diastólica y remodelado cardiaco (hipertrofia y fibrosis cardiaca) en los ratones knockout cardiomiocito específico para VCAM-1 (c-VCAM-1-KO) en respuesta a la dieta alta en grasas, resultados que rechazan la hipótesis planteada.
- Colectivamente estos resultados permiten concluir que VCAM-1 del cardiomiocito cumple un papel protector en el modelo de cardiomiopatía inducida por obesidad.

6. Bibliografía

- [1] M. Xin, E. N. Olson, and R. Bassel-Duby, “Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 14, no. 8, pp. 529–41, Aug. 2013, doi: 10.1038/nrm3619.
- [2] F. X. Galdos, Y. Guo, S. L. Paige, N. J. VanDusen, S. M. Wu, and W. T. Pu, “Cardiac Regeneration,” *Circ Res*, vol. 120, no. 6, pp. 941–959, Mar. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309040.
- [3] S. Mendis, P. Puska, and B. Norrving, “World Health Organization., World Heart Federation., and World Stroke Organization., WHO Global atlas on cardiovascular disease prevention and control,” 2011.
- [4] M. de S. de C. Departamento de Estadística e Información en Salud, “Mortalidad-DEIS,” *Mortalidad*, 2015.
- [5] E. J. Benjamin *et al.*, “Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 139, no. 10, pp. e56–e528, 2019, doi: 10.1161/CIR.0000000000000659.
- [6] H. Verdejo *et al.*, “Systemic vascular cell adhesion molecule-1 predicts the occurrence of post-operative atrial fibrillation,” *Int J Cardiol*, vol. 150, no. 3, pp. 270–276, 2011, doi: 10.1016/j.ijcard.2010.04.033.
- [7] A. Ferdous, J. Morris, M. J. Abedin, S. Collins, J. A. Richardson, and J. A. Hill, “Forkhead factor FoxO1 is essential for placental morphogenesis in the developing embryo,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 39, pp. 16307–12, Sep. 2011, doi: 10.1073/pnas.1107341108.
- [8] H. C. Kenny and E. D. Abel, “Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus,” *Circ Res*, vol. 124, no. 1, pp. 121–141, 2019, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311371.
- [9] F. Westermeier *et al.*, “New molecular insights of insulin in diabetic cardiomyopathy,” *Front Physiol*, vol. 7, no. APR, pp. 1–11, 2016, doi: 10.3389/fphys.2016.00125.
- [10] H. Bugger and E. D. Abel, “Rodent models of diabetic cardiomyopathy,” *Dis Model Mech*, vol. 2, no. 9–10, pp. 454–466, 2009, doi: 10.1242/dmm.001941.
- [11] J. K. Kim *et al.*, “Diet-Induced Increases in Intramuscular Fatty Acyl CoA and Insulin Resistance,” vol. 54, no. June, pp. 1657–1663, 2005.
- [12] P. K. Battiprolu *et al.*, “Metabolic stress–induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 3, pp. 1109–1118, Mar. 2012, doi: 10.1172/JCI60329.
- [13] MINISTERIO DE SALUD Subsecretaría de Salud Pública / División de Planificación Sanitaria / Departamento Estrategia Nacional de Salud., “ESTRATEGIA NACIONAL DE SALUD PARA LOS OBJETIVOS SANITARIOS AL 2030,” Feb. 2022.
- [14] X. Palomer, L. Salvadó, E. Barroso, and M. Vázquez-Carrera, “An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy,” *Int J Cardiol*, vol. 168, no. 4, pp. 3160–3172, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.ijcard.2013.07.150.
- [15] M. F. Iademarco, J. J. McQuillan, G. D. Rosen, and D. C. Dean, “Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1),” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 23, pp. 16323–16329, 1992.
- [16] M. F. Iademarco *et al.*, “VCAM1 acts in parallel with CD69 and is required for the initiation of oligodendrocyte myelination,” *Nat Commun*, vol. 7, no. 6, pp. 1607–1638, 2006, doi: 10.1038/ncomms13478.
- [17] S. Chakraborty, S.-Y. Hu, S.-H. Wu, A. Karmenyan, and A. Chiou, “The Interaction Affinity between Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and Very Late Antigen-4 (VLA-4)

- Analyzed by Quantitative FRET,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0121399, Mar. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0121399.
- [18] J. M. Cook-Mills, M. E. Marchese, and H. Abdala-Valencia, “Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants,” *Antioxid Redox Signal*, vol. 15, no. 6, pp. 1607–1638, 2010, doi: 10.1089/ars.2010.3522.
- [19] M. F. Troncoso *et al.*, “VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1867, no. 9, p. 166170, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166170.
- [20] T. Ulyanova *et al.*, “VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin.,” *Blood*, vol. 106, no. 1, pp. 86–94, Jul. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-09-3417.
- [21] K. J. Garton *et al.*, “Stimulated Shedding of Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Is Mediated by Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (ADAM 17),” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 39, pp. 37459–37464, Sep. 2003, doi: 10.1074/jbc.M305877200.
- [22] D. M. Rose, P. M. Cardarelli, R. R. Cobb, and M. H. Ginsberg, “Soluble VCAM-1 binding to $\alpha 4$ integrins is cell-type specific and activation dependent and is disrupted during apoptosis in T cells,” *Blood*, vol. 95, no. 2, pp. 602–609, Jan. 2000, doi: 10.1182/blood.V95.2.602.
- [23] D.-H. Kong, Y. Kim, M. Kim, J. Jang, and S. Lee, “Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 4, p. 1057, Apr. 2018, doi: 10.3390/ijms19041057.
- [24] G. D. Norata *et al.*, “Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies.,” *Atherosclerosis*, vol. 193, no. 2, pp. 321–7, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.09.015.
- [25] R. Madonna, A. Pandolfi, M. Massaro, A. Consoli, and R. de Caterina, “Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein-kinase.,” *Diabetologia*, vol. 47, no. 3, pp. 532–536, Mar. 2004, doi: 10.1007/s00125-004-1330-x.
- [26] P. Dandona, A. Aljada, and A. Bandyopadhyay, “Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes.,” *Trends Immunol*, vol. 25, no. 1, pp. 4–7, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.it.2003.10.013.
- [27] P. Ziccardi *et al.*, “Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year.,” *Circulation*, vol. 105, no. 7, pp. 804–9, Feb. 2002, doi: 10.1161/hc0702.104279.
- [28] G. C. Gurtner, V. Davis, H. Li, M. J. McCoy, A. Sharpe, and M. I. Cybulsky, “Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation.,” *Genes Dev*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Jan. 1995, doi: 10.1101/gad.9.1.1.
- [29] L. Kwee *et al.*, “Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice.,” *Development*, vol. 121, no. 2, pp. 489–503, Feb. 1995, doi: 10.1242/dev.121.2.489.
- [30] J. T. Yang, H. Rayburn, and R. O. Hynes, “Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development.,” *Development*, vol. 121, no. 2, pp. 549–60, Feb. 1995, doi: 10.1242/dev.121.2.549.
- [31] H. D. Theiss *et al.*, “Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM),” *Eur Heart J*, vol. 28, no. 10, pp. 1258–1264, Mar. 2007, doi: 10.1093/eurheartj/ehm011.
- [32] A. Bossowska, B. Kiersnowska-Rogowska, A. Bossowski, B. Galar, and P. Sowiński, “[Assessment of serum levels of adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin) in

- stable and unstable angina and acute myocardial infarction].” *Przegl Lek*, vol. 60, no. 7, pp. 445–50, 2003.
- [33] M. R. Mashru *et al.*, “Soluble levels of cell adhesion molecules (CAMs) in coronary artery disease.” *Indian Heart J*, vol. 62, no. 1, pp. 57–63.
- [34] R. B. Patel *et al.*, “Circulating Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Incident Heart Failure: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).” *J Am Heart Assoc*, vol. 9, no. 22, p. e019390, 2020, doi: 10.1161/JAHA.120.019390.
- [35] D. Koliijn *et al.*, “Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction via reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase G α oxidation.” *Cardiovasc Res*, vol. 117, no. 2, pp. 495–507, 2021, doi: 10.1093/cvr/cvaa123.
- [36] T. Alquier and V. Poitout, “Considerations and guidelines for mouse metabolic phenotyping in diabetes research.” *Diabetologia*, vol. 61, no. 3, pp. 526–538, Mar. 2018, doi: 10.1007/s00125-017-4495-9.
- [37] C. Riehle and E. D. Abel, “Insulin Signaling and Heart Failure.” *Circ Res*, vol. 118, no. 7, pp. 1151–69, Apr. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306206.
- [38] J. J. Silbiger, “Pathophysiology and Echocardiographic Diagnosis of Left Ventricular Diastolic Dysfunction.” *J Am Soc Echocardiogr*, vol. 32, no. 2, pp. 216–232.e2, 2019, doi: 10.1016/j.echo.2018.11.011.
- [39] J. R. Sowers, “Obesity as a cardiovascular risk factor,” *Am J Med*, vol. 115, no. 8, pp. 37–41, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.amjmed.2003.08.012.
- [40] C. D. Kemp and J. v. Conte, “The pathophysiology of heart failure,” *Cardiovascular Pathology*, vol. 21, no. 5, pp. 365–371, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.carpath.2011.11.007.
- [41] G. Jia, M. A. Hill, and J. R. Sowers, “Diabetic Cardiomyopathy,” *Circ Res*, vol. 122, no. 4, pp. 624–638, Feb. 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311586.
- [42] D. Westermann *et al.*, “Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy,” *Basic Res Cardiol*, vol. 102, no. 6, pp. 500–507, Nov. 2007, doi: 10.1007/s00395-007-0673-0.
- [43] T. Kubota *et al.*, “Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha.” *Circ Res*, vol. 81, no. 4, pp. 627–35, Oct. 1997, doi: 10.1161/01.res.81.4.627.
- [44] M. Sun *et al.*, “Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state.” *Circulation*, vol. 115, no. 11, pp. 1398–407, Mar. 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.643585.
- [45] B. Li, W. Xiong, W.-M. Liang, J.-S. Chiou, Y.-J. Lin, and A. C. Y. Chang, “Targeting of CAT and VCAM1 as Novel Therapeutic Targets for DMD Cardiomyopathy.” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 659177, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.659177.
- [46] M. Nakamura and J. Sadoshima, “Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy.” *Nat Rev Cardiol*, vol. 15, no. 7, pp. 387–407, 2018, doi: 10.1038/s41569-018-0007-y.
- [47] S. F. Nagueh *et al.*, “Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging.” *J Am Soc Echocardiogr*, vol. 29, no. 4, pp. 277–314, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.echo.2016.01.011.
- [48] T. Ogawa *et al.*, “Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production.” *Circulation*, vol. 93, no. 11, pp. 2059–67, Jun. 1996, doi: 10.1161/01.cir.93.11.2059.

- [49] J. P. Goetze, B. G. Bruneau, H. R. Ramos, T. Ogawa, M. K. de Bold, and A. J. de Bold, “Cardiac natriuretic peptides.,” *Nat Rev Cardiol*, vol. 17, no. 11, pp. 698–717, 2020, doi: 10.1038/s41569-020-0381-0.
- [50] M. Tong *et al.*, “Alternative Mitophagy Protects the Heart Against Obesity-Associated Cardiomyopathy.,” *Circ Res*, vol. 129, no. 12, pp. 1105–1121, Dec. 2021, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319377.
- [51] A. Shirakabe *et al.*, “Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload-Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure,” *Circulation*, vol. 133, no. 13, pp. 1249–1263, Mar. 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502.
- [52] Z. Arany, M. Novikov, S. Chin, Y. Ma, A. Rosenzweig, and B. M. Spiegelman, “Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- γ coactivator 1 α ,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 26, pp. 10086–10091, Jun. 2006, doi: 10.1073/pnas.0603615103.
- [53] S. K. Bhullar and N. S. Dhalla, “Angiotensin II-Induced Signal Transduction Mechanisms for Cardiac Hypertrophy,” *Cells*, vol. 11, no. 21, p. 3336, Oct. 2022, doi: 10.3390/cells11213336.
- [54] Z.-Y. Qiu, W.-J. Yu, J. Bai, and Q.-Y. Lin, “Blocking VCAM-1 ameliorates hypertensive cardiac remodeling by impeding macrophage infiltration,” *Front Pharmacol*, vol. 13, Nov. 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.1058268.
- [55] M. Nakamura and J. Sadoshima, “Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy.,” *Nat Rev Cardiol*, vol. 15, no. 7, pp. 387–407, 2018, doi: 10.1038/s41569-018-0007-y.
- [56] A. M. Stanton, M. Vaduganathan, L.-S. Chang, A. Turchin, J. L. Januzzi, and V. R. Aroda, “Asymptomatic Diabetic Cardiomyopathy: an Underrecognized Entity in Type 2 Diabetes.,” *Curr Diab Rep*, vol. 21, no. 10, p. 41, 2021, doi: 10.1007/s11892-021-01407-2.
- [57] W. B. Kannel, M. Hjortland, and W. P. Castelli, “Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study.,” *Am J Cardiol*, vol. 34, no. 1, pp. 29–34, Jul. 1974, doi: 10.1016/0002-9149(74)90089-7.
- [58] L. Jia, Y. Ma, G. Liu, and L. Yu, “Dietary cholesterol reverses resistance to diet-induced weight gain in mice lacking Niemann-Pick C1-Like 1.,” *J Lipid Res*, vol. 51, no. 10, pp. 3024–33, Oct. 2010, doi: 10.1194/jlr.M008599.
- [59] T. D. Cummins *et al.*, “Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity.,” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 307, no. 3, pp. E262–77, Aug. 2014, doi: 10.1152/ajpendo.00271.2013.
- [60] B. E. Sansbury *et al.*, “Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype.,” *Circ Res*, vol. 111, no. 9, pp. 1176–89, Oct. 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.266395.
- [61] H. S. Kang *et al.*, “CD44 plays a critical role in regulating diet-induced adipose inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e58417, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0058417.
- [62] J. A. Ronchi, T. R. Figueira, F. G. Ravagnani, H. C. F. Oliveira, A. E. Vercesi, and R. F. Castilho, “A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities.,” *Free Radic Biol Med*, vol. 63, pp. 446–56, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.049.
- [63] S. P. Weisberg *et al.*, “CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 1, pp. 115–124, Jan. 2006, doi: 10.1172/JCI24335.
- [64] M. He *et al.*, “High-fat diet-induced adipose tissue expansion occurs prior to insulin resistance in C57BL/6J mice,” *Chronic Dis Transl Med*, vol. 6, no. 3, pp. 198–207, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.cdtm.2020.06.003.

- [65] A. Espinosa *et al.*, “Insulin-Dependent H₂O₂ Production Is Higher in Muscle Fibers of Mice Fed with a High-Fat Diet,” *Int J Mol Sci*, vol. 14, no. 8, pp. 15740–15754, Jul. 2013, doi: 10.3390/ijms140815740.
- [66] L. Laviola *et al.*, “Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart.,” *Diabetes*, vol. 50, no. 12, pp. 2709–20, Dec. 2001, doi: 10.2337/diabetes.50.12.2709.
- [67] M. F. White and C. R. Kahn, “Insulin action at a molecular level – 100 years of progress,” *Mol Metab*, vol. 52, p. 101304, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101304.
- [68] Y. H. Lee, J. Giraud, R. J. Davis, and M. F. White, “c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 5, pp. 2896–2902, Jan. 2003, doi: 10.1074/jbc.M208359200.
- [69] P. Puthanveetil, A. Wan, and B. Rodrigues, “FoxO1 is crucial for sustaining cardiomyocyte metabolism and cell survival,” *Cardiovasc Res*, vol. 97, no. 3, pp. 393–403, Mar. 2013, doi: 10.1093/cvr/cvs426.
- [70] L. Harling, J. Lambert, H. Ashrafiyan, A. Darzi, N. J. Gooderham, and T. Athanasiou, “Pre-operative serum VCAM-1 as a biomarker of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting,” *J Cardiothorac Surg*, vol. 12, no. 1, p. 70, Dec. 2017, doi: 10.1186/s13019-017-0632-2.
- [71] A. J. King, “The use of animal models in diabetes research,” *Br J Pharmacol*, vol. 166, no. 3, pp. 877–894, Jun. 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.
- [72] J. D. Symons *et al.*, “Contribution of Insulin and Akt1 Signaling to Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Regulation of Endothelial Function and Blood Pressure,” *Circ Res*, vol. 104, no. 9, pp. 1085–1094, May 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.189316.
- [73] J. Ren, N. N. Wu, S. Wang, J. R. Sowers, and Y. Zhang, “Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications,” *Physiol Rev*, vol. 101, no. 4, pp. 1745–1807, Oct. 2021, doi: 10.1152/physrev.00030.2020.
- [74] A. Heydemann, “An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus.,” *J Diabetes Res*, vol. 2016, p. 2902351, 2016, doi: 10.1155/2016/2902351.
- [75] D. A. Fontaine and D. B. Davis, “Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium.,” *Diabetes*, vol. 65, no. 1, pp. 25–33, Jan. 2016, doi: 10.2337/db15-0982.
- [76] S. J. Jackson *et al.*, “Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes.,” *Lab Anim*, vol. 51, no. 2, pp. 160–169, Apr. 2017, doi: 10.1177/0023677216653984.
- [77] Jackson Laboratory, “Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice A Jackson Laboratory Resource Manual,” *Jackson Laboratory*, 2007.
- [78] H. Kim, M. Kim, S.-K. Im, and S. Fang, “Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes,” *Lab Anim Res*, vol. 34, no. 4, p. 147, 2018, doi: 10.5625/lar.2018.34.4.147.
- [79] S. Hu *et al.*, “Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes Adiposity in Mice.,” *Cell Metab*, vol. 28, no. 3, pp. 415–431.e4, 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.010.

7. Anexos

7.1 Figuras suplementarias.

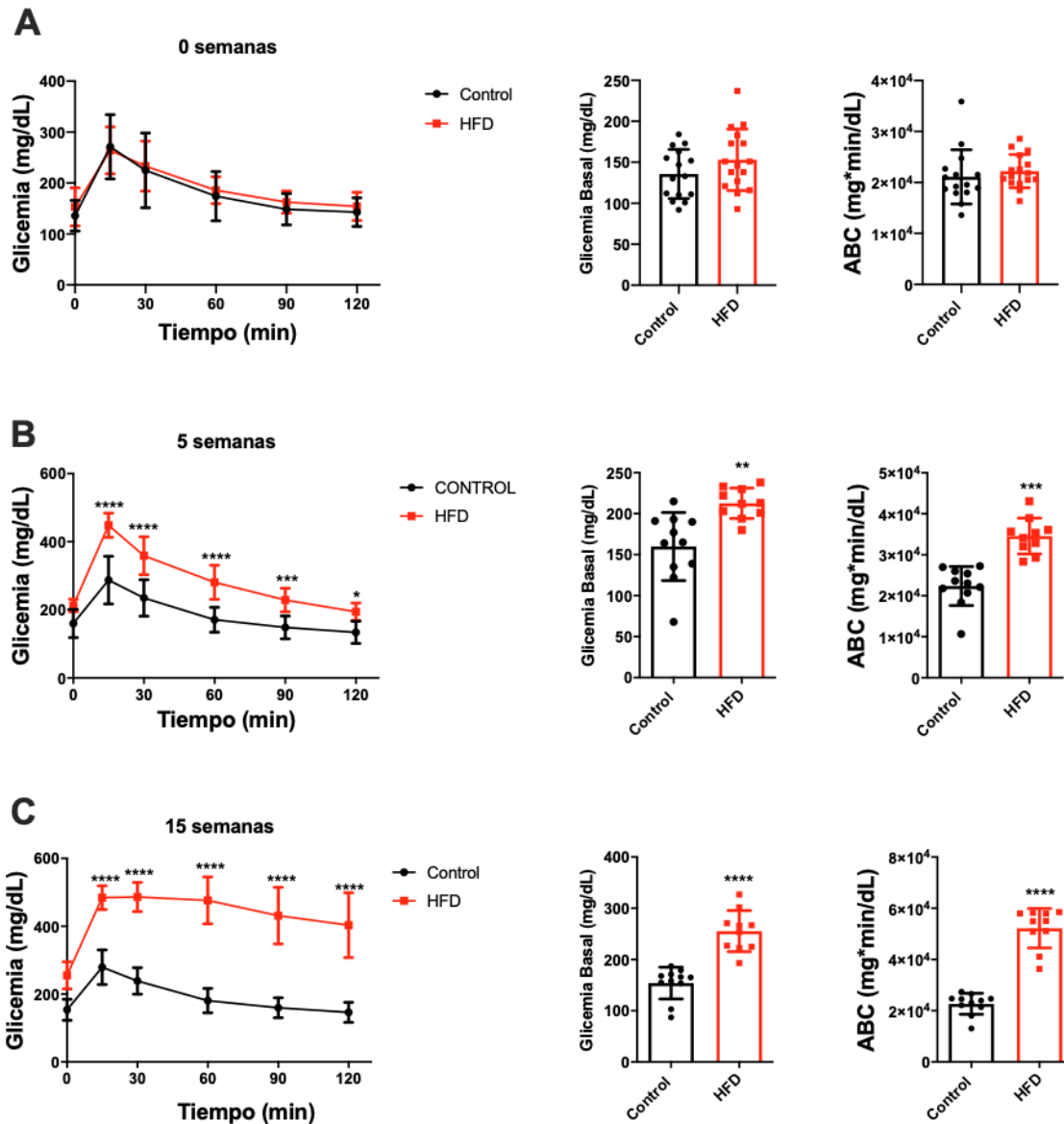


Figura Suplementaria 1: Dieta alta en grasas por 25 semanas induce intolerancia a la glucosa. Animales C57BL/6N machos de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta alta en grasas (HFD) durante 25 semanas para luego realizar test de tolerancia a la glucosa a las semanas correspondientes. Los animales se ayunaron por 6 h, se les midió la glicemia basal y luego se administró una carga de glucosa de 1 g/Kg intraperitoneal para medir la glicemia durante 120 min. La curva de glicemia, glicemia basal y área bajo la curva (ABC) se presentan al (A) inicio del tratamiento, (B) 5 semanas, (C) 15 semanas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ analizado por t-test. $n = 9/15$ animales por grupo.

Partidor Sentido (exón 7)

Mus musculus domesticus strain 129 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1) gene, complete cds, alternatively spliced

GenBank: AH000820.2
GenBank FASTA

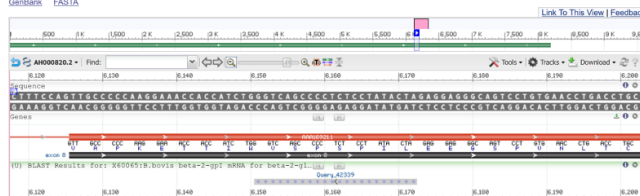


5'- CCCACCATTGAAGATACCGGGA -3'

Partidor Anti-sentido (exón 8)

Mus musculus domesticus strain 129 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1) gene, complete cds, alternatively spliced

GenBank: AH000820.2
GenBank FASTA



5'- TAGTATAGGAGAGGGGCTGACC -3'

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.

Figura Suplementaria 2: PARTIDORES PARA VCAM-1. Los partidores utilizados en esta tesis están validados para reconocer el mRNA de VCAM-1. La secuencia del mRNA que se amplifica corresponde a un secuencia entre el exón 7 y el exón 8.

Anti-VCAM1 antibody [EPR5047] ab134047

KO VALIDATED

Recombinant

RabMAb

<https://www.abcam.com/vcam1-antibody-epr5047-ab134047>

Product name	Anti-VCAM1 antibody [EPR5047]
Description	Rabbit monoclonal [EPR5047] to VCAM1
Host species	Rabbit
Tested applications	Suitable for: WB, IP, IHC-P, Flow Cyt (Intra), ICC/IF, ELISA
Species reactivity	Reacts with: Mouse, Rat, Human, Synthetic fragment
Immunogen	Synthetic peptide within Mouse VCAM1 aa 700 to the C-terminus. The exact sequence is proprietary. Database link: P29533 (Peptide available as ab156177)

[Product datasheet](#)

VCAM1 peptide ab156177

ORIGIN

```
1 mpvkmvavlg astvlwilfa vsqafkieis peyktiaqig dsmaltcstt gcesplfswr
61 tqidsplnak vrtegsksvl tmevsvfene hsyldtatcg sgklersihv diysfpkdpe
121 iqfsgplevg kpvtvkclap diyvpyrlei dlfdgdqlmn rqefsseemt ksletkslev
181 tftpviedig kalvcraklh idqidstlke retvkelqvy isprnttisv hpstrlqegg
241 avtmtcsseg lpapeifwgr kldnevlqll sgnatltlia mrmesdgvvyv cegvnligrd
301 kaevelvvqe kpfivdispg sqvaaqvgds vvltaaaigc dspsfswrtq tdsplngvvr
361 negakstlvl ssvgfehehs ylcavtclqr tlekrqtqev ysfpedpvik msgplvhgrp
421 vtvnctvpnv ypdfhleiel lkgettlmkk yfleemgiks letkiletff iptiedtgks
481 lvclarlhsg emesepkqrq svqplyvnva pkettiwvsp spileegspv nltcssdgip
541 apkilwsrql nngelqplse nttlftmstk rddsgiyvce gineagisrk sveliiqvsp
601 kdiqltvfps ksvkegdvti isctcgvnpe twiilkkkak tgdmlksvd gsytirqaql
661 qdagiyeces ktevgqlrs ltlvkgkeh nkdyfspell alycasslvi paigmivyfa
721 rkanmkgsys lveaqskv
```

//

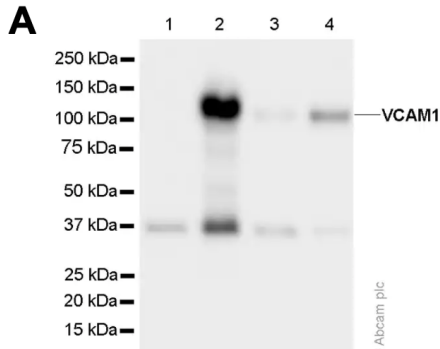
13 aa → c-terminal

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

Description

Product name	VCAM1 peptide
Purity	> 90 % n/a.
Accession	P19320
Animal free	No
Nature	Synthetic
Additional sequence information	CKGSYSLVEAQKSKV

Figura Suplementaria 3: ANTICUERPO VCAM-1 ABCAM EPR5047 Ab134047. Búsqueda de antígeno inmunógeno para el anticuerpo utilizado en este trabajo de tesis para los experimentos de Inmuno-Blot. El antígeno utilizado corresponde a un péptido sintético basado en el péptido ab156177 con una secuencia informada correspondiente a los 13 últimos aminoácidos de la proteína en el dominio C-terminal.



Western blot - Anti-VCAM1 antibody [EPR5047] (ab134047)

All lanes : Anti-VCAM1 antibody [EPR5047] (ab134047) at 1/1000 dilution

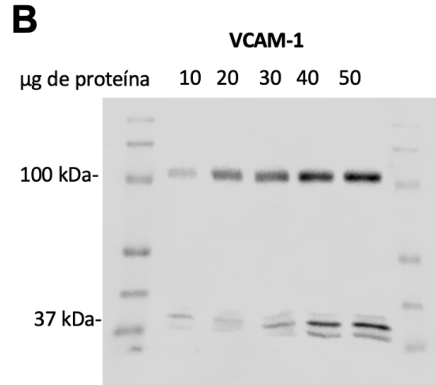
Lane 1 : HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) whole cell lysate

Lane 2 : HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) treated with 10 ng/ml TNF-a for 16 h, whole cell lysate

Lane 3 : bEnd.3 (Mouse brain endothelioma) whole cell lysate

Lane 4 : bEnd.3 (Mouse brain endothelioma) treated with 10 µg/ml LPS for 24 h, whole cell lysate

<https://www.abcam.com/vcam1-antibody-epr5047-ab134047>



Western Blot- Anti- VCAM-1 antibody (EPR5047) (ab134047)

Línea 1: Muestra ratón WT con 10 ug de proteína

Línea 2: Muestra ratón WT con 20 ug de proteína

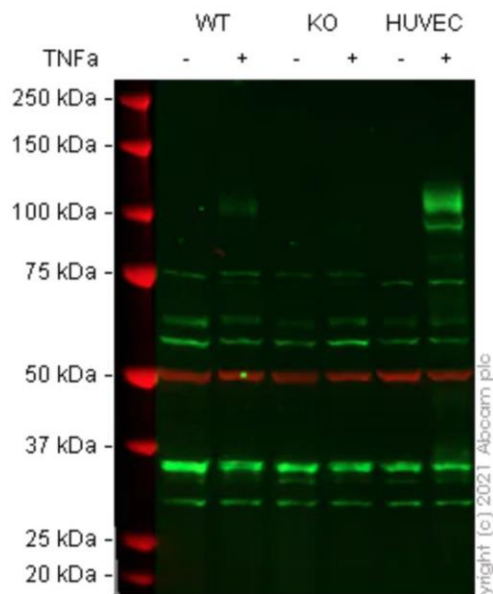
Línea 3: Muestra ratón WT con 30 ug de proteína

Línea 4: Muestra ratón WT con 40 ug de proteína

Línea 5: Muestra ratón WT con 50 ug de proteína

Estandarización anticuerpo VCAM-1 Mayarling Troncoso

Figura Suplementaria 4: ANTICUERPO VCAM-1 ABCAM EPR5047 Ab134047 y estandarización con muestras de ratón de la tesis de Mayarling Troncoso. (A) Inmuno-Blot de VCAM-1 informado por el fabricante. (B) Inmuno-blot realizado en muestras de corazón de ratón obtenidas por Mayarling Troncoso. Las muestras fueron corridas en concentraciones ascendentes de 10-50 µg de proteína. En ambos casos se observa la banda esperada de 100 kDa, sin embargo, existe la presencia de una banda de 37 kDa no específica ni de secuencia conocida.



Western blot - Anti-VCAM1 antibody [EPR5047] (ab134047)

All lanes : Anti-VCAM1 antibody [EPR5047] (ab134047) at 1/2000 dilution

Lane 1 : Wild-type A549 cell lysate

Lane 2 : Wild-type A549 TNF-a treated (10 ng/mL, 16h) cell lysate

Lane 3 : VCAM1 knockout A549 cell lysate

Lane 4 : VCAM1 knockout A549 TNF-a treated (10 ng/mL, 16h) cell lysate

Lane 5 : HUVEC cell lysate

Lane 6 : HUVEC TNF-a treated (16 ng/mL, 16h) cell lysate

Lysates/proteins at 30 µg per lane.

Performed under reducing conditions.

Predicted band size: 81 kDa

Observed band size: 105 kDa

**Todas las muestras son humanas
Deberían presentar las isoformas 7-Ig y 6-Ig
KO-muestra presenta banda a 37 kDa.**

<https://www.abcam.com/vcam1-antibody-epr5047-ab134047>

Figura Suplementaria 5: ANTICUERPO VCAM-1 ABCAM EPR5047 Ab134047 validación con células KO por abcam. Inmuno-Blot de VCAM-1 informado por el fabricante en muestras humanas. Se observa la banda esperada de 100 kDa aproximadamente y el bandeo inespecífico en los 37 kDa. Las muestras KO presentan la banda a 37 kDa, por lo que sería una marca inespecífica del anticuerpo.

A Quantikine® ELISA

No entrega información del antígeno

Mouse VCAM-1/CD106 Immunoassay

The Quantikine® Mouse VCAM-1/CD106 Immunoassay is a 4.5 hour solid phase ELISA designed to measure mouse VCAM-1 levels in cell culture supernates, serum, and plasma. It contains NS0-expressed recombinant mouse VCAM-1 and antibodies raised against the recombinant protein. Results obtained for natural mouse VCAM-1 showed linear curves that were parallel to the standard curves obtained using the Quantikine® kit standards. These results indicate that this kit can be used to determine relative mass values of natural mouse VCAM-1.

B

R&D SYSTEMS
a biotechne brand

Recombinant Mouse VCAM-1/CD106

Fc Chimera

Catalog Number: 643-VM

DESCRIPTION				
Source	Mouse myeloma cell line, NS0-derived mouse VCAM-1/CD106 protein			
	Met	Mouse VCAM-1 (Phe25-Glu698) Accession # CAA47989	IEGRMD	Human IgG ₁ (Pro100-Lys330)
	N-terminus			6-His tag
	N-terminus			C-terminus
N-terminal Sequence	Met			
Analysis				
Structure / Form	Disulfide-linked homodimer			
Predicted Molecular Mass	101.9 kDa (monomer)			

<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets>

Anticuerpo policlonal para proteína completa... ?

C Mouse VCAM-1/CD106 Biotinylated Antibody Summary

Species Reactivity	Mouse
Specificity	Detects mouse VCAM-1/CD106 in Western blots. In this format, approximately 10% cross-reactivity with recombinant human VCAM-1 under non-reducing conditions is observed.
Source	Polyclonal Goat IgG
Purification	Antigen Affinity-purified
Immunogen	Mouse myeloma cell line NS0-derived recombinant mouse VCAM-1/CD106 Phe25-Glu698 Accession # CAA47989
Formulation	Lyophilized from a 0.2 µm filtered solution in PBS with BSA as a carrier protein.
Label	Biotin

Figura Suplementaria 6: ELISA MOUSE VCAM-1 R&D SYSTEM. (A) ELISA KIT utilizado para la determinación de VCAM-1 soluble en plasma de los animales utilizados en la tesis. El kit no especifica los aminoácidos que reconoce el anticuerpo. (B) Se encuentra en la misma página de R&D System. un péptido recombinante para VCAM-1 el cual está compuesto por Phe25-Glu698. (C) También se encuentra el anticuerpo creado a base del péptido recombinante mencionado, por lo que se estima que el kit ELISA podría contener este anticuerpo.

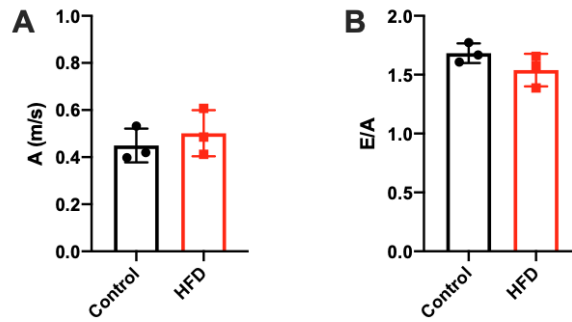


Figura Suplementaria 7: Parámetros ecocardiografía diastólica 25 semanas. (A) Onda A (contracción auricular). (B) Relación E/A. No se observaron cambios significativos.

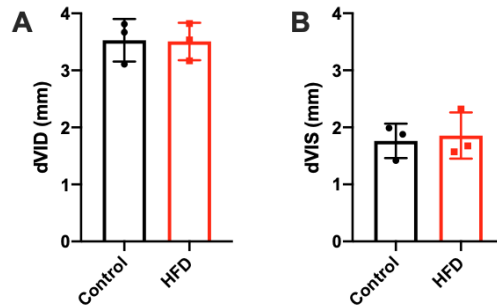


Figura Suplementaria 8: Parámetros ecocardiografía sistólica 25 semanas. (A) Diámetro del ventrículo izquierdo en diástole (dVID). (B) Diámetro del ventrículo izquierdo en sístole (dVIS). No se observaron cambios significativos.

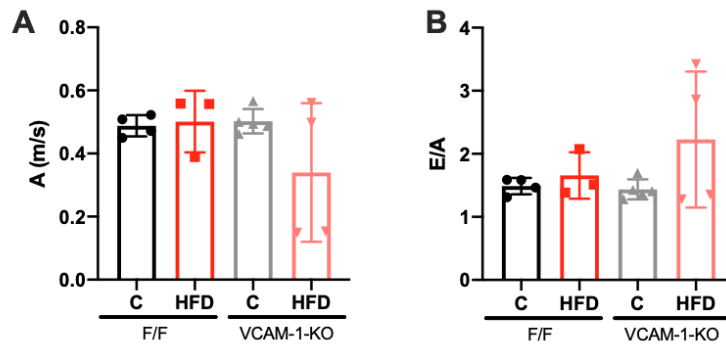


Figura Suplementaria 9: Parámetros ecocardiografía diastólica 25 semanas. (A) Onda A (contracción auricular). (B) Relación E/A. n=3/11 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. No se observaron cambios significativos.

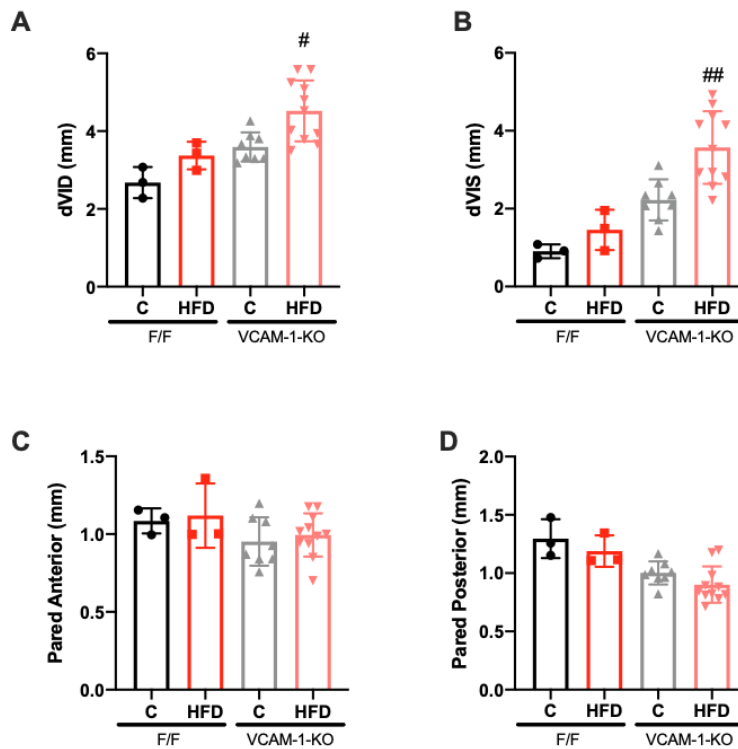


Figura Suplementaria 10: Parámetros ecocardiografía sistólica 25 semanas. (A) Diámetro del ventrículo izquierdo en diástole (dVID), (B) Diámetro del ventrículo izquierdo en sístole (dVIS), (C) Pared Anterior, (D) Pared posterior. n=3/11 animales por grupo. Los datos fueron analizados por 2way-ANOVA. #p<0,05, ##p<0,01 comparado con VCAM-1-KO Control.

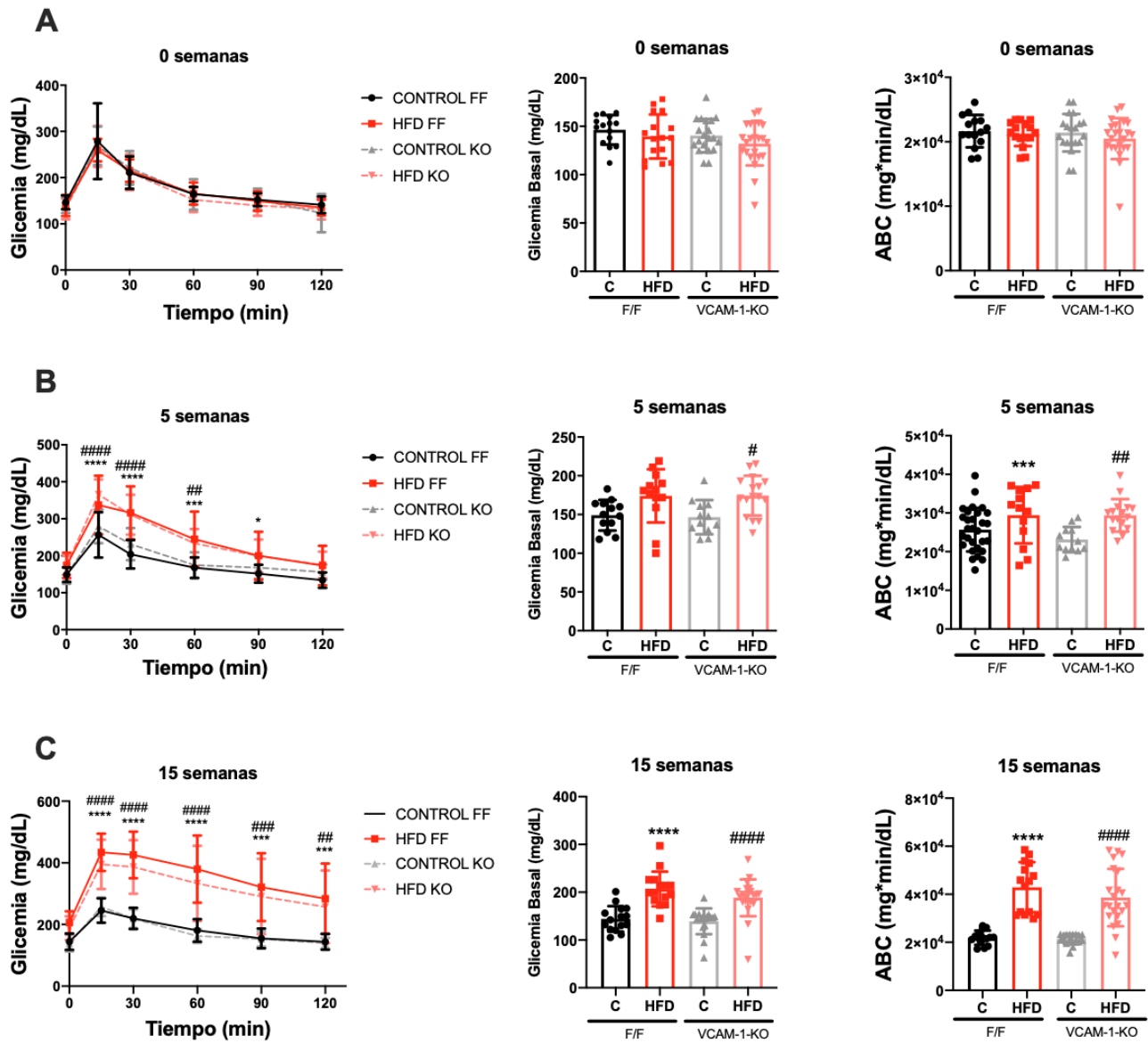


Figura Suplementaria 11: c-VCAM-1-KO no presenta cambios significativos en test de tolerancia a la glucosa en condiciones de dieta alta en grasas. Animales machos C57BL/6N VCAM-1 F/F y c-VCAM-1-KO de 10 semanas de edad se alimentaron con dieta control y dieta alta en grasas (HFD). A las 25 semanas de edad se realizó el test de tolerancia a la glucosa (6 horas de ayuno, 1 g/kg de glucosa), en donde se muestra la curva de glicemia, glucosa basal y área bajo a curva (ABC) para cada tiempo evaluado: **(A)** 0 semanas, **(B)** 5 semanas, **(C)** 15 semanas. n=17/24 animales por grupo. Los datos se analizaron por 2way-ANOVA. ***p<0,01, ****p<0,0001 comparado con F/F Control; #p<0,05, ##p<0,01, #####p<0,0001 comparado con VCAM-1-KO Control.