

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA



TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS PROTECTORES DE LA ENFERMEDAD
CARDIOVASCULAR: REGULACIÓN DE
MARCADORES INFLAMATORIOS CARDÍACOS Y
PREVENCIÓN DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL
ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO**

IGNACIO HERNÁNDEZ NAVARRO

DIRECTOR

DR. CARLOS ZARAGOZA SÁNCHEZ

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA, MEDICINA Y CIENCIAS BIOSANITARIAS

Pozuelo de Alarcón, 2024

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

D. Carlos Zaragoza Sánchez, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Francisco de Vitoria y Doctor en Genética por Universidad Complutense de Madrid, como director

AUTORIZA

El depósito, presentación y defensa de la presente tesis doctoral titulada *“MECANISMOS PROTECTORES DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: REGULACIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS CARDÍACOS Y PREVENCIÓN DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO”* realizada por el doctorando D. Ignacio Hernández Navarro.

En Madrid, a 5 de Julio de 2024

Fdo: Dr. Prof. Carlos Zaragoza Sánchez

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long vertical stroke extending upwards from the right side.

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORAL.
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS BIOSANITARIAS
UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA

De acuerdo con el informe correspondiente autorizado por el director de tesis y cumpliendo con la normativa aprobada por el Órgano Responsable del Programa de Doctorado, esta tesis doctoral se presenta en formato tradicional. El trabajo está basado en el artículo científico publicado el 12 de marzo de 2021 en la revista *International Journal of Molecular Sciences (MDPI)*, con el título:

- Hernandez, I., Tesoro, L., Ramirez-Carracedo, R., Diez-Mata, J., Sanchez, S., Saura, M., Zamorano, J. L., Zaragoza, C., & Botana, L. (2021). *Ivabradine Induces Cardiac Protection against Myocardial Infarction by Preventing Cyclophilin-A Secretion in Pigs under Coronary Ischemia/Reperfusion. International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2902. <https://doi.org/10.3390/IJMS22062902>

*“Juego, luego soy: el estilo de jugar es un modo de ser, que revela el perfil propio de cada comunidad y afirma su derecho a la diferencia. **Dime cómo juegas y te diré quién eres**”*

Eduardo Galeano

El Fútbol a Sol y Sombra (1995)

AGRADECIMIENTOS

Quien me conoce sabe que soy una persona que se comunica mejor a través de gestos que con las propias palabras. Sin embargo, hay un cualidad que, aparentemente absurda, para mi es una valiosa herramienta para poder expresarme: soy capaz de asociar cualquier tema o tópico al fútbol, una de las pasiones de mi vida. Si me lo permiten, me tomaré la licencia de demostrarlo en los siguientes párrafos.

En primer lugar, gracias, Dr. Carlos Zaragoza, mil millones de gracias por darme la oportunidad de entrar en tu equipo sin dudarlo siquiera, desde el primer intercambio de mensajes en aquel noviembre de 2016. Gracias, míster, por prestarme mil y una veces tu apoyo, por saber siempre sacar lo mejor de mí, dejarme jugar con los grandes, contar con tu palmada en la espalda cuando fallaba y ayudarme a seguir peleando, por confiar en mi cuando ha habido un problema (ojalá hubiesen sido pocas veces) y por seguir poniéndome de titular para demostrar de lo que soy capaz. Míster, aunque este título es de todos, tú eres uno de los grandes responsables de haberlo conseguido.

Tampoco puedo olvidar otro pilar clave en este trabajo: gracias a la Dr. Marta Saura, por todas las posibilidades y opciones que me has ofrecido durante el desarrollo de este largo viaje, por todos los consejos que me has dado para hacerme mejor persona y, por supuesto, mejor investigador, siempre dándome instrucciones desde la banda para que pueda llegar a ser un verdadero profesional. Has sido una gran referente para mí, Marta.

A Javi, mi central: duro, robusto, un poco grandote para mi gusto, pero, sobre todo, amigo, y hermano. Siempre guardándome la espalda. Siempre que he fallado un pase, me has levantado del suelo y: “¡déjate de tonterías!”. ¡Menudo defensa central! Siempre animándome desde que nos conocimos aquella primera vez en el pasillo del laboratorio y entramos en este equipazo. Por todo eso y mucho más, gracias, mi 4.

A Rafa, mi mediocampista: jugón, versátil, todo lo que haces te salen bien. Perezoso a la hora de correr por la mañana a primera hora del entrenamiento, pero siempre ahí, dándome cualquier pase y haciéndome mejor investigador. Ha sido muy fácil jugar a tu lado. Gracias, amigo, gracias por ser como eres, gracias, mi dorsal 8.

A Laura, *killer*: no fallas ni un solo gol. Gracias por enseñarme una cosa: “*No perdones, muerde*”. Desde que estás en el equipo todo ha mejorado. Siempre echándome la bronca, pero sabiendo que lo hacías por mí, porque necesitaba tus palabras para madurar y mejorar, por lo que estaré agradecido el resto de mi vida. Entenderás lo siguiente: hemos conseguido “el gol de todos”. Gracias, amiga, mi 9.

A Laura Botana: la pausa, la tranquilidad, saber guardar el resultado. Gracias por enseñarme a mantener la calma cuando más la necesitaba. Gracias por recordarme siempre cual es mi posición en el campo cuando me despistaba. Me has enseñado dónde tengo que estar en el momento exacto. Por todo, gracias, mi número 6.

A Bea, Nunzio y Claudia, la nueva generación: juveniles que suben al primer equipo. Gracias a los tres por hacerme sentir joven, por darme esa energía cuando más me fallaba, cuando no podía correr más y vosotros lo hacías por mí. A pesar de que os parezca un abuelo, quiero agradeceros las cosas que habéis hecho por mí. Ojalá os haya podido enseñar algo de esta profesión, siempre ha sido una de mis prioridades. Mil gracias, mis *cachorros*.

A María, Alberto y Sandra, me gustaría compartir también esto con vosotros. Vuestra disponibilidad siempre ha sido cercana, siempre me he sentido parte del equipo alcalaíno. A Elena, por todas la veces que me has aguantado pidiéndote el balón, qué paciencia.

Al servicio de Cirugía Experimental del IdiPaz, en Madrid, dirigido por una de las mejores entrenadoras que he podido conocer. Mil gracias, Carlota, por todo tu apoyo, por brindarme siempre libertad para mejorar como investigador e inculcarme el respeto por el bienestar animal. Dar gracias a Isa, Mar y Sonsoles por vuestra hospitalidad siempre que nos presentábamos allí.

Por otro lado, este título siempre ha tenido una afición que nunca ha dejado de cantar por mi: MI FAMILIA.

Gracias a mis padres, Patri e Isa, por ir a verme a cada uno de los partidos que he tenido que jugar durante toda mi vida. Siempre habéis estado en el otro lado de la valla. Nunca me habéis dejado solo; si me lesionaba, ahí para curarme, si perdía, mi apoyo y mi fuerza. Me habéis enseñado a ser quien soy hoy y a lo que aspiro a ser mañana: una buena persona. Ojalá os devuelva todo el cariño que me habéis regalado siempre, nunca me habéis fallado, soy la persona más afortunada del mundo. A mi hermano, Marcos, por enseñarme a ser un pícaro, a diferenciar lo bueno y lo no tan bueno, por cuidarme, mi hinchita favorito, nunca dejaste de ser el hermano mayor y así me lo has demostrado.

Por último, pero no menos importante, a Marta, mi *hooligan*: Llegaste justo al inicio de este largo partido y, desde aquel momento, no has fallado ni una. Con toda tu energía contagiosa, que no es poca, me has llevado de la mano al destino. Gracias por vivirlo conmigo y con los miles de animales (seres queridos) que tenemos. Y, por descontado, con todo lo nuevo que llegará.

Se que me dejo a mucha gente sin nombrar, que ha participado en menor o mayor medida en este gran campeonato. A todas aquellas que lo han hecho, me encantaría compartirlo también con todos vosotros.

Índice

ÍNDICE

GLORARIOS DE ABREVIATURAS.....	23
RESUMEN.....	29
SUMMARY.....	35
INTRODUCCIÓN.....	41
BLOQUE I. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN	44
1.1. Inflamación: ¿Qué es y por qué sucede?.....	44
1.2. Base molecular de la respuesta inflamatoria.....	45
1.3. Principales componentes de la respuesta inflamatoria.....	45
1.4. Dianas moleculares conocidas con aplicación clínica.....	46
BLOQUE II. INFLAMACIÓN Y SÍNDROME CORONARIO.....	47
2.1 Síndrome coronario. Manifestación clínica y clasificación.....	47
2.1.1. Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCACEST)	48
2.1.2. Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST).....	48
2.1.3. Shock cardiogénico	49
2.1.4. Angina microvascular: Síndrome de disfunción microvascular.....	49
2.2 Respuesta inflamatoria frente al síndrome coronario	49
2.2.1. Papel de los receptores TLR en respuesta a la isquemia	52
2.2.2. Cascada de señalización inflamatoria. Efecto sobre la matriz extracelular. Principales dianas moleculares.....	52
2.2.3. EMMPRIN, su ligando Ciclofilina A y las metaloproteinasas de matriz extracelular en la degradación de la matriz del miocardio frente a la isquemia.....	52
2.2.4. Ciclofilina A y EMMPRIN como diana terapéutica frente al infarto agudo de miocardio. Caso Práctico.....	54

BLOQUE III: INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS.....	56
3.1. Aterosclerosis y su manifestación clínica.....	57
3.1.1. Etiología y fases de la formación de la placa de ateroma. Inflamación sistémica.....	57
3.2. El endotelio vascular.....	58
3.2.1. Función del endotelio vascular.....	60
3.2.2. Papel del óxido nítrico en el tono vascular.....	61
3.2.3. Disfunción endotelial.....	64
3.2.4. Desacoplamiento de la eNOS.....	64
3.3. Senescencia y aterosclerosis asociada a la edad.....	66
3.3.1. Respuesta inflamatoria asociada a la senescencia. Papel del complejo Ciclofilina/EMMPRIN en la respuesta senescente..	67
 BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS.....	 68
4.1. Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP).....	68
4.2. CAP-1: un nuevo componente hallado en las EVs asociados a la edad.....	70
4.3. Papel del complejo PCSK9/CAP1 en el reciclado de los receptores para LDL en el hígado.....	70
 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	 74
 MATERIALES Y MÉTODOS	 80
1. Reactivos	82
2. Modelo de animales de infarto agudo de miocardio y aterosclerosis	83
2.1. Modelo porcino de infarto agudo de miocardio.....	83
2.2. Modelo murino de aterosclerosis.....	84
3. Valoración de la función cardíaca mediante ecocardiografía	85
4. Cultivos celulares.....	86
5. Ensayo de senescencia β -galactosidasa.....	86
6. Toma, procesado y análisis histológico de muestras.....	87

6.1.	Valoración del Infarto Agudo de Miocardio (IAM) mediante tinción Evans Blue.....	87
6.2.	Extracción de sangre y aislamiento de plasma.....	88
6.3.	Aislamiento de vesículas extracelulares	88
6.4.	Histología y tinción Oil Red O	88
6.5.	Inmunohistoquímica	89
6.6.	Inmunofluorescencia	90
7.	Análisis de las proteínas del estudio	90
7.1.	Obtención, cuantificación y análisis de proteína.....	90
7.2.	Detección de proteínas Western Blot (Inmunoblot).....	91
7.3.	Inmunoprecipitación	92
7.4.	Análisis proteómico de las vesículas extracelulares	92
8.	Cuantificación de cofactores mediante ELISA	92
9.	Estudio de la expresión de ácidos nucleicos	93
9.1.	Aislamiento de ARN y PCR-RT.....	93
9.2.	Silenciamiento de CAP1 en HAEC y CAEC	93
9.3.	Transfección del plásmido CAP1 en HAEC y CAEC	93
10.	Estudio Humano.....	94
11.	Análisis estadístico.....	94

RESULTADOS.....97

BLOQUE I y II. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y SÍNDROME CORONARIO.....99

1.	La Ivabradina induce cardioprotección en un modelo porcino de Isquemia/Reperfusión miocárdica.....	101
2.	La Ivabradina aumenta la expresión de Ciclofilina A en los corazones de cerdos tras la Isquemia/Reperfusión.....	101
3.	La Ivabradina reduce los niveles de Ciclofilina A en el plasma de los animales tras la Isquemia/Reperfusión miocárdica.....	102
4.	La Ivabradina promueve el complejo entre Ciclofilina A y las formas bajamente glicosiladas de EMMPRIN (LG-EMMPRIN).....	103
5.	La Ivabradina reduce la secreción de Ciclofilina A en células cardiacas.....	104

6. La Ivabradina disminuye la degradación lisosomal del CyPA en células cardiacas.....106

BLOQUE III. INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS.....109

1. Los cultivos celulares de endotelio vascular de Aorta y arteria coronaria son utilizados como modelo denominado de senescencia replicativa.109
2. La ausencia de Óxido Nítrico (NO) endotelial se asocia con la Disfunción Endotelial asociado a la Senescencia Endotelial.....110
3. La Senescencia Endotelial induce el desacoplamiento de la eNOS en HAEC y CAEC.....112
4. Los radicales Superóxido y Peroxinitrito se ven incrementados durante la Disfunción Endotelial asociada a la Senescencia Endotelial.....114
5. La Senescencia Endotelial induce la expresión de marcadores de inflamación en las células senescentes.....116

BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE ATEROSCLEROSIS.....122

1. Los ratones ApoE^{-/-} añosos promueven el desarrollo de la aterosclerosis.122
2. Las EVs aisladas de ratones ApoE^{-/-} añosos inducen SE en HAEC y CAEC.....124
3. Las EVs circulantes de ratones ateroscleróticos muestran una firma proteómica asociada al envejecimiento y al metabolismo lipídico...124
4. CAP1 está asociada a la Senescencia Endotelial en aterosclerosis 127
5. CAP1 promueve la Senescencia Endotelial en HAEC y CAEC.....129
6. Las EVs aisladas de ApoE^{-/-} que contienen CAP1 promueven la aterosclerosis y la Senescencia Endotelial en Aorta de ratones Wild Type.....130
7. Las EVs de ratones ateroscleróticos promueven la formación de depósitos de calcio en Ratones ApoE^{-/-}.....133

Índice

8. CAP1 está diferencialmente expresada en endarterectomías carotídeas humanas de pacientes Jóvenes vs Ancianos.....	134
DISCUSIÓN.....	138
BLOQUE I y II. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y SÍNDROME CORONARIO	140
BLOQUE III. INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS.....	143
BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE ATEROSCLEROSIS.....	146
CONCLUSIONES.....	150
BIBLIOGRAFÍA.....	157
ANEXO.....	183
Artículos científicos como primer autor.....	185
Producción científico durante la presente tesis doctoral.....	187

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

Abreviaturas

3-NT: 3-Nitrotirosina

ACV: Accidente Cerebrovascular

AIM2: Ausencia en Melanoma tipo 2 (*Abstent in Melanoma 2*)

AINEs: Antiinflamatorios No Esteroides

ApoE: Apolipoproteína E

CAEC: Células Endoteliales de arteria Coronaria Humana

cAMP: Adenosín Monofosfato Cíclico

CAP1: Proteína Asociada a Ciclasa 1 (*Ciclase Associated Protein-1*)

Cav3: Caveolina 3

CCR2: Recetor de quimioquinas C-C tipo 2 (*C-C chemokine receptor type 2*)

CD14: Clúster de Diferenciación 14

CE: Células Endoteliales

CI: Cardiopatía Isquémica

COX: Ciclooxygenasa

CRP: Proteína C Reactiva (*C Reactive Protein*)

CyPA: Ciclofilina A

DA: Descendiente Anterior

DAMPS: Receptores de Reconocimiento de Patrones Asociados a Daño (*Damage-associated molecular pattern molecules*)

DE: Disfunción Endotelial

DHFR: Dihidrofolato Reductasa

DMSO: Dimetil Sulfóxido

ECG: Electrocardiograma

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

ECVA: Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica

EDRF: Factor Relajante Derivado del Endotelio (*Endothelium-derived Relaxing Factor*)

EEA1: Proteína 1 asociada a endosoma temprana (*Early Endosome-Associated protein 1*)

EMMPRIN: Inductor de las Metaloproteinasas de Matriz Extracelular (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer*)

eNOS: Óxido Nítrico Sintasa Endotelial

EO: Estrés Oxidativo

ESC: Sociedad Europea de Cardiología (*Society European Cardiology*)

EVs: Vesículas Extracelulares (*Vesicles Extracellular*)

FC: Frecuencia Cardíaca

FEVI: Fracción de Eyección Ventricular Izquierda

FRCV: Factores de Riesgo Cardiovasculares

Abreviaturas

- FRDE:** Factor Relajante Derivado del Endotelio
- FS:** Fracción de Acortamiento (*Fractional Shortening*)
- GC:** Gasto Cardíaco
- GCs:** Guanilato Ciclasa Soluble
- GMPc:** Guanosín Monofosfato Cíclico
- GTPCH I:** Guanosin Trisfosfato-Ciclohidrolasa I
- HAEC:** Células Endoteliales de arteria Aorta Humana
- HCN4:** Canal de Nucleótidos Cíclicos activados por Hiperpolarización 4
(*Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 4*)
- HSP90:** Proteína de Choque Térmico 90 (*Heat Shock Protein 90*)
- IAM:** Infarto Agudo de Miocardio
- IC:** Insuficiencia Cardíaca
- ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular 1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*)
- IFR β :** Interferón- β
- IL-1:** Interleucina-1
- IL-10:** Interleucina-10
- IL-6:** Interleucina-6
- ILK:** Quinasa Ligada a Integrinas (*Integrin Linked Kinase*)
- iNOS:** Óxido Nítrico Sintasa Inducible
- IVS:** Intraventricular Telediastólico
- IVUS:** Ultrasonido Intravascular (*Intravascular Ultrasound*)
- KLF2:** Factor 2 tipo Kruppel (*Kruppel Like Factor 2*)
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*)
- LDLc:** LDL circulante
- LDLox:** LDL oxidado
- LDLr:** Receptor de LDL
- LVID:** Diámetro Interno del Ventrículo Izquierdo al final de la Diástole y la Sístole
- LVPW:** Grosor de la Pared Posterior del Ventrículo Izquierdo en Telediastole y Telesístole
- MEC:** Matriz Extracelular
- MMPs:** Metaloproteinasas de Matriz Extracelular
- MVs:** Microvesículas
- NF-kappa-B:** Factor Nuclear *kappa* B (*Nuclear Factor kappa B*)
- NOX:** NADPH Oxidasa
- PAMPS:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*)
- PCSK9:** Proteína Convertasa Subtilisina/Kexina Tipo 9

Abreviaturas

- PECAM-1:** Molécula-1 de adhesión Celular (*Platelet Endothelial Cell adhesion Molecule-1*)
- PFA:** Paraformaldehído
- PGI₂:** *Prostaciclina 2*
- PKG:** Proteína Kinasa dependiente de GMPc
- PRRs:** Receptores de Reconocimiento de Patrones (*Pattern Recognition Receptors*)
- RIG-I:** receptores semejantes al gen inducible de ácido retinoico (*Retinoic Acid-Inducible Gene-I-like receptors*)
- ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
- SASP:** Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*)
- SC:** Shock Cardiogénico
- SCA:** Síndrome Coronario Agudo
- SCACEST:** Síndrome Coronario Agudo Con Elevación del Segmento ST
- SCASEST:** Síndrome Coronario Agudo Sin Elevación del Segmento ST
- SE:** Senescencia Endotelial
- SNARE:** Receptores de Proteínas de Fijación Soluble de NSF (*Soluble NSF Attachment Protein) REceptor*)
- TLR:** receptores tipo TOLL (*Toll Like Receptor*)
- TLR4:** receptor tipo Toll 4 (*Toll Like Receptor 4*)
- TNF- α :** Factor de Necrosis Tumoral alfa (*Tumoral Necrosis Factor alfa*)
- TTC:** Cloruro de Trifeniltetrazolio
- VAMP1:** Proteína de Membrana Asociada a Vesícula 1 (*Vesicle Associated Membrane Protein 1*)
- VCAM-1:** Molécula-1 de adhesión celular vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)
- VEGF:** Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
- VI:** Ventrículo Izquierdo
- VILs:** Vesículas Intraluminales
- VSMCs:** Células del Músculo Liso Vascular (*Vascular Smooth Muscle Cells*)

Abreviaturas

Resumen

RESUMEN

Resumen

La inflamación es una respuesta biológica del sistema inmunológico desencadenada por patógenos o insultos fisiopatológicos, con el objetivo de reparar los tejidos afectados, aunque de no resolverse adecuadamente, puede contribuir al desarrollo de complicaciones, entre las que incluimos la aterosclerosis o el infarto agudo de miocardio. Como ejemplo clave para el desarrollo de la presente tesis, y enmarcado en el Primer Bloque del trabajo, en respuesta a la necrosis miocárdica se desata una respuesta inflamatoria que desemboca en un proceso de remodelado cardiaco cuya severidad podrá condicionar la vida del paciente como veremos con posterioridad. Este escenario inflamatorio provoca cambios bioquímicos y morfológicos destinados a mantener niveles adecuados de perfusión tisular, que de no resolverse a tiempo pueden conducir al desarrollo de complicaciones más severas como shock cardiogénico. De entre todos los factores implicados, en este trabajo describimos el papel que desempeña EMMPRIN (Extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer), proteína cuya expresión se dispara durante la respuesta inflamatoria tras la isquemia, activador de Metaloproteinasas de Matriz Extracelular (MMPs) y, por tanto, favorece la degradación de la matriz miocárdica. A este respecto, consideramos clave en el desarrollo de la presente tesis doctoral, la presencia de otro de los factores pro-inflamatorios clave en el sistema cardiovascular como es la denominada Ciclofilina A (CyPA), habiendo esta sido descrita como el ligando natural de EMMPRIN, lo que dota si cabe aún más, de novedoso nuestro trabajo, al ser este un importante complejo poco explorado en el contexto de la fisiopatología cardiovascular. Nosotros proponemos que el complejo CyPA/EMMPRIN es uno de los mecanismos clave durante la necrosis miocárdica que se desencadena en respuesta a la isquemia. A este respecto, y gracias a investigaciones previas de nuestro laboratorio, quisimos testar la eficacia de un fármaco inicialmente diseñado como agente bradicardizante como es la Ivabradina. En un modelo de shock cardiogénico evaluamos la capacidad del fármaco como agente cardioprotector, basándonos en su capacidad bradicardizante. De hecho, la Ivabradina fue diseñada inicialmente como fármaco bradicardizante por antagonizar con HCN4, canal de sodio y principal elemento de la corriente marcapasos *I_f*, promoviendo de esta manera un cronotropismo negativo y reduciendo así la frecuencia cardiaca. Sin embargo, los hallazgos obtenidos nos indujeron a considerar que, además de su contribución bradicardizante, la Ivabradina podría tener propiedades adicionales en la cardioprotección. Así pudimos comprobar que además la Ivabradina es capaz de inhibir la secreción de CyPA en el modelo porcino de isquemia/reperfusión cardiaca y, por tanto, la unión a EMMPRIN, lo que previene de la degradación de la matriz extracelular y por ende la necrosis miocárdica. Gracias a nuestra investigación, por tanto, aportamos por vez primera una nueva funcionalidad de la Ivabradina como agente cardioprotector frente al IAM, y, por ello reductor de la

Resumen

insuficiencia cardiaca aguda que surge tras la isquemia miocárdica, proponiendo además, al complejo CyPA/EMMPRIN como una nueva diana terapéutica en respuesta a la inflamación miocárdica.

En el contexto de la enfermedad cardiovascular inflamatoria, el fenómeno de la Disfunción Endotelial (DE), es una de las principales causas del envejecimiento vascular asociado a la edad. La DE se define como la pérdida de la función vasorelajante dependiente del endotelio, proceso que conlleva un incremento en la adhesión monocitaria y agregación plaquetaria en el vaso. Un endotelio proadherente y proagregante es un endotelio disfuncional, primer paso para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial y la aterosclerosis. Como principal responsable de la DE cabe destacar el papel de la Sintasa de Óxido Nítrico Endotelial (eNOS), por el cese de la producción de Óxido Nítrico (NO), principal vasorelajante y por tanto mantenedor del tono vascular. De entre los mecanismos por los que eNOS es disfuncional, es clave su desacoplamiento del complejo con el enzima Quinasa Ligada a Integrinas (ILK) y la Proteína de Choque Térmico 90 (Hsp90), proceso tras el cual eNOS contribuye significativamente a la generación de estrés oxidativo, al producir en gran medida anión superóxido. Además, para una correcta funcionalidad, eNOS ha de interactuar con el cofactor Tetrahidrobiopterina (BH4), hasta tal punto que, la no biodisponibilidad de BH4, y/o su oxidación a BH2 impiden la producción de NO, a favor de la generación de anión superóxido, contribuyendo así al incremento del Estrés Oxidativo y por ende la DE. Nuestro trabajo ha evidenciado que el fenómeno de la Senescencia Endotelial (SE) surge asociada al Estrés Oxidativo en endotelio humano arterial y coronario como hemos evidenciado en ensayos de SE replicativa en estos tipos celulares, fenómeno directamente asociado como hemos demostrado al desacoplamiento de eNOS, generando más Estrés Oxidativo, lo que supone la oxidación de BH4 y por ello, su no biodisponibilidad para la producción de NO a favor de anión superóxido, fenómeno que nuestro abordaje experimental ha demostrado la activación una vez más de la cascada inflamatoria CyPA/EMMPRIN en el endotelio senescente, con la consiguiente activación de MMPs, y por tanto, la degradación de la matriz extracelular.

La SE es un fenómeno que se inicia con la detención temprana del ciclo celular endotelial y cursa en respuesta entre otros estímulos, al incremento sostenido de las distintas formas de estrés oxidativo y nitrosativo en el tiempo, proceso por el cual, el envejecimiento cronológico, la senescencia y el disparo con la edad de determinadas enfermedades cardiovasculares van de la mano. La SE desencadena el denominado

Resumen

Patrón Secretor Asociado a la Senescencia (SASP), un fenotipo celular específico que induce la liberación de Vesículas Extracelulares (EVs, del inglés *Extracellular Vesicles*) conteniendo proteínas y ácidos nucleicos capaces de ejercer un efecto biológico, fenómeno que sucede durante la progresión de una de las enfermedades de mayor prevalencia como es la aterosclerosis. Mediante el uso de un modelo murino de aterosclerosis, nosotros, hemos identificado una proteína asociada a las EVs de animales envejecidos de elevado interés por ser clave como cofactor de PCSK9 en la inhibición del reciclado de receptores para LDL y por tanto con un papel decisivo en aterosclerosis. La Proteína Asociada a Ciclasa 1 (CAP1), es importante recalcar su presencia como integrante de EVs exclusivamente de ratones envejecidos ateroscleróticos deficientes para ApoE, habiendo demostrado su contribución en SE en endotelio coronario y aórtico humano, en donde su silenciamiento retrasa el fenómeno senescente, mientras que la sobreexpresión en células silenciadas restaura la SE perdida en su ausencia. Más aún, la administración de EVs que contienen CAP1 en ratones deficientes para ApoE jóvenes, acelera de manera significativa el desarrollo de la placa de ateroma, fenómeno independientemente de PCSK9, ya que su inhibición farmacológica no revierte el efecto prosenescente de CAP1.

Todo lo mencionado anteriormente nos permite concluir que la respuesta inflamatoria es clave para el desarrollo y progresión de enfermedades como el infarto agudo de miocardio y la aterosclerosis, en donde la CyPA puede ser considerada como una diana molecular para, al menos la prevención de los efectos deletéreos, como así hemos demostrado en el caso de la Ivabradina, cuyo efecto sobre CyPA es capaz de frenar el desarrollo de la isquemia miocárdica, así como en el caso de la SE asociada al fenómeno de DE, en donde CyPA/EMMPRIN vuelve a jugar un papel determinante en el fenómeno asociado a la aterosclerosis.

Palabras Clave: Infarto Agudo de Miocardio (IAM), EMMPRIN, Ciclofilina A, CAP1, Senescencia Endotelial, Aterosclerosis.

Summary

SUMMARY

Summary

Summary

Inflammation is a biological response of the immune system triggered by pathogens or pathophysiological insults, with the aim of repairing the affected tissues, although if it does not resolve adequately, it can contribute to the development of complications, including atherosclerosis or acute myocardial infarction. As a key example for the development of the present thesis, and framed in the First Block of the work, in response to myocardial necrosis, an inflammatory response is unleashed that leads to a cardiac remodeling process whose severity can condition the patient's life, as we will see later. This inflammatory scenario causes biochemical and morphological changes intended to maintain adequate levels of tissue perfusion, which, if not resolved in time, can lead to more severe complications such as cardiogenic shock. Among all the factors involved, in this work we describe the role played by EMMPRIN (Extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer), a protein whose expression is triggered during the inflammatory response after ischemia, an activator of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and, therefore, promotes myocardial matrix degradation. In this regard, we consider key in the development of the present doctoral thesis, the presence of another key pro-inflammatory factor in the cardiovascular system, known as Cyclophilin A (CyPA), having this been described as the natural ligand of EMMPRIN, which makes our work even more novel, being this an important complex little explored in the context of cardiovascular pathophysiology. We propose that the CyPA/EMMPRIN complex is one of the key mechanisms during myocardial necrosis triggered in response to ischemia. In this regard, and thanks to previous investigations from our laboratory, we wanted to test the efficacy of a drug initially designed as a bradycardic agent, Ivabradine. In a model of cardiogenic shock, we evaluated the drug's capacity as a cardioprotective agent, based on its bradycardic capacity. In fact, Ivabradine was initially designed as a bradycardic drug by antagonizing HCN4, a sodium channel and main element of the If pacemaker current, thereby promoting a negative chronotropism and thus reducing heart rate. However, the findings obtained led us to consider that, in addition to its bradycardic contribution, Ivabradine could have additional properties in cardioprotection. We could thus verify that Ivabradine is also capable of inhibiting the secretion of CyPA in the porcine model of cardiac ischemia/reperfusion and, therefore, the binding to EMMPRIN, which prevents the degradation of the extracellular matrix and thus myocardial necrosis. Thanks to our research, therefore, we contribute for the first time a new functionality of Ivabradine as a cardioprotective agent against AMI, and, therefore, as a reducer of acute heart failure that arises after myocardial ischemia, also proposing the CyPA/EMMPRIN complex as a new therapeutic target in response to myocardial inflammation.

Summary

In the context of inflammatory cardiovascular disease, the phenomenon of Endothelial Dysfunction (ED), is one of the main causes of age-associated vascular aging. ED is defined as the loss of endothelium-dependent vasorelaxant function, a process that leads to an increase in monocyte adhesion and platelet aggregation in the vessel. A pro-adherent and pro-aggregant endothelium is a dysfunctional endothelium, the first step for the development of cardiovascular diseases such as arterial hypertension and atherosclerosis. As the main responsible for ED, it is important to highlight the role of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), due to the cessation of Nitric Oxide (NO) production, the main vasorelaxant and therefore maintainer of vascular tone. Among the mechanisms by which eNOS is dysfunctional, its uncoupling from the Integrin-Linked Kinase (ILK) and Heat Shock Protein 90 (Hsp90) enzyme complex is key, a process after which eNOS significantly contributes to the generation of oxidative stress, by producing a large amount of superoxide anion. Additionally, for correct functionality, eNOS must interact with the cofactor Tetrahydrobiopterin (BH4), to such an extent that the unavailability of BH4, and/or its oxidation to BH2, prevent the production of NO, in favor of superoxide anion generation, thus contributing to the increase of Oxidative Stress and therefore ED. Our work has evidenced that the phenomenon of Endothelial Senescence (ES) arises associated with Oxidative Stress in human arterial and coronary endothelium as we have evidenced in replicative ES assays in these cell types, a phenomenon directly associated as we have demonstrated to the uncoupling of eNOS, generating more Oxidative Stress, which implies the oxidation of BH4 and therefore its unavailability for NO production in favor of superoxide anion, a phenomenon that our experimental approach has demonstrated once again activates the CyPA/EMMPRIN inflammatory cascade in senescent endothelium, with the consequent activation of MMPs, and therefore, the degradation of the extracellular matrix.

ES is a phenomenon that begins with the early arrest of the endothelial cell cycle and occurs in response, among other stimuli, to the sustained increase of different forms of oxidative and nitrosative stress over time, a process by which chronological aging, senescence, and the onset of certain age-related cardiovascular diseases go hand in hand. ES triggers the so-called Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP), a specific cellular phenotype that induces the release of Extracellular Vesicles (EVs) containing proteins and nucleic acids capable of exerting a biological effect, a phenomenon that occurs during the progression of one of the most prevalent diseases, atherosclerosis. Using a murine model of atherosclerosis, we have identified a protein associated with EVs from aged animals of great interest for being key as a cofactor of PCSK9 in inhibiting the recycling of LDL receptors and therefore with a decisive role in

Summary

atherosclerosis. The Cyclase-Associated Protein 1 (CAP1), is important to emphasize its presence as an EV component exclusively from aged atherosclerotic ApoE-deficient mice, having demonstrated its contribution in ES in human coronary and aortic endothelium, where its silencing delays the senescent phenomenon, while overexpression in silenced cells restores the lost ES in its absence. Moreover, the administration of EVs containing CAP1 to young ApoE-deficient mice significantly accelerates the development of the atheroma plaque, a phenomenon independent of PCSK9, as its pharmacological inhibition does not reverse the pro-senescent effect of CAP1.

All the aforementioned allows us to conclude that the inflammatory response is key to the development and progression of diseases such as acute myocardial infarction and atherosclerosis, where CyPA can be considered a molecular target for at least preventing the deleterious effects, as we have demonstrated in the case of Ivabradine, whose effect on CyPA is capable of halting the development of myocardial ischemia, as well as in the case of SE associated with the phenomenon of ED, where CyPA/EMMPRIN once again plays a determinant role in the phenomenon associated with atherosclerosis.

Keywords: **Acute:** Myocardial Infarction (AMI), EMMPRIN, Cyclophilin A, CAP1, Endothelial Senescence, Atherosclerosis.

Summary

INTRODUCCIÓN

Introducción

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), aquellas que abarcan trastornos del corazón y del sistema vascular, representan hoy en día un desafío multifactorial para la salud. A principios del siglo XX, las enfermedades infecciosas prevalecían como principales causas de muerte, hasta que la investigación biomédica y la farmacología cambiaron este escenario. Sin embargo, a lo largo del tiempo las ECV han ascendido al primer puesto en términos de mortalidad. A pesar de ello, recientes avances en tratamientos y diagnóstico en la salud cardiovascular han logrado moderar este incremento, lo que resalta la crucial importancia de la investigación y el desarrollo en este campo (Liberale et al., 2022; Flora et al., 2019; Tesoro et al., 2024; Saura et al., 2022.; Rosselo et al., 2019.;Fuster et al., 2012; Egido et al., 2011).

Las ECV son hoy en día la principal causa de muerte en el mundo, en especial en los países desarrollados. Han ido desplazando a otro tipo de patologías, como las que se asocian al aparato respiratorio o incluso por delante del cáncer, hasta el punto de que desde la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) se estima que, en el año 2022, más de 17,9 millones de personas perdieron la vida por la ocurrencia de al menos un evento cardiovascular, haciendo especialmente hincapié en que aproximadamente un tercio afecta a las personas menores de 70 años (ESC., 2022). Por lo tanto, la investigación cardiovascular desempeña un papel crucial en nuestra sociedad, con el fin de disminuir la carga de atención médica, mejorar la calidad de vida de los pacientes, y en especial reducir el envejecimiento prematuro para mantener una buena salud cardiovascular. De todas las ECV, la cardiopatía isquémica (CI) y el accidente cerebrovascular (ACV) son las que tienen la mayor incidencia de mortalidad en todo el mundo. La CI representa aproximadamente el 12% de los fallecimientos atribuidos a ECV, mientras que el ACV supone alrededor del 17%, teniendo ambas patologías un origen común en **la inflamación (Figura 1)**.

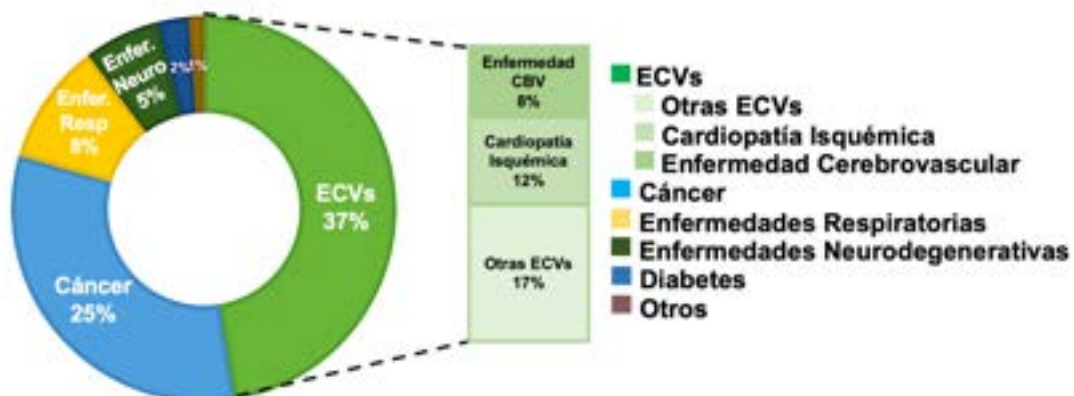


Figura 1. Principales causas de fallecimiento en Europa en el año 2023

Introducción

Hoy en día manejamos un nivel significativo de factores de riesgo cardiovascular (FRCV), características mensurables que aumentan las probabilidades de desarrollar ECV. El riesgo cardiovascular se ve influenciado por la acumulación de diferentes efectos en cada individuo y pueden ser medidos o no según su naturaleza. Existen ciertos hábitos como la obesidad, el tabaquismo o el sedentarismo, que afectan directamente a la salud de la persona. Sin embargo, existen otros factores no modificables, entre los que se encuentran el sexo, la raza, antecedentes familiares y en especial relevancia en la presente tesis doctoral, la **edad cronológica** del paciente (Rysz et al., 2021; Nakamura et al., 2023). Aun así, disponer de dianas moleculares con capacidad diagnóstica y/o de progresión de la enfermedad, es una de las tareas de mayor auge en especial en lo que se refiere a la inflamación subyacente y, como hemos mencionado, denominador común de un número significativo de ECVs.

BLOQUE I. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN

1.1 INFLAMACIÓN: ¿QUÉ ES Y POR QUÉ SUCEDE?

La inflamación es una respuesta compleja y multifacética del sistema inmunológico a diversos estímulos nocivos, incluyendo patógenos, células dañadas, compuestos tóxicos o procesos fisiopatológicos (Franceschi & Campisi., 2016). Esta respuesta durante su fase aguda se activa con el objetivo de eliminar los agentes lesivos y facilitar el inicio de la reparación tisular. Sin embargo, su desregulación puede conducir hacia un proceso cronicado en el tiempo, efecto que subyace en la etiología de un número elevado de complicaciones de diversa naturaleza, entre las que podemos destacar numerosas enfermedades crónicas, tales como la artritis reumatoide (Brown et al., 2024), distintos tipos de cáncer (Korniluk et al., 2017), y en especial relevancia para esta tesis doctoral, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Sorriento & Iaccarino et al., 2019; Christopher Glass & Witztum., 2001). A nivel molecular, la inflamación sucede y se caracteriza por una serie de eventos que incluyen cambios bioquímicos en la permeabilidad vascular, que conllevan al reclutamiento y activación leucocitarias, y la liberación de mediadores químicos, incluyendo citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias (Alfaddagh et al., 2020; Oronsky et al., 2022). Entender los mecanismos subyacentes que promueven la respuesta inflamatoria, así como caracterizar en profundidad el mayor número de dianas moleculares de la misma y su regulación, es fundamental para crear estrategias terapéuticas que controlen las enfermedades inflamatorias y optimicen los resultados clínicos.

1.2 Base molecular de la respuesta inflamatoria.

Ya hemos mencionado que el proceso inflamatorio es clave de cara al comienzo de la resolución del problema al que nos enfrentamos y aunque vital para la defensa del huésped contra infecciones y lesiones, también juega un papel clave en la patogénesis de diversas enfermedades crónicas (Margină et al., 2020). Las células del sistema **inmunológico innato**, como los **macrófagos y neutrófilos**, junto con las del sistema **inmunológico adaptativo**, incluyendo **linfocitos B y T**, interactúan con mediadores inflamatorios, siendo clave las **citoquinas y las proteínas de degradación tisular**. Este proceso se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares tanto asociados a patógenos (PAMPs), como de daño (DAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Libby et al., 2007; Herwald & Egesten., 2016). Tras su activación, la señalización resultante promueve la activación de distintos tipos de señales intracelulares que conllevan la expresión de genes proinflamatorios y la producción de mediadores inflamatorios. Estas moléculas no solo contribuyen a la progresión de la enfermedad, sino que también participan en procesos como la generación de fibrosis, el remodelado tisular y la ocurrencia de estrés oxidativo. Por todos estos motivos, llegar a intentar comprender en su mayor medida los mecanismos que dan lugar al fenómeno inflamatorio, es esencial para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan predecir la mayor o menor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad a nivel subclínico.

1.3 Principales componentes de la respuesta inflamatoria.

El objetivo principal de la respuesta inflamatoria es simple a priori: poder ser capaces de detectar y eliminar los factores que interfieren en la homeostasis. Una respuesta inflamatoria típica consta de cuatro componentes: los sensores de la inflamación (Gong et al., 2020), los inductores de la inflamación (Cavaillon., 2018), los mediadores inflamatorios (Abdulkhaleq et al., 2018) y los tejidos diana afectados (Hill et al., 2007). En cuanto al tipo y grado de respuesta inflamatoria activada depende de la naturaleza del desencadenante inflamatorio, siendo de distinto grado en función de si el disparo lo induce un patógeno bacteriano, viral, fúngico, o por el contrario es un mecanismo fisiopatológico, como la isquemia miocárdica (Francisco & Del Re., 2023; Tesoro et al., 2022) o el estrés oxidativo (Gambini & Stromsnes., 2022). Respecto a este último, en respuesta a un insulto inicial, se genera un aumento de secreción de proteínas, leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y en especial la secreción de monocitos circulantes (monocitos y macrófagos) en el tejido inflamado, constituyendo la primera línea de defensa inmunitaria (Freire & van Dyke., 2013; Chen et al., 2018). A esta primera infiltración de neutrófilos le sigue a continuación una rápida respuesta de las

Introducción

células centinela preseleccionadas en los tejidos en el momento de la lesión, incluidos macrófagos y mastocitos (Austermann & Barczyk-Kahlert). El detalle específico de la señalización intracelular la comentaremos con más precisión en la sección 2.2. de la presente Tesis Doctoral. Tras un evento inflamatorio como en el caso de un infarto agudo de miocardio, ocurren dos fases de infiltración monocitaria. La primera fase es impulsada por estímulos pro-inflamatorios originados en el tejido dañado, lo que provoca el reclutamiento y migración de monocitos periféricos con un fenotipo pro-inflamatorio. Estos monocitos, conocidos como monocitos clásicos o pro-inflamatorios, se caracterizan por la expresión de marcadores específicos en su membrana, como el clúster de diferenciación 14 (CD14). Un marcador adicional de estos monocitos pro-inflamatorios es el receptor de quimioquinas C-C tipo 2 (en inglés, *CCR2*). Estos monocitos migran al tejido lesionado y se diferencian en macrófagos o células dendríticas, amplificando la señal inflamatoria. Su infiltración permite la continua liberación del Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), Óxido Nítrico (NO) y proteasas desde el inicio. La segunda fase de infiltración monocitaria es menos intensa y facilita el cese de la inflamación, contribuyendo a la recuperación del tejido, de la que hablaremos posteriormente más detalle (Fioranelli et al., 2021; Tesoro et al., 2022).

1.4 Dianas moleculares inflamatorias conocidas con aplicación clínica

Las dianas moleculares en la inflamación clínica son consideradas pilares fundamentales para la comprensión y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Estas dianas incluyen una variedad de moléculas, desde citoquinas proinflamatorias hasta receptores de superficie celular y factores de transcripción, claves en la regulación de la respuesta inflamatoria (Margină et al., 2020). Valga como ejemplo, el éxito conseguido bloqueando las citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ mediante terapias biológicas, incluyendo el uso de fármacos como el infliximab, etanercept, adalimumab, todos ellos anticuerpos contra la proteína, con éxito en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades entre las que se incluyen la colitis ulcerosa, la sarcoidosis, la enfermedad injerto contra huésped, la enfermedad de Still del adulto, algunas vasculitis sistémicas, lupus eritematoso sistémico y la enfermedad de Behçet (Marshall., 2004). Asimismo, la modulación de receptores de superficie celular como los receptores tipo Toll (TLR, del inglés Toll Like Receptors) (descritos más adelante) ha emergido como una estrategia muy prometedora para regular la respuesta inflamatoria en diversas patologías cardíacas, incluyendo el infarto agudo de miocardio (Ramirez-Carracedo., 2020) y más recientemente, el uso de aptámeros como el denominado ApTOLL contra TLR4 están ofreciendo en ensayos clínicos una ventana terapéutica muy prometedora contra el Ictus de origen isquémico

Introducción

(Hernandez-Jimenez et al., 2023). Además, la comprensión en profundidad de los factores de transcripción, como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), factor de transcripción proinflamatorio por excelencia, ha abierto nuevas vías para intervenir en la cascada de señalización inflamatoria (Liu et al., 2017). Sin embargo, y a pesar de los avances en la investigación, aún no se ha desarrollado un protocolo de actuación que nos permita un tratamiento eficaz para gestionar adecuadamente la respuesta inflamatoria (Liberale et al., 2021; Cohen et al., 2021). En este contexto, la búsqueda continua de nuevos marcadores biológicos representa una oportunidad única para mejorar la comprensión y el manejo del paciente.

BLOQUE II. INFLAMACIÓN Y SÍNDROME CORONARIO.

2.1 Síndrome coronario: Manifestación clínica y clasificación.

El suministro de oxígeno y nutrientes al corazón comienza en la raíz aórtica donde surgen las arterias coronarias, que se dividirán en las dos ramas principales derecha e izquierda. Estas arterias se ramifican en vasos más pequeños, y en particular, la arteria coronaria izquierda se desdobra a su vez en la coronaria descendente anterior (DA), que suple a la cara anterolateral del corazón, y la coronaria circunfleja, que aporta sangre a un pequeño tramo anterior, lateral y tramo posterior ventrículo izquierdo. La arteria DA se ramifica en diagonales y septales, que se dirigen hacia la parte apical y septal respectivamente del ventrículo izquierdo, proporcionando así irrigación sanguínea a la mayor parte de este ventrículo (Nohria & Viera., 2024; Thiene et al., 2021) (**Figura 2**).

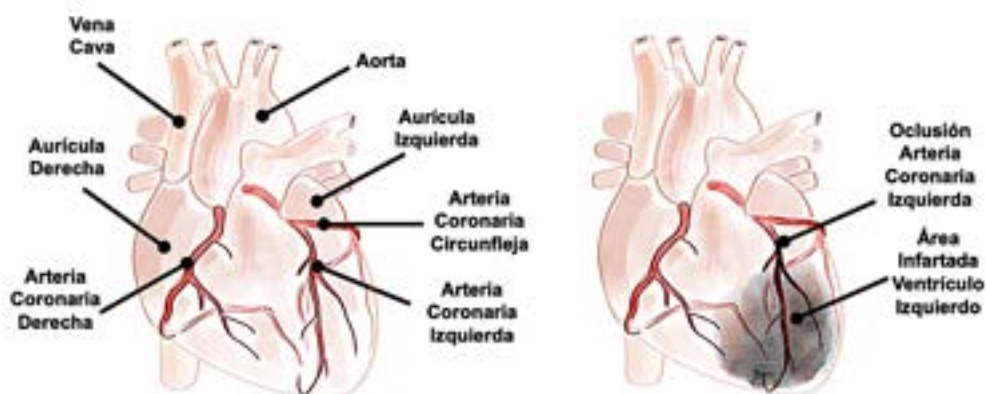


Figura 2. Anatomía coronaria e Infarto Agudo de Miocardio (AMI)

Unas de las patologías inflamatorias de mayor prevalencia es el denominado Síndrome Coronario Agudo (SCA). El SCA se origina debido a la oclusión de la luz coronaria que tiene lugar, de manera más frecuente, como consecuencia de la ruptura o erosión de una placa de ateroma vulnerable y/o la generación de un trombo intracoronario tras la

Introducción

rotura dando lugar al fenómeno oclusivo, que tiene como consecuencia la interrupción total o parcial del flujo sanguíneo, generando así la necrosis miocárdica (Krittanawong et al., 2023). Las manifestaciones clínicas más significativas del SCA incluyen como comienzo el dolor torácico anginoso intenso, que puede irradiar al brazo izquierdo, cuello, y mandíbula izquierda, acompañado de una fuerte disnea en reposo y/o náuseas (Devon et al., 2020). El análisis ecocardiográfico nos desvela que existen dos tipos de SCA: los que presentan un trazado con elevación del segmento ST o SCACEST y aquellos que cursan sin la elevación del segmento ST o SCASEST. Mientras que el SCACEST se caracteriza por una oclusión aguda total de la/s arteria/s coronaria/s, el SCASEST cursa con la oclusión parcial coronaria que da lugar a la sintomatología anteriormente mencionada (Martinez et al., 2022).

2.1.1 Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCACEST)

El SCACEST es la forma más aguda de la enfermedad coronaria cuya manifestación fenotípica comprende la angina inestable, el infarto agudo de miocardio (IAM) o la muerte súbita cardíaca, en función de la severidad del daño, y, por tanto, se asocia a una gran morbilidad y mortalidad.

El IAM que se genera tras la oclusión de una o varias arterias coronarias en una sola localización o de manera multifocal, resulta en un fenómeno isquémico miocárdico transmural, siendo la causa más común la trombosis oclusiva que surge tras la ruptura de una o varias placas de ateroma intracoronarias. Clínicamente, la característica más específica ecocardiográfica cursa con ondas T hiperagudas, la elevación progresiva persistente del segmento ST (> 20 minutos), ondas Q patológicas (Reddy., 2015; Ibáñez et al., 2018; Jenča et al., 2021), junto con un descenso significativo de la presión arterial y, como analizaremos en una sección posterior, una de las complicaciones más significativas a medio plazo del IAM es el desarrollo de shock cardiogénico (Jung et al., 2021; Tesoro et al., 2021).

2.1.2 Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST)

A diferencia del SCACEST, el SCASEST incluye condiciones como la angina inestable principalmente causada por una oclusión parcial de una arteria coronaria, o bien por un vasoespasmo, un fenómeno embólico o la ocurrencia de arteritis coronaria, fenómeno este último que surge tras la inflamación arterial que puede llegar a ocluir la luz del vaso coronario (García-Blas et al., 2021; Collet et al., 2021). A diferencia del infarto agudo de

Introducción

miocardio con elevación del ST (IAM con elevación del ST), en el SCASEST la manifestación ecocardiográfica más común es la depresión del segmento ST acompañada o no, de una inversión de la onda T (Medvegy et al., 2011; Cohen et al., 2020) (**Figura 3**).

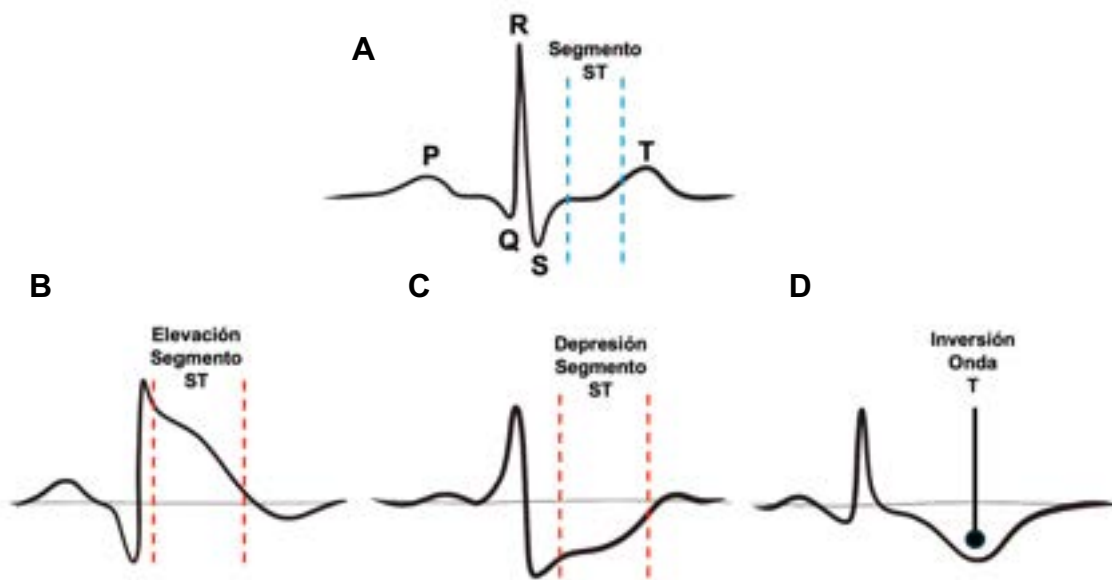


Figura 3 . Características electrocardiográficas (ECG) del SCACEST y SCASEST. A. ECG sin patología; B. SCACEST con elevación del segmento ST; C. SCASEST con depresión del segmento ST; D. SCASEST con inversión onda T.

2.1.3 Shock cardiogénico.

El shock cardiogénico (SC) es una complicación grave y con una elevada mortalidad que puede suceder como consecuencia de un IAM. Se caracteriza por una disminución aguda de la funcionalidad cardiaca, lo que resulta en una perfusión tisular inadecuada y una ineficiente oxigenación a los tejidos. Esta disfunción cardiaca puede dar lugar a una cascada de eventos adversos, incluyendo la fuerte hipotensión arterial, oliguria, acidosis láctica y disfunción multiorgánica, y en el peor de los casos la muerte del paciente (Geppert et al., 2002). Este hecho diferencial obliga a que, tras un IAM, se lleve a cabo una evaluación exhaustiva del paciente para asegurar sin lugar a duda la correcta perfusión tisular, función cardiaca y abordar finalmente las causas subyacentes del por qué ha surgido este suceso (Tewelde, Liu & Winters., 2018; Samsky et ., 2021). Paralelamente a este fenómeno, debido a la falta de perfusión tisular correcta puede desencadenarse lo que se conoce como la disfunción microvascular.

2.1.4 Angina microvascular: Síndrome de disfunción microvascular coronaria.

En las dos últimas décadas, la acumulación de pruebas ha demostrado que las anomalías estructurales y funcionales de la microvasculatura coronaria son causa de diversas enfermedades cardiovasculares. La disfunción microvascular coronaria, inicialmente conocida por síndrome X, se podría definir como la alteración funcional en los vasos de menos de 500 μm que pueden ocluirse y generar de esta forma el fenómeno isquémico sin ningún tipo de oclusión de las coronarias principales, razón por la cual, tras un catererismo rutinario muchas personas eran dadas de alta debido a que, el dolor anginoso referido por los pacientes, especialmente mujeres, no se correspondía con la oclusión coronaria en la fluoroscopia (Reis et al., 2001). Los posibles mecanismos de la disfunción microvascular parecen ser heterogéneos, e incluyen el aumento de la reactividad y resistencia vasoconstrictora coronaria a nivel microvascular, así como el deterioro de las capacidades vasodilatadoras dependientes del endotelio. Existen varios moduladores inflamatorios que pueden incidir en este fenómeno, ya sean moleculares, como el deterioro del glucocálix de las células coronarias, o factores exógenos, como la fuerza de cizalla (*shear stress*) o el propio ritmo cardiaco (Feuer et al., 2022; Sucato et al., 2022). Aunque existe técnicas de imagen como el ultrasonido intravascular (IVUS), que permite caracterizar el interior de los vasos sanguíneos, o por ejemplo mediante la obtención de imágenes de un Angiotac aplicando el algoritmo Z-score Calcio, el cual valora la cantidad de placa de ateroma o la concentración de calcio dentro del vaso, la disponibilidad limitada de estas pruebas de manera rutinaria prácticamente obliga a la búsqueda de nuevos biomarcadores asociados a este fenómeno, lo cual podría representar una gran ventaja para un diagnóstico precoz.

2.2 Respuesta inflamatoria frente al síndrome coronario.

La restauración del tejido cardíaco tras el SCA implica la eliminación de células muertas y la reparación de los daños, buscando restablecer la homeostasis tisular. Sin embargo, la eficacia de este proceso inflamatorio depende de su propia actividad, ya que un exceso de inflamación puede provocar la extensión del daño hacia el tejido sano, lo que resulta en un remodelado cardíaco adverso. Durante este proceso, se producen dos fases de infiltración monocitaria: la primera es impulsada por estímulos pro-inflamatorios y metabólicos generados en el tejido dañado, provocando el reclutamiento de monocitos periféricos circulantes pro-inflamatorios. Estos monocitos expresan marcadores específicos entre los que se incluyen CD14, CCR2 o marcadores de la inflamación como NF-kappa-B, el cual desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias, como

Introducción

TNF- α o interleucina-6 (IL-6) (Berezin et al., 2020; Ong et al., 2018). Todo ello tiene como consecuencia el disparo de toda una batería de proteínas y enzimas inflamatorias, entre las que destacamos en esta Tesis Doctoral a EMMPRIN (**E**xtracellular **M**atrix **M**etallo**P**roteinase **I**nducer) que, como veremos más adelante, es el factor clave en la degradación de la matriz extracelular del corazón como consecuencia de la isquemia miocárdica (Ramirez-Carracedo et al., 2022; Tarin et al., 2011).

La segunda fase de infiltración monocitaria es menos intensa y permite el cese de la inflamación y la recuperación tisular. La funcionalidad de los TLR también es fundamental debido a su vínculo molecular clave entre las respuestas innatas y adaptativas, regulando la intensidad de las cascadas de inflamación, entre otros niveles de actuación, regulando la funcionalidad del inmunomodulador Interferón- β (IFN β) (Vilahur et al., 2011; Ramirez-Carracedo et al., 2020; Tesoro et al., 2022), además del aumento de la expresión del enzima Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) como mediador clave de inflamación (Reventun et al., 2017). Con todo ello, podemos afirmar que el sistema cardiovascular debe estar estrechamente conectado con el sistema inmunológico para asegurar una respuesta rápida y eficaz frente a un evento isquémico, evitando así un remodelado cardíaco adverso y preservando de esta forma una adecuada la funcionalidad cardíaca.

2.2.1 Papel de los receptores TLR en respuesta a la isquemia.

De los distintos sensores que disponemos de reconocimiento de patrones de daño, los TLR constituyen el principal sensor de la isquemia coronaria. Son sensores de reconocimiento de membrana, conservados evolutivamente, que forman parte de la inmunidad innata (Kawasaki & Kawai et al., 2014). Detectan firmas moleculares específicas presentes en la superficie de los patógenos o en especial, durante procesos inflamatorios como la isquemia coronaria y, de todos ellos, el de mayor objeto de estudio durante el proceso isquémico por nuestro grupo de investigación es el receptor tipo Toll 4 (TLR4). TLR4 es una proteína de señalización transmembrana que actúa como el principal receptor de reconocimiento de patrones expresado por varios tipos celulares. Además de reconocer el lipopolisacárido bacteriano (Guijarro-Muñoz et al., 2014), TLR4 es capaz de identificar una variedad de ligandos que se liberan en respuesta a la isquemia/reperfusión miocárdica, que tras su activación se genera una cascada de señalización que culmina con la activación del factor de transcripción NF-kappa-B (Park et al., 2021). Esta activación conduce a la expresión de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , interleucina-1 β e interleucina-6, quimiocinas, el reclutamiento de linfocitos T llevando a la fase inflamatoria aguda y siendo una fuente de necrosis de

Introducción

células cardíacas, agravando así el escenario inflamatorio coronario (Bhattacharya et al., 2012; Ramirez-Carracedo et al., 2020; Frangogiannis et al., 2006).

Además de los receptores “Toll-like”, en menor medida también se activan los denominados receptores de Lectina tipo C, los receptores semejantes a ausencia de melanoma (AIM2), y los receptores semejantes al gen inducible de ácido retinoico (RIG-I-like) (Brubaker et al., 2015), todos ellos con capacidad de generar una respuesta inflamatoria en respuesta a la isquemia.

2.2.2 Cascada de señalización inflamatoria. Efecto sobre la matriz extracelular. Principales dianas moleculares.

La matriz extracelular (MEC) es una compleja red de proteínas y carbohidratos cuya misión es la de aportar soporte celular y tisular, así como la de contribuir a la correcta transmisión intracelular del órgano, constituyendo la parte no celular de los tejidos (Diaz de la Loza et al., 2024). Por este motivo, la MEC facilita la transmisión de estímulos mecánicos entre las células y el proceso de mecanotransducción, crucial para numerosos fenómenos biológicos, entre los que podemos destacar la migración, proliferación, apoptosis, la reparación tisular (Yamada et al., 2019), e incluso la presión arterial, como la Dra. Saura elegantemente demostró con el acoplamiento de la proteína Quinasa Ligada a Integrinas (ILK) a Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS), regulando de esta forma la producción de NO en función del tipo de flujo arterial (Saura et al., 2017). En constante renovación, el balance síntesis/degradación marca la correcta funcionalidad del órgano, hasta el punto de que, como ejemplo, la acumulación neta de MEC puede alterar la morfología y función de los tejidos, haciendo de este proceso uno de los más regulados en el organismo. A este respecto, las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) son uno de los factores clave en esta regulación y dianas moleculares por excelencia en el remodelado cardíaco adverso tras el proceso inflamatorio isquémico. Su papel será descrito más adelante.

2.2.3 EMMPRIN, su ligando Ciclofilina A y las metaloproteinasas de matriz extracelular en la degradación de la matriz del miocardio frente a la isquemia.

La remodelación cardíaca es el resultado de una serie orquestada de cambios genómicos, bioquímicos y morfológicos que determinan el destino del corazón en términos de restaurar la contractilidad cardíaca adecuada tras un proceso isquémico inflamatorio (Lockhart et al., 2011; Ramirez-Carracedo., 2019). Como hemos mencionado, existe una gran variedad de enzimas que participan en este fenómeno. Sin

Introducción

embargo, nosotros, junto con otros investigadores, hemos identificado una proteína clave en este proceso que podría ser una diana terapéutica potencial: EMMPRIN, el Inductor de Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular.

EMMPRIN, también conocido como Basigina o CD147, es parte de una superfamilia de proteínas similares a inmunoglobulinas (von Ungern-Sternberg et al., 2018). Su identificación inicial se determinó en células tumorales fibroblásticas cultivadas, como proteína indispensable para la angiogénesis tumoral (Xu et al., 2013), aunque también se puede identificar en diversas especies celulares, entre las que se incluyen macrófagos, células endoteliales y cardiomiocitos, como nosotros y otros grupos de forma paralela pudimos caracterizar (Lizarbe et al., 2009; Tarin et al., 2011). Estructuralmente, su característica fundamental es la de ejercer como proteína de membrana, cuya estructura contiene un dominio intracelular de 21 aminoácidos que actúa como péptido señal, responsable de la actividad receptora y de oligomerización. Además, posee un dominio extracelular con dos dominios de IgG, (Ig1 e Ig2) los cuales facilitan su unión con otras proteínas.

Una característica clave de EMMPRIN es la susceptibilidad de sufrir modificaciones post-traduccionales, de las cuales, la N-glicosilación del dominio N-terminal es crucial para su actividad, ya que le permite oligomerizar en la membrana plasmática, siendo estas estructuras oligoméricas las que retienen la actividad inductora de MMPs (Cuadrado et al., 2016; Tesoro et al., 2022). Concretamente, las formas altamente glicosiladas exhiben una mayor actividad sobre la activación de MMPs, en comparación con las formas poco o bajamente glicosiladas, en donde su grado de actividad es mínimo (Tarin et al., 2011; Cuadrado et al., 2016).

La principal característica de EMMPRIN en diversas enfermedades, en nuestro caso, en las enfermedades cardiovasculares, es actuar como inductor de MMPs, en particular de MMP9 y MMP13, como nuestro laboratorio ha demostrado previamente (Lopez-Rivera et al., 2005; Lizarbe et al., 2009; Tarin et al., 2009; Ramirez-Carracedo et al., 2024). Además, como veremos con detalle en la presente tesis doctoral es la capacidad de funcionar como un auténtico efector inflamatorio ya que **EMMPRIN** presenta la capacidad de formar complejos con distintos ligandos, despertando el interés en nuestro caso de manera especial a la interacción que mantiene con la proteína **Ciclofilina A (CyPA)**, su ligando natural, que desempeña un papel crucial como inductor principal de la respuesta inflamatoria cardíaca, especialmente en el IAM (Cao et al., 2019; Xue et al., 2018; Hernandez et al., 2021).

CyPA, representa una de las proteínas dentro de la amplia familia de inmunofilinas. Esta proteína actúa como una chaperona, facilitando el correcto plegamiento de otras

Introducción

moléculas, el tráfico intracelular y la activación de señales de transducción, especialmente en procesos inflamatorios (Nigro et al., 2013).

Estudios proteómicos revelan que CyPA es susceptible de ser modificada mediante fosforilación o acetilación, proceso fundamental para su secreción por células del músculo liso vascular y la posterior activación celular, así como para aumentar la adhesión monocitaria y endotelial (Seizer et al., 2016; Bayon et al., 2020).

La CyPA desempeña un papel fundamental como ligando natural extracelular del receptor EMMPRIN en diversas condiciones patológicas, abarcando enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares (Seizer et al., 2014). Su interacción con EMMPRIN desencadena cascadas de señalización proinflamatorias, promoviendo la formación de células espumosas y contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis (Yuan et al., 2010), mientras que, en procesos de isquemia miocárdica, la secreción de CyPA desencadena una respuesta inflamatoria que está directamente asociada con la necrosis celular, como nosotros hemos demostrado (Hernandez et al., 2021). En virtud del papel de EMMPRIN en la respuesta inflamatoria aguda, así como su interacción con CyPA, que desencadena procesos inflamatorios cardiacos durante la isquemia/reperfusión tisular, hemos postulado en la presente tesis doctoral al complejo CyPA/EMMPRIN como una nueva diana terapéutica frente a la respuesta inflamatoria que surge y es origen de enfermedades cardiovasculares como el IAM y la aterosclerosis (**Figura 4**).

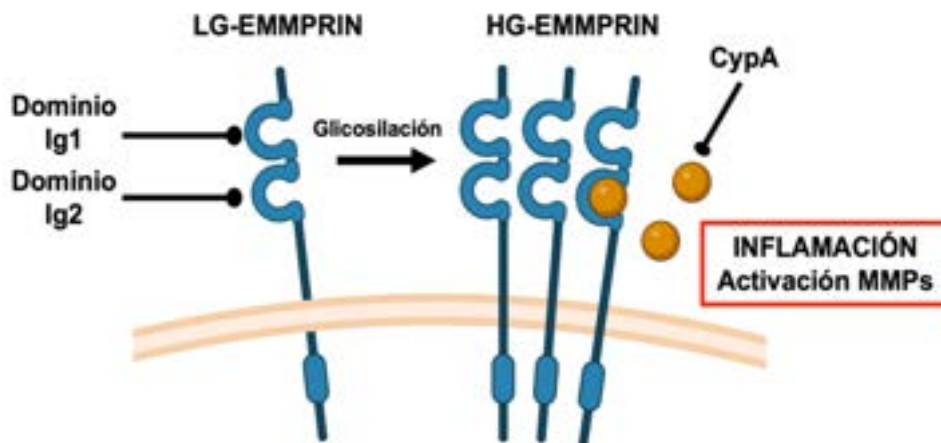


Figura 4. Regulación y formación del complejo EMMPRIN-CyPA

2.2.4 Ciclofilina A y EMMPRIN como diana terapéutica frente al infarto agudo de miocardio. Caso práctico.

En el contexto del IAM, ya hemos mencionado que la respuesta inflamatoria desempeña un papel crucial en la extensión del daño cardíaco. Para contrarrestar esta respuesta inflamatoria y proteger el tejido cardíaco, se conocen varios mecanismos de cardioprotección a nivel molecular. Existen líneas de tratamiento exploradas las cuales

Introducción

emplean antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), junto con los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), reduciendo la inflamación y el dolor anginoso al interferir sobre la síntesis de prostaglandinas (Thöne, Kollhorst & Schink, 2017; Krötz et al., 2005). Por otro lado, los bloqueadores de receptores de la interleucina-1 (IL-1) muestran beneficios al reducir la inflamación y el tamaño del infarto (Mahfooz et al., 2023). Sin embargo, nuestro grupo de investigación se ha especializado en el uso de la nanotecnología como herramienta teragnostica para abordar la respuesta inflamatoria en la isquemia miocárdica. En particular, hemos investigado el uso de micelas conjugadas con un péptido específico de unión a EMMPRIN, denominada NAP9. Esta nanopartícula no solo tiene un impacto terapéutico significativo, mejorando la función ventricular y reduciendo la progresión del infarto mediante la supresión de la actividad de EMMPRIN (Cuadrado et al., 2016; Ramirez-Carracedo et al., 2018; Ramirez-Carracedo et al., 2022), sino que también inhibe la sobreexpresión de las MMPs en la placa de aterosclerosis (Ramirez-Carracedo et al., 2018). Además, gracias a su acumulación específica en el tejido infartado y dentro de la placa, permite una visualización no invasiva mediante resonancia magnética, lo que le confiere una versatilidad teragnostica para una correcta evaluación de la progresión de la enfermedad (Ramirez-Carracedo et al., 2020, Cuadrado et al., 2016).

Además de NAP9, hemos desarrollado una nanopartícula lipídica denominada NIL10, que tiene la capacidad de unirse al receptor de Interleucina-10 (IL-10) tanto en ratones como en cerdos sometidos a isquemia/reperfusión miocárdica. La administración de NIL10 en ratones deficientes de IL-10 demostró efectos cardioprotectores, mejorando la función cardíaca y reduciendo tanto la inflamación como la fibrosis, promoviendo la polarización de macrófagos hacia un estado resolutivo además activar la vía antiinflamatoria IL-10/STAT3 (Tesoro et al., 2022).

En la presente tesis doctoral, hemos querido caracterizar uno de los posibles mecanismos moleculares por los que la Ivabradina, uno de los fármacos más utilizados en el shock cardiogénico, pudiera estar ejerciendo su papel cardioprotector. Este medicamento actúa como inhibidor selectivo de los canales *I_f*, también conocidos como corriente *Funny*, o corriente marcapasos, los cuales son esenciales para el automatismo cardíaco del nodo sinusal. Se utiliza en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (IC) en pacientes cuya frecuencia cardíaca supere los 90 latidos por minuto, centrando sus efectos específicamente en el nodo sinusal, sin influir en los tiempos de conducción intraauricular, auriculoventricular o intraventricular, ni en la contractilidad del músculo cardíaco ni en la repolarización ventricular (Das et al., 2017). Su mecanismo de acción conocido se centra en la inhibición selectiva del canal HCN4 (Canal de Nucleótidos Cíclicos Activados por Hiperpolarización), lo que resulta en la prolongación del intervalo

Introducción

de despolarización diastólica y, como consecuencia, en la disminución de la frecuencia cardíaca al bloquear el transporte intracelular de sodio, por lo que sus efectos son independientes de la presión arterial o la contractilidad miocárdica (Bucchi et al., 2013). Sin embargo, el efecto cardioprotector de la Ivabradina en el shock cardiogénico ha de residir, además de lo anteriormente citado, en mecanismos aun por explorar, objeto principal de la presente Tesis Doctoral. Se postuló que la Ivabradina podría reducir la actividad de ciertas MMPs en ratones diabéticos, sin embargo, nuestro grupo de investigación examinó por primera vez cómo la Ivabradina influye en la regulación de la degradación de la MEC durante la isquemia coronaria. Por un lado, hemos investigado cómo la Ivabradina interactúa con HCN4, la isoforma predominante en el nodo sinusal, lo que resulta en la formación de un complejo con Caveolina 3 (Cav3) y las formas de baja glicosilación de EMMPRIN (LG-EMMPRIN), las cuales son las formas inactivas de esta enzima (Tesoro et al., 2020). Así, de forma novedosa, como analizaremos con detalle en la sección de Resultados de la Tesis Doctoral, mostramos cómo la Ivabradina inhibía molecularmente la degradación de la MEC. Simultáneamente, como fundamento esencial de esta tesis doctoral, hemos evidenciado el papel regulador de la Ivabradina en el proceso inflamatorio al bloquear la secreción de CyPA al torrente sanguíneo, lo que impide su unión a EMMPRIN. Esta relación será explorada en detalle en la sección de Resultados (Hernandez et al., 2021).

BLOQUE III: INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS

3.1 Aterosclerosis y su manifestación clínica.

Podemos definir a la aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria sistémica, que comienza con un fenómeno del que ya hemos hablado como es el de la disfunción endotelial (Christopher & Witztum., 2001). En términos generales, la aterosclerosis podemos definirla como una forma de inflamación crónica que resulta de la interacción entre lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monocitos, células T, elementos celulares y componentes proteicos de la pared arterial.

La aterosclerosis, de manera directa o indirecta, es responsable de aproximadamente el 50% de todas las muertes en la sociedad occidental y es la causa principal de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECVA) (Dichgans et al, 2019; Paul et al, 2019). La ECVA, de etiología multifactorial, tiene factores de riesgo como hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, tabaquismo, edad, género, antecedentes familiares, sedentarismo, obesidad, y/o dietas ricas en ácidos grasos saturados (Shafi et al, 2019). En el espectro coronario, el dolor anginoso, sudoración fría, mareos, disnea, náuseas y debilidad son los síntomas más comunes de esta enfermedad coronaria. Sin

embargo, en la actualidad, la aterosclerosis sigue siendo una enfermedad silenciosa inflamatoria que no puede ser diagnosticada de forma temprana, con la excepción de estudios clínicos con tecnología de imagen, no implantado en el Sistema Nacional de Salud de manera rutinaria, lo cual hace de la aterosclerosis una patología de elevado interés, como es el caso de la presente tesis doctoral.

3.1.1 Etiología y fases de la formación de la placa de ateroma. Inflamación sistémica.

La etiología de la aterosclerosis se basa en un endotelio disfuncional con carácter proadherente, que actúa como el evento desencadenante clave en el desarrollo de esta patología multifactorial (Milutinović et al, 2020; Akyildiz et al, 2014). En condiciones normales, el endotelio vascular mantiene una superficie antiadherente y antitrombótica. Sin embargo, factores de riesgo como la hipertensión, el tabaquismo, la hiperlipidemia y la diabetes pueden inducir la progresión de un endotelio sano hacia convertirlo en disfuncional. Este cambio promueve la adherencia de monocitos y linfocitos T a la pared arterial mediante moléculas de adhesión como Molécula-1 de adhesión celular vascular (~~del inglés~~ Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1), la Molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias-1 (~~del inglés~~ Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PECAM-1), o las Moléculas de adhesión intercelular 1 y 2 (~~del inglés~~ Intercellular Cell Adhesion Molecule-1,-2, ICAM-1, -2). Añadido a esto, el estrés oxidativo, intensificado por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (LDL_{ox}), desempeña un papel crucial en este proceso. La oxidación de LDL no solo amplifica la respuesta inflamatoria, sino que también facilita la formación de células espumosas a partir de macrófagos, contribuyendo al crecimiento y complejidad de la placa aterosclerótica. Marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva (CRP), IL-6 y TNF- α son indicadores importantes clave en la activación inflamatoria crónica asociada con la progresión de la placa de ateroma además de la migración de células de músculo liso (Gimbrone et al., 2016; Gourdy et al., 2008). Finalmente, la ruptura de la placa, en el caso de producirse, ocurre en áreas donde la cubierta es más delgada y está infiltrada por células espumosas, en donde, además, el complejo CyPA/EMMPRIN, encargado de la degradación de la MEC, origina de manera irreversible la ruptura de la placa, afectando directamente al endotelio vascular (**Figura 5**) (Ramirez-Carracedo et al., 2020; Christopher Glass & Witztum., 2001).

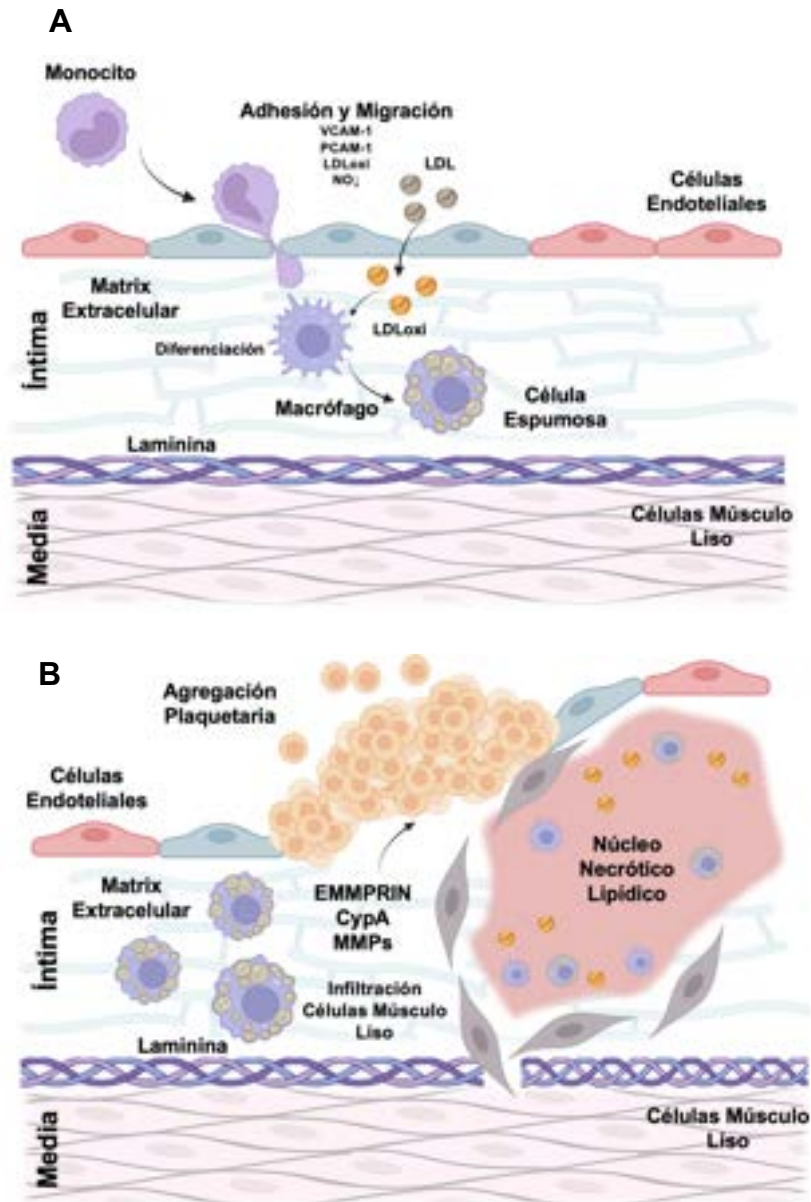


Figura 5 . Progresión de la placa de ateroma
A. Fases Iniciales de infiltración y adhesión de monocitos. B. Fases tardías con la degradación de la MEC y formación del núcleo necrótico.

3.2 El Endotelio vascular.

Antes de los años 80, se tenía la certeza de que el endotelio simplemente era una capa de células que recubría, sin ningún tipo de función específica, los vasos sanguíneos. Sin embargo, gracias a los avances científicos realizados desde entonces, se ha podido ir determinando con mayor precisión la implicación que tiene este órgano en la fisiología vascular. El endotelio vascular está formado por células aplanadas, denominadas células endoteliales (CE), dispuestas en una monocapa, recubriendo la pared del lumen de todos los vasos sanguíneos del organismo, incluyendo arterias, venas y capilares (Krüger-Genge., 2019).

Introducción

Debido a las diferencias entre las uniones de sus células se ha podido diferenciar varios tipos de endotelio: continuo, fenestrado y discontinuo. El endotelio continuo se encuentra en la mayoría de las arterias, venas y capilares del cerebro, la piel, el pulmón, el corazón y el músculo. Las células endoteliales están unidas por uniones estrechas y ancladas a una membrana basal continua. El endotelio fenestrado también está asociado a una membrana basal continua y se caracteriza por la presencia de poros transcelulares de 50-60 nm de ancho, que están sellados por un diafragma de 5 a 6 nm de grosor, encontrándose en glándulas exocrinas. El endotelio discontinuo está asociado a una membrana basal poco estructurada y se caracteriza por la presencia de grandes fenestraciones de 100 a 200 nm de ancho sin diafragma. Esto ocurre en lechos vasculares sinusoidales en el hígado, predominantemente, pero también en el bazo y la médula ósea (Krüger-Genge et al., 2019; Minami et al., 2019).

Este sistema se divide en dos principales tipos de vasos: las arterias y las venas, junto con un tercer tipo de vaso, los capilares, responsables del intercambio gaseoso y nutrientes con los tejidos. Además, estos vasos suelen estar determinados por tres capas diferenciadas (**Figura 6**).

- La túnica adventicia, la capa más externa, está compuesta principalmente por tejido conectivo fibroelástico. Además de aportar soporte estructural, se ha descrito que las células adventicias desempeñan un papel crucial en la inmunomodulación, la respuesta inflamatoria y la remodelación vascular tras el IAM (Stenmark et al., 2013).
- La túnica media, capa intermedia de las paredes arteriales, es crucial para la función y estructura de los vasos sanguíneos debido a su composición de células musculares lisas (VSMCs, en inglés *Vascular Smooth Muscle Cells*) y fibras elásticas. Esta capa regula el diámetro vascular mediante la contracción y relajación de las células musculares lisas, controlando así la resistencia vascular y la presión arterial, lo que es vital para mantener un flujo sanguíneo adecuado (Li et al., 2018). Las CE y las VSMCs han desarrollado varios modos de interacción para regular la función vascular y mantener la homeostasis. Aunque aún no se comprende completamente cómo los defectos en la interacción EC-VSMCs pueden conducir a la aterosclerosis, por ejemplo, se conoce bien que moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y VCAM-1 forman parte de esta interacción, cruciales para el correcto mantenimiento del vaso sanguíneo (Tarin et al., 2009).
- La túnica íntima, la más interna del vaso, está compuesta por un glucocálix de glicoproteínas y proteoglicanos, además de contener las células endoteliales,

Introducción

claves en la homeostasis vascular, la cuales explicaremos sus funciones con más detalle.(Georgakarakos et al., 2023).

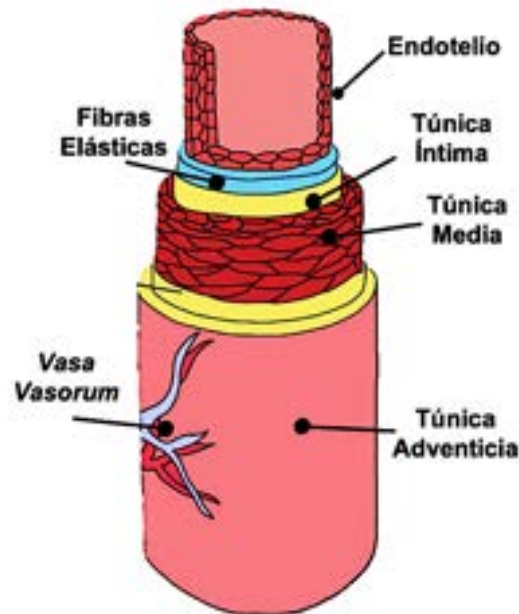


Figura 6 . Arquitectura Vascular

3.2.1 Función del endotelio vascular.

Cada vez se reconoce más al endotelio como la glándula endocrina más extensa del cuerpo humano, debido al número, masa y superficie de las células endoteliales presentes en etapas juveniles. Además, destaca por su habilidad para sintetizar y liberar sustancias con funciones biológicas diversas, influyendo en una variedad de procesos fisiológicos como:

- Regulación del tono vascular: en esta función, como veremos en los siguientes apartados, la enzima clave es la Óxido Nítrico Sintasa (eNOS, NOS3), que cataliza la producción de Óxido Nítrico actuando como un potente vasodilatador, relajando los músculos lisos de los vasos sanguíneos y regulando así el tono vascular (Sandoo et al., 2023; Herranz et al., 2012; Saura et al., 2005; Saura et al., 2002; Zaragoza et al., 2002; Zaragoza et al., 2006)
- Función antiagregante y antiadherente: el endotelio actúa como barrera antiagregante y antiadherente en la vasculatura, protegiendo frente a la formación de trombos y la inflamación vascular (Radomski et al., 1987). Una de las principales moléculas involucradas en esta función es nuevamente el Óxido Nítrico (NO), puesto que posee efectos vasodilatadores, evitando la adhesión monocitaria, e inhibiendo la activación y agregación de plaquetas. Además, el

endotelio produce prostaciclina (PGI₂), que también actúa como vasodilatador y antiagregante, aumentando los niveles de AMP cíclico (cAMP) en las plaquetas y reduciendo su capacidad de agregarse (Xu et al., 2020).

- Control de la permeabilidad vascular: esta propiedad permite el paso selectivo de fluidos, solutos y células entre la sangre y los tejidos circundantes, manteniendo así el equilibrio homeostático. La permeabilidad endotelial está regulada por diversas señales bioquímicas y físicas, donde en particular las uniones adherentes son esenciales, jugando un papel crucial las denominadas Cadherinas, y en particular las VE-Cadherinas, esenciales entre las células endoteliales y las adyacentes, manteniendo una la correcta permeabilidad. (Stanca et al., 2018).
- Respuesta inflamatoria: durante la respuesta inflamatoria, tras un insulto fisiopatológico, un papel crucial lo desempeña el complejo CyPA-EMMPRIN mencionado anteriormente. Este complejo desencadena en el endotelio una respuesta inflamatoria y, con gran interés en la presente Tesis Doctoral, activa entre otras enzimas a las MMPs específicas de endotelio (Yuan et al., 2010; Zaragoza et al., 2002).
- Angiogénesis: la formación de vasos a partir de vasos ya existentes es un proceso en el que en endotelio vascular juega un papel primordial, a través de la proliferación y posterior migración del endotelio hacia el punto físico donde se formará el nuevo vaso, proceso en el que la expresión de metaloproteinasas de matriz juegan un papel decisivo en el proceso migratorio, junto con el disparo de todo el fenómeno a través de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la implicación del NO (Lopez-Rivera et al., 2005; Zaragoza et al., 2002; Genis et al., 2007)

3.2.2. Papel del óxido nítrico en el tono vascular.

El Óxido Nítrico (NO o N≡O) es un radical libre del nitrógeno gaseoso al que se le atribuyen funciones fisiológicas muy importantes como la regulación del flujo y presión sanguínea dependiente de endotelio (Herranz et al., 2012), así como la inhibición de procesos inflamatorios (Ghimire et al, 2017; Zaragoza et al., 1997; Zaragoza et al., 1998; Saura et al., 1999; Zaragoza et al., 2006). La liberación de NO por parte del endotelio vascular se demostró por primera vez en 1987 (Ignarro et al., 1987). Aproximadamente un año después se descubrió que se sintetizaba a partir del aminoácido L-arginina, descubrimientos que establecieron la identidad del denominado Factor VASORelajante Derivado del Endotelio (EDRF, del inglés Endothelial Derived Relaxing Factor),

Introducción

descubierto por el Dr. Robert Furchgott unos 8 años antes (Furchgott., 1983). Pero fue el Dr. Salvador Moncada que, de forma inequívoca, observó que esta molécula tenía implicaciones fisiopatológicas en el sistema cardiovascular (Moncada et al, 1989), siendo el Dr. Ferid Murdad quien por vez primera desveló la base molecular del efecto vasorelajante del NO de manera inequívoca, desvelando por fin la base molecular del por qué los mamíferos mantenemos el tono vascular. Todo ello fue merecedor del Premio Nobel de Medicina en el año 1998 a los Drs. Ignarro, Furchgott y Murad. Años mas tarde, hemos atribuido funcionalidades adicionales a este gas y su implicación en procesos patológicos en el ámbito de la fisiología cardiovascular, donde nuestro grupo de investigación es uno de los que ha contribuido en este campo de biología vascular. (Lamas et al, 2007; Herranz et al., 2012; Saura et al., 2005; Saura et al., 2002; Zaragoza et al., 2002; Zaragoza et al., 2006; Lopez-Rivera et al., 2005).

A diferencia de otros radicales libres que se generan en los sistemas biológicos, el NO tiene una reactividad química relativamente baja y por lo tanto su vida media es más larga, lo que le dota de una gran versatilidad. Por otro lado, el NO como radical libre del nitrógeno es uno de los mayores compuestos citotóxicos que existen. Se intercambia por el oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial y las células que lo producen entran en programas de muerte celular programada (Moncada et al., 1989).

El NO reacciona con enzimas y proteínas, pero cabe destacar para la función biológica del lecho vascular la activación de la enzima Guanilato Ciclasa Soluble (GCs) y la modificación postraduccional de los residuos de cisteína, un proceso conocido como S-nitrosación (Stamler et al., 1992). De hecho, el Dr. Stamler y su equipo propusieron que una clase importante de moléculas biológicas que contienen grupos funcionales sulfhidrilo (tioles), podría desempeñar este papel estabilizador, proponiendo el fenómeno de la S-Nitrosilación como un mecanismo utilizado por las células como sistema transductor de señales, equiparable a la fosforilación de proteínas (Hess et al., 2001). Los tioles de bajo peso molecular reaccionan fácilmente con óxidos de nitrógeno para formar S-nitrosotioles, que son mucho más estables que el NO y actúan como vasodilatadores e inhibidores de plaquetas, hasta el punto de que estos S-nitrosotioles podrían ser intermediarios activos biológicamente en el metabolismo del NO.

Respecto a la base molecular de la vasorelajación del músculo liso existen dos vías de señalización. La primera de las rutas se le conoce como ruta de señalización no canónica del NO, la cual esta molécula difunde libremente por el músculo liso uniéndose a su receptor natural, la GCs, donde se activa para dar lugar a la síntesis del segundo mensajero Guanosín Monofosfato Cíclico (GMPc), y que será utilizado por la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG). El final de esta cascada de señalización conlleva la fosforilación de varias proteínas por parte de PKG que tienen como consecuencia el

Introducción

aumento de la protección cardiaca, regular la permeabilidad endotelial, y en especial, la mayor vasorelajación y aumento de la de la vasodilatación (**Figura 7**) (Francis et al, 2010).

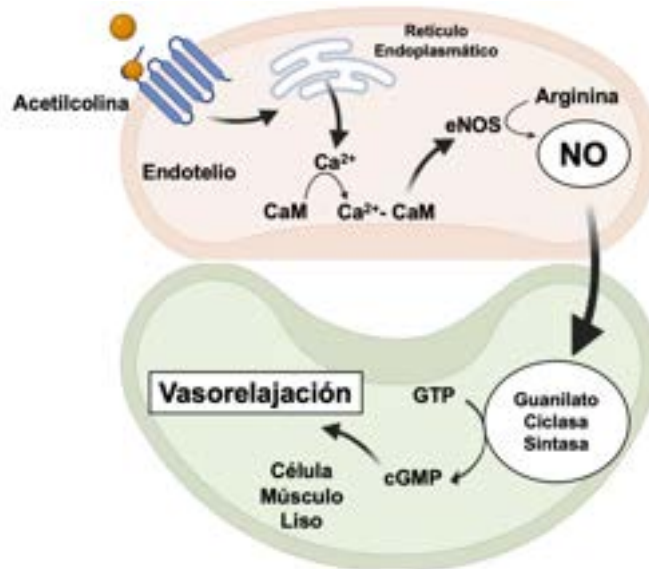


Figura 7 . Base molecular del efecto del NO endotelial sobre la vasorelajación de la musculatura lisa arterial

La producción de NO es llevada a cabo por las isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS). Existen tres isoformas de NOS en mamíferos: neuronal (nNOS, NOS1), endotelial (eNOS, NOS3) e inducible (iNOS, NOS2). Mientras que eNOS y nNOS se encuentran constitutivamente expresadas, produciendo de manera constante NO a baja concentración, iNOS es una enzima inducible en respuesta a un número muy variado de estímulos y en cuyo caso se produce NO en torno a de 100 órdenes de magnitud más que sus otras dos isoformas. La segunda diferencia reside en que iNOS es un enzima independiente de calcio para la producción de NO, mientras que eNOS y nNOS lo son, a través de la unión del complejo Ca-Calmodulina a su sitio alostérico (Rafikov et al, 2011).

eNOS es la proteína clave que controla como hemos citado anteriormente, el tono vascular, fenómeno del que desconocíamos desconocida la base molecular hasta finales de los años 80. De hecho, en ausencia de eNOS, los animales deficientes para este enzima son naturalmente hipertensos debido a una vasoconstricción arterial permanente (Shesely et al., 1996; Knowles et al., 2000). Además de lo anterior, eNOS presenta la peculiaridad de necesitar otras proteínas para acomplejarse y producir NO, hasta el punto de que cualquier factor que induzca su desacoplamiento, contribuirá a la

formación de estrés oxidativo, debido a que eNOS, en ese nuevo escenario, tenderá a producir anión superóxido, como analizaremos posteriormente en esta sección. Además del acoplamiento con otras proteínas eNOS requiere de la unión de tetrahidrobiopterina (BH4) en su sitio alostérico, en cuya ausencia, bien por falta de biodisponibilidad, o por su oxidación hacia la forma de 7,8-Dihidrobiopterina (BH2), eNOS deja de producir NO (Feng, 2012).

3.2.3 Disfunción endotelial.

En ciertas condiciones, en particular de manera asociada a la edad, la función del endotelio puede ser modificada, lo que repercute en su capacidad vasodilatadora y promover un estado inflamatorio, procoagulante y proadherente. La pérdida de alguna de estas funciones mencionadas desencadena un desequilibrio funcional que conduce a la denominada disfunción endotelial (DE). Este fenómeno se puede definir como la pérdida de la función vasorelajante dependiente de endotelio, la cual se caracteriza por la transición de un endotelio con capacidad antiadherente, y antiagregante hacia un endotelio disfuncional, en el que la pérdida de la producción de NO favorece la adhesión monocitaria y la agregación plaquetaria, influyendo directamente en el aumento de la presión arterial (Bonetti et al., 2003; Cyr et al., 2020). Como veremos en la presente Tesis Doctoral, nosotros hemos podido correlacionar el fenómeno disfuncional con el fenómeno asociado a la edad como es la Senescencia Endotelial.

3.2.4. Disfunción Endotelial: Desacoplamiento de la eNOS.

Uno de los mecanismos subyacentes que se inician al comienzo de la DE es el proceso denominado desacoplamiento de la eNOS. Este fenómeno se define como la pérdida de la actividad de esta enzima debido a la falta de sus cofactores necesarios para su correcto funcionamiento en la producción de NO, entre los que podemos destacar:

Proteína Quinasa Ligada a Integrinas (ILK, de inglés Integrin Linked Kinase): en el endotelio vascular, la expresión de ILK juega un papel crítico en la regulación del tono vasomotor, protegiendo así a la eNOS del desacoplamiento como cofactor. ILK también previene la disfunción endotelial y la cascada de eventos asociados, incluyendo el estrés oxidativo o la inflamación vascular. Además, nosotros hemos demostrado que la degradación proteolítica de ILK en el endotelio coronario ha sido asociada con una aceleración en la progresión de la aterosclerosis (Reventun et al., 2023; Herranz et al., 2012).

Proteína de Choque Térmico 90 (Hsp90, del inglés Heat Shock Protein 90): es una de las proteínas celulares más abundantes, representando aproximadamente entre el 1 y el 2% del total de proteínas en condiciones normales. Tiene función como chaperona en diferentes compartimentos celulares y vías de señalización. Una forma de potenciar la actividad de eNOS es a través de su interacción con Hsp90 y formar un complejo, aumentando así la producción de NO (Xu et al, 2007; Antonov et al, 2007).

Ratio BH4/BH2: el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) desempeña un papel clave en el mantenimiento de la función endotelial. De hecho, el equilibrio entre la producción de NO y superóxido por la eNOS parece estar determinado por la biodisponibilidad de BH4, en donde su oxidación hacia la forma BH2, supone la incapacidad de eNOS para generar NO. Los niveles intracelulares de biopterinas están regulados principalmente por la actividad de la vía de biosíntesis de dos enzimas que participan directamente en este ratio: Guanosin Trifosfato-Ciclohidrolasa (GTPCH) y Dihidrofolato reductasa (DHFR) (Crabtree et al., 2011). Como veremos en la presente Tesis Doctoral, el papel que juegan los niveles de BH2 y BH4, junto con los niveles de las dos enzimas recientemente mencionadas, es crucial para el disparo del proceso de la Senescencia Endotelial.

GTP-Ciclohidrolasa I (GTPCH I): Es el enzima que participa en la primera reacción de la biosíntesis *de novo* de BH4 transformando el GTP en Trifosfato de D-eritro-7,8-dihidroneopterina (D-eritro-7,8-BH2) (Yoneyama et al, 2001). Se ha reportado que la deficiencia de esta proteína en ratones es responsable del incremento en la formación de placas de aterosclerosis con relación a la inhibición de la producción de BH4 (Crabtree et al, 2009).

Dihidrofolato Reductasa (DHFR): DHFR es el enzima clave responsable de la regeneración y renovación de BH4 a partir de BH2 a expensas de NADPH a través de la denominada vía de rescate. Como veremos en la presente Tesis doctoral, la baja expresión de los niveles de DHFR, disminuye los niveles de BH4 y aumenta el desacoplamiento de la eNOS en las células endoteliales a través del estrés oxidativo (Chen et al, 2018).

NADPH oxidasa (NOX): debido al aumento del estrés oxidativo, fenómeno que describiremos con mayor detalle en los siguientes apartados, este complejo multiproteico desempeña un papel crucial en el fenómeno de desacoplamiento de la eNOS. La función principal de esta enzima es catalizar la transferencia de un electrón

Introducción

desde el sustrato NADPH hace el O_2 con la formación de un radical superóxido (O_2^{-1}), en donde dada su gran inestabilidad, será rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno (Drummond & Sobey, 2014).

Una de las principales consecuencias del desacoplamiento de la eNOS o de algunos de sus cofactores, es la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). El NO es una molécula muy inestable, siendo capaz de reaccionar con otras moléculas para así generar radicales adicionales con capacidad de daño tisular lo que denominaremos a continuación como Estrés Oxidativo (Schiffrin et al, 2008).

3.3 Senescencia y aterosclerosis asociada a la edad

La palabra senescencia tiene su origen en el término latín "*senex*", que se refiere a una persona de edad avanzada o anciana. En el ámbito de la biología, la senescencia se define como un proceso degenerativo que se manifiesta durante el desarrollo y la maduración de los organismos pero que inicialmente se definió como un estado fenotípico caracterizado por una detención del crecimiento celular de forma permanente e irreversible, de tal manera que la identificación de biomarcadores tempranos asociados al fenotipo senescente podría desempeñar un papel crucial en la comprensión de los mecanismos exactos DE en el envejecimiento.

La Senescencia Endotelial (SE), entendida como el estado irreversible de detención del crecimiento y envejecimiento celular, ha sido reconocida como un factor importante en el desarrollo y progresión en las enfermedades cardiovasculares, especial de una de las enfermedades con mayor prevalencia, como es la aterosclerosis (Childs et al., 2017). La denominado "hipótesis de la gerociencia" resume la idea de que, dado que el envejecimiento es el principal impulsor de múltiples enfermedades interrelacionadas, dirigirse a los mecanismos subyacentes del envejecimiento puede prevenir la aparición o mitigar la gravedad de la multimorbilidad en este proceso (Sierra., 2016).

De forma específica, este fenómeno se describe por una disminución de la función del endotelio asociada a la edad cronológica, incluyendo la pérdida de vasodilatación, la coagulación sanguínea, acompañado con el aumento de estrés oxidativo y la infiltración de células inmunitarias, procesos biológicos que, una vez más, hemos de mencionar que son claros activadores del fenómeno de la disfunción endotelial. Las características moleculares de este fenómeno son las que enumeramos a continuación:

Parada de crecimiento: Las células senescentes experimentan una detención permanente del ciclo celular en la fase G1, sin poder iniciar la replicación del ADN, debido principalmente a la expresión de inhibidores de ciclo celular, en donde p21 ejerce un papel preponderante (Kumari & Jat., 2021).

Hipertrofia celular: Las células senescentes muestran un aumento en su tamaño, a veces duplicando el tamaño de su citoplasma (Davies et al., 2022).

Resistencia a la apoptosis: Las CE adquieren resistencia a la muerte celular por apoptosis, a través de distintos procesos de regulación post-traducciona (Child et al., 2014).

Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal): Las células senescentes expresan SA- β -Gal, una enzima hidrolasa lisosomal, que se detecta citológicamente y puede estar presente a pH 6.0 en células senescentes, en contraste con las células quiescentes donde se detecta a pH 4.0. (Wang & Bennett, 2012; Qing et al, 2021).

El fenómeno senescente finalmente va a desencadenar una de las principales características de la SE: el denominado **Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia (SASP)**, en el cual las células liberan al medio extracelular una serie de componentes que tienen un amplio rango de actividades endocrinas y paracrina, el cual detallaremos en el siguiente bloque.

3.3.1 Respuesta inflamatoria asociada a la senescencia. Papel del complejo Ciclofilina A/EMMPRIN en la respuesta senescente.

La interacción entre CyPA y EMMPRIN es ampliamente reconocida en diversas enfermedades cardiovasculares, como ya hemos mencionado con anterioridad (Seizer et al., 2014). Se ha observado que este complejo puede desencadenar cascadas inflamatorias en monocitos asociados a la placa de ateroma, así como, en nuestro caso, nosotros hemos demostrado que participa en el remodelado cardiaco posterior al un IAM (Hernandez et al., 2021; Ramirez-Carracedo et al., 2020). El uso de CyPA como diana se demostró en diversos estudios en donde su ausencia mejora la capacidad vasodilatadora al aumentar la expresión de eNOS mediante la reducción de la expresión del Factor 2 tipo Kruppel (KLF2) (Seizer et al., 2014). Sin embargo, en lo que se refiere al complejo con EMMPRIN y a pesar de su amplia asociación con la inflamación en diversas patologías, el papel específico de este complejo en el proceso de disfunción endotelial era aún poco conocido.

Como analizaremos posteriormente en detalle, en nuestro estudio hemos demostrado que tanto el ligando como el receptor del complejo juegan un papel específico en la inflamación, contribuyendo no solo a la degradación de la matriz extracelular, sino también iniciando el fenómeno aterosclerótico. No obstante, el complejo CyPA-EMMPRIN no ha sido descrito hasta donde conocemos, durante la senescencia endotelial, lo que nos indujo a pensar que por este motivo, su presencia podría ser una

valiosa herramienta diagnóstica durante este fenómeno, explorado en este trabajo por vez primera.

BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS

4.1. Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP).

El SASP comprende la liberación al medio extracelular de numerosas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas, además de liberar **Vesículas Extracelulares (EVs)**, del inglés *Extracellular Vesicles*) que contienen componentes específicos como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, claves durante el fenómeno senescente. (Roger et al, 2021; Kumari & Jat, 2021; Ramírez et al, 2022). En función del momento temporal y el contexto en donde se produce el SASP, su papel puede llegar a ser muy ambiguo, pudiendo ejercer un efecto negativo en la supresión del crecimiento de varios tipos distintos de tumores, al detener el efecto senescente la proliferación de las células afectadas (Sager et al., 1991), mientras que por el contrario sobre la salud cardiovascular puede ejercer efectos negativos (Chen et al., 2022).

La secreción de EVs se describió inicialmente como una forma de eliminación de compuestos innecesarios para la célula (Regina et al, 2016; Campisi et al, 2007). Sin embargo, ahora sabemos que estas vesículas además de cargar e intercambiar componentes entre células, desde ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, son también capaces de actuar como vehículos de señalización de procesos patológicos (Zaborowski et al, 2015; Minciacchi et al, 2015), lo que les confiere un protagonismo significativo en la etiología y progresión de distintas enfermedades, incluyendo las cardiovasculares (Badimon et al., 2022).

Aunque el SASP es heterogéneo y puede diferir según el tipo celular y los estímulos involucrados, una característica distintiva del SASP en células endoteliales es su asociación con reguladores de la disfunción arterial, que en general se manifiesta a través de una reducción en los niveles de NO y un aumento de la producción de ROS, lo puede promover la inflamación crónica y desencadenar respuestas inmunitarias desreguladas tanto en el mismo territorio endotelial como en otros (Han & Kims., 2023). En función de su biogénesis y tipo de contenido, las VEs las podemos clasificar en **(Figura 8):**

- **Exosomas:** también conocidos como vesículas intraluminales (VIL), membranas unicelulares secretadas por diversas células y presentes en plasma y orina, con un

Introducción

tamaño de 30-150 nm (Bebelmann et al, 2018). Estas vesículas desempeñan funciones clave en la endocitosis y el tráfico celular (Simons et al, 2009).

- **Cuerpos Apoptóticos**: estas vesículas son liberadas por células muertas al espacio extracelular (Battistelli & Falcieri, 2020). Con tamaños que varían entre 50 nm y 5000 nm, se forman por la separación de la membrana plasmática del citoesqueleto tras la contracción celular. A diferencia de exosomas y microvesículas, los cuerpos apoptóticos contienen orgánulos intactos. (Hauser et al, 2017).

- **Microvesículas (MVs)**: también conocidas como micropartículas. Desempeñan un papel central en las enfermedades cardiovasculares y su formación, mediante brotación directa de la membrana plasmática, involucra componentes del citoesqueleto y proteínas como miosina o filamentos de actina, proteínas clave en nuestro trabajo (Vats & Galli, 2022; Minciacchi et al., 2015). Estas vesículas participan activamente en la comunicación célula-célula, afectando las funciones de la célula receptora (Vats & Galli, 2022). Esta capacidad de transferir carga activa es especialmente interesante en el contexto la aterosclerosis, como desarrollaremos en el último bloque de la presente Tesis Doctoral (Ramirez et al, 2018; Simeone et al, 2020). Nosotros a desde aquí, nos referiremos a estas microvesículas como EVs, estandarizando de esta manera la nomenclatura.

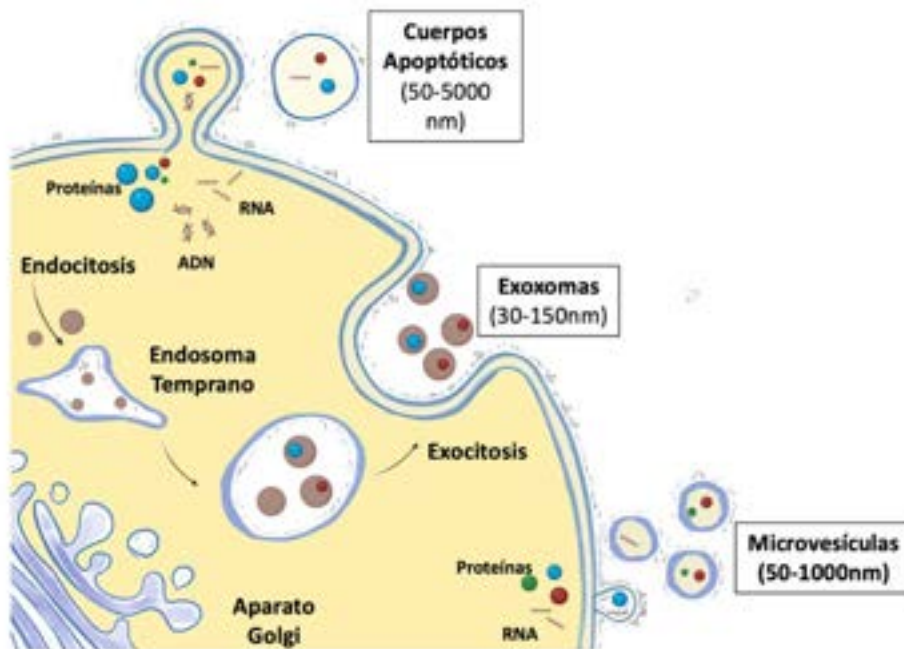


Figura 8 . Biogénesis de las diferentes EVs.

4.2. CAP1: un nuevo componente hallado en las EVs asociado a la edad

La Proteína Asociada a Ciclasa 1 (CAP1) se identificó por primera vez como un componente del complejo Adenilato Ciclasa de levadura y de forma independiente se identificó como componente de la vía de señalización Ras/cAMP (Hubbertey & Mottillo, 2002). Estudios posteriores revelaron que los homólogos de CAP1 se conservan en todos los eucariotas estudiados, incluyendo el Reino Vegetal (Benito et al., 1990). CAP1 participa activamente en procesos tan dispares como la morfogénesis celular, citocinesis, endocitosis y la migración celular, mientras que su disfuncionalidad se ha podido asociar con un número elevado de patologías en pacientes de diversa naturaleza, ya sean de carácter neurodegenerativo o más recientemente descritas, en patologías cardiovasculares (Bergqvist et al, 2020; Kakurina et al, 2018).

La actividad principal de CAP1 es la de unir y secuestrar monómeros de actina, de tal forma que el complejo CAP1/actina no afecta a la formación de filamentos por sí mismo, pero acelera la despolimerización de filamentos dependiente de Cofilina. Por otra parte, la delección de CAP1 conduce a la acumulación de filamentos de F-actina, probablemente debido a la reducción del secuestro de G-actina, así como a una localización y fosforilación aberrantes de Cofilina. En este caso, las células CAP1 deleccionadas presentan una mayor capacidad de migración, debido probablemente a las alteraciones que se generan en la adhesión celular (Zhang et al, 2013).

El hallazgo más reciente en el que CAP1 se ha visto implicada podríamos afirmar que es de una relevancia muy significativa para la salud humana, al haberse demostrado su implicación como cofactor clave en el desarrollo de la aterosclerosis a través de su unión con la proteína **Proteína Convertasa Subtilisina/Kexina tipo 9 (PCSK9)**, una de las más novedosas dianas terapéuticas empleadas hoy en día para el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica (Fruchart Gaillard et al., 2023) y cuyo efecto describiremos a continuación.

4.3. Papel del complejo PCSK9/CAP1 en el reciclado de los receptores para LDL en el hígado.

La dislipidemia, especialmente el aumento de LDL-colesterol (LDLc) circulante, es un factor de riesgo clave para la enfermedad aterosclerótica. Recientemente se ha descrito el papel decisivo que una proteína ejerce en este fenómeno, más concretamente en el reciclado hepático de los receptores para LDL, la anteriormente mencionada PCSK9. PCSK9 consta de tres dominios estructurales distintos que desempeñan funciones

Introducción

claves: el predominio (31–152 aa), la subunidad catalítica (152–421 aa) y el dominio C-terminal rico en Cisteína/Histidina (CHRD; 453–692 aa) que se compone de tres módulos repetitivos M1 (453–529 aa), M2 (530–603 aa) y M3 (604–692 aa) y se expresa de manera universal en diversos tejidos y células, en especial en hepatocitos (Sobati et al., 2020).

La característica más importante de PCSK9 en el contexto de la fisiopatología cardiovascular reside en su papel clave sobre la degradación del receptor de LDL (LDLr). Mas concretamente, el LDL circulante (LDLc) se elimina del organismo a través de su captación hepática, a través de su unión al receptor de LDL (LDLr). Una vez unido el ligando a su receptor, endocita el complejo en vesículas de Clatrina, en donde se disocia LDLc de LDLr, se produce la degradación lisosomal de LDLc y el receptor es reciclado hacia la membrana plasmática para seguir captando LDLc. Sin embargo, cuando PCSK9 se une a LDLr, en vez de reciclarse el receptor, es eliminado por vía lisosomal dentro del hepatocito, de tal manera que hoy en día, una forma más de luchar contra la dislipemia es mediante el tratamiento al paciente con inhibidores de PCSK9, lo que favorece la no degradación del receptor y su reciclado a la membrana (Lagace et al., 2014).

Aunque la mayoría de las investigaciones se han centrado en la función de PCSK9 en el hígado, cada vez hay más evidencias que respaldan la expresión y función de PCSK9 en tejidos adicionales. Estudios más recientes indican una expresión significativa de PCSK9 en el tejido de la pared arterial, abarcando macrófagos, células endoteliales y células de músculo liso, lo que podría llevar a un entorno idóneo para la formación de placas ateroscleróticas promoviendo de esta forma la acumulación de lípidos (Guo et al., 2021). El hallazgo más novedoso en cuanto al metabolismo del colesterol ha sido recientemente descrito, evidenciando que además de todo lo mencionado con anterioridad, CAP1, además, es capaz de interactuar con PCSK9 a través del dominio CHRD, específicamente en los subdominios M1 y M3. La formación de este complejo permite un cambio en la conformación estructural de PCSK9, aumentando su afinidad por los receptores LDLr. Lo más sorprendente es que dicho complejo promueve la degradación de los receptores mediante el proceso lisosomal, impidiendo su reciclaje y, por ende, comprometiendo su capacidad continua de degradación del LDL (Dixon et al., 2016; Lagace et al., 2014). En definitiva, los nuevos hallazgos aquí descritos proponen a una nueva diana terapéutica en la lucha contra la dislipemia: CAP1. En ausencia de CAP1, PCSK9 es incapaz de unirse con igual afinidad al LDLr, lo que facilita su reciclado y, por tanto, el efecto positivo sobre la degradación de LDLc (**Figura 9**).

La comprensión de la regulación del metabolismo del colesterol supondría tener implicaciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como

Introducción

la aterosclerosis, por cierto, en relación directa con el envejecimiento por razones que ya mencionamos con anterioridad. (Dron & Egele, 2020; Jang et al, 2020; Gaillard et al., 2023) y, como veremos en detalle en la presente Tesis Doctoral, nuestros datos apuntan a CAP1 como una nueva diana terapéutica en aterosclerosis.

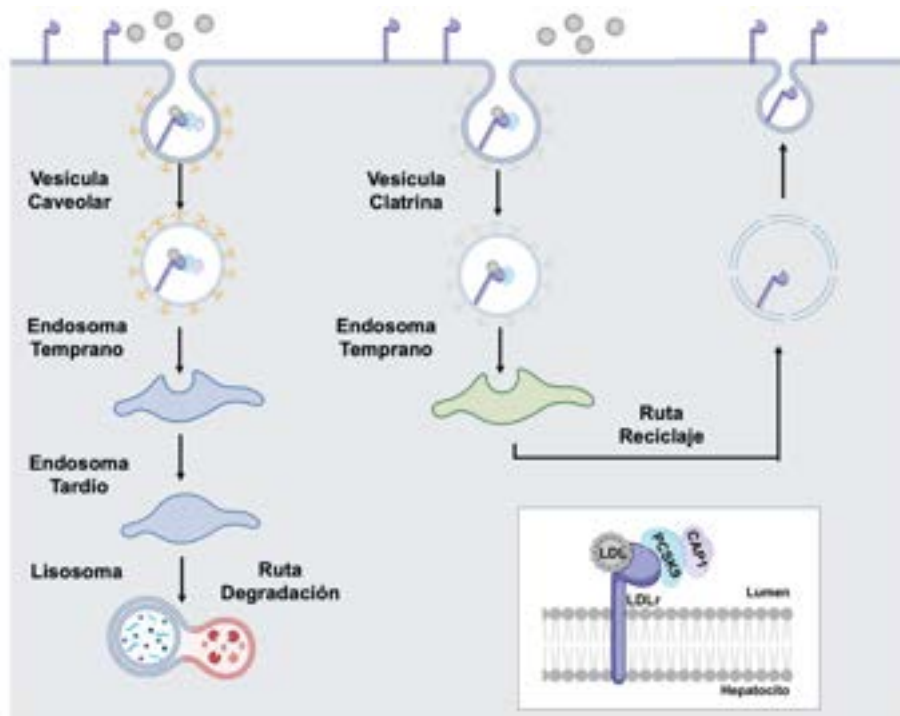


Figura 9. PCSK9 necesita su unión con CAP1 para la degradación de los LDLr.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

La inflamación es una característica común en el disparo de múltiples enfermedades, incluyendo las patologías cardiovasculares. Así es el caso de complicaciones como el infarto agudo de miocardio (Hernandez et al., 2021; Tarin et al., 2011; Cuadrado et al., 2016; Ramirez-Carracedo et al., 2022), la aterosclerosis (Ramirez-Carracedo et al., 2018;) o los aneurismas (Lizarbe et al., 2009). En todos estos procesos, el disparo de efectores inflamatorios es un hecho común, al igual que también lo es la expresión de EMMPRIN, como hemos descrito anteriormente. En virtud de todos nuestros resultados preliminares hipotetizamos que, en el origen de las patologías cardiovasculares inflamatorias, el complejo CyPA y su ligando natural EMMPRIN, van a ser determinantes para la progresión de la enfermedad.

Nuestra hipótesis queremos hacerla extensiva en dos patologías: el IAM y la aterosclerosis asociada al envejecimiento. Nuestros datos preliminares en estudios con el fármaco bradicardizante Ivabradina (Hernandez et al., 2021; Tesoro et al., 2021; Pascual et al., 2017) apuntan a que además de ejercer su acción sobre la corriente marcapasos tras el infarto y posterior shock cardiogénico agudo, su acción cardioprotectora podría estar teniendo lugar sobre el efecto negativo que pudiera ejercer sobre el complejo CyPA/EMMPRIN.

Asimismo, el desarrollo progresivo de la aterosclerosis es en muchas ocasiones, un fenómeno que se dispara con la edad, en donde la disfunción endotelial es causa principal y se incrementa con el fenómeno de la senescencia endotelial asociada al envejecimiento. Por este motivo creemos que cualquier circunstancia que induzca la activación de un patrón senescente podría disparar el fenómeno aterogénico independientemente de la edad. Así, hipotetizamos que la edad endotelial y la edad cronológica de los individuos pueden diferir sustancialmente, lo que nos llevaría a intentar estudiar la presencia de marcadores de carácter inflamatorio de la disfunción endotelial asociado al fenómeno senescente en donde se pudieran detectar nuevas dianas moleculares para intentar frenar el disparo ateroesclerótico, postulando nuevamente la posible relevancia del complejo CyPA/EMMPRIN en el origen de la enfermedad.

2. OBJETIVOS

BLOQUE I y II. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y EL SÍNDROME CORONARIO.

Objetivo Primario

Estudiar la posible contribución del complejo CyPA/EMMPRIN como efector inflamatorio y su posible utilización como diana terapéutica post IAM, analizando en base a los datos preliminares de nuestro laboratorio, si mas allá del efecto bradicardizante de la Ivabradina, esta pudiera estar ejerciendo un papel anti-inflamatorio a través del control de este complejo.

Objetivos Secundarios

1. Analizar la expresión de CyPA en el modelo porcino de IAM tanto en la región sana, como en las áreas de riesgo y necrosada del ventrículo izquierdo y el posible efecto que puede ejercer la Ivabradina como agente cardioprotector.
2. Evaluar el efecto modulador de la Ivabradina sobre la interacción del complejo inflamatorio CyPA/EMMPRIN en las tres regiones cardiacas mencionadas anteriormente.
3. Determinar el efecto de la Ivabradina sobre la secreción sanguínea de CyPA tras el infarto y su posible circulación en el plasma en forma de EVs.

BLOQUE III. INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS

Objetivo Primario

Caracterizar la firma molecular asociada al posible complejo CyPA/EMMPRIN durante el fenómeno de la disfunción endotelial subyacente a la pérdida de la función vasorelajante asociada al desacoplamiento de eNOS como posible origen del fenómeno senescente.

Objetivos Secundarios

1. Generación de un modelo celular de senescencia endotelial replicativa en endotelio humano de arterias aórtica y coronaria. En dicho modelo, pretendemos:
2. Analizar la expresión de los marcadores de inflamación CyPA y EMMPRIN.

Hipótesis y objetivos

3. Analizar la expresión de eNOS y todos sus cofactores requeridos para la producción de NO.
4. Evaluar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno, al ser inductores del fenómeno senescente.

BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS

Objetivo Primario

Estudiar la composición y el efecto de la liberación de EVs asociadas a la senescencia endotelial sobre el desarrollo de placa de atheroma en un modelo de ratón aterosclerótico deficiente para el gen ApoE.

Objetivos Secundarios

1. Estudiar la capacidad de las EVs para inducir senescencia endotelial en cultivos celulares de endotelio de aorta y coronaria humanas.
2. Evaluar el contenido proteómico de las EVs aisladas de plasma asociada a la edad, provenientes de ratones ApoE^{-/-} jóvenes y añosos.
3. Caracterizar el efecto de las posibles nuevas dianas moleculares aisladas del análisis proteómico sobre la senescencia endotelial mediante su silenciamiento o sobreexpresión génica en los modelos de senescencia endotelial replicativa.
4. Evaluar la función de las nuevas dianas moleculares en el desarrollo de aterosclerosis, tanto en ratones de fenotipo salvaje como deficientes para ApoE.

Hipótesis y objetivos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los anticuerpos anti-NOX2 (ab129068), anti-DHFR (ab124814), anti-CypA (ab41684), anti-EMMPRIN (ab64616), anti-MMP9 (ab38898), anti-MMP13 (ab39012), anti-CAP1 (ab155079), anti-PCSK9 (ab181142), anti- β -Tubulin (ab6046), anti-GAPDH (ab22555) y el Kit de Detección de Senescencia (ab65351) fueron adquiridos de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo anti-Nitrotirosina (#06-284), el reactivo Oil Red O (#O0625-25G), la tinción Tricrómica de Masson (#100485), el TTC (Cloruro de Trifenil Tetrazolio, #108380), el Azul de Evans (Evans Blue, EB, #2129) y el MG132 (#474790) fueron suministrados por Merck Milipore (Burlington, Massachusetts, EE. UU.). Los anticuerpos anti-eNOS (SC-654) y anti-G-Agarosa (SC-2002) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE. UU.). Los anticuerpos anti-Hsp90 (MA1-10892), anti-Dihidroetidio (D11347) y anti-GTP-Ciclohidrolasa (PA5-50508) fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). El Medio Reducido en Suero Opti-MEM (Cat. 31985047), el reactivo de transfección Lipofectamine RNAiMAX (Cat. 13778100), y el Silenciador Selecto de siRNA Humano CAP1 (Cat. AM16708) fueron adquiridos de Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.). El teñidor RedSafe fue adquirido por EcoGen (Madrid, España). El anticuerpo anti-ILK (#3862) provino de Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, EE. UU.). El Kit de ELISA para BH4 (MBS733839) fue obtenido de MyBiosource (California, San Diego, EE. UU.). El Kit de ELISA para BH2 (abx354212) fue suministrado por Abxexa (Sugar Land, Texas, EE. UU.). Los Kits miRNeasy Serum/Plasma (217184) y RNeasy Mini Kit (74104) fueron adquiridos de Qiagen (Hilden, Alemania). El Evolocumad fue adquirido a AMGEN (Amgen, Barcelona, ESPAÑA) y suministrado por el servicio de Farmacia del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Las células endoteliales aórticas humanas (HAEC #6100) fueron adquiridas de Science Cell (Carlsbad, California, EE. UU.). Las células endoteliales coronarias humanas (CAEC) (H1169) fueron obtenidas de Cell Biologics (Chicago, Illinois, EE. UU.). La línea de cardiomiocitos H9c2 fue obtenida de Merck Milipore (Merck Milipore, Burlington, Massachusetts, USA). El fármaco Ivabradina fue cedido por los Laboratorios Servier (Suresnes, Francia). La ketamina procedía de Pfizer (Nueva York, NY, EE. UU.), el isoflurano de Abbvie (North Chicago, IL, EE. UU.), el Propofol de Fresenius (Bad Homburg, Alemania), el Fentanilo de Kern Pharma (Madrid, España), el Diazepam de Roche (Basilea, Suiza) y la Amiodarona de Sanofi Aventis (Gentilly, Francia).

2. MODELOS ANIMALES DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO Y ATEROSCLEROSIS

2.1 Modelo Porcino de Infarto Agudo de Miocardio

El presente estudio lo realizamos en un modelo porcino de IAM a través de la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior (DA), mediante cateterismo e inflado de un balón de angioplastia entre la segunda y tercera diagonal con el objetivo fundamental de replicar un proceso patológico similar al observado en pacientes con insuficiencia cardiaca tras isquemia y reperfusión miocárdica con respuesta inflamatoria aguda.

La experimentación animal la realizamos en el Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España), dirigido por la Dra. Carlota Largo Aramburu. La investigación se ajusta a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH Publicación N° 85-23, revisada en 1985) y el Comité Ético de Bienestar Animal y cumplió con la Directiva de la UE sobre animales de experimentación (63/2010 UE) y la legislación española relacionada (RD 53/2013). PROEX 365-15 es el procedimiento aprobado (10 de enero de 2020) por el comité ético de la administración local de acuerdo con las directrices prácticas de rigor y reproducibilidad en estudios preclínicos y clínicos de cardioprotección.

Se utilizaron un total de 17 animales, los cuales fueron preanestesiados con Ketamina (10 mg/Kg, Pfizer, Nueva York, EE. UU.) y Midazolam (0,5 mg/Kg, Braun, Alemania). La anestesia inhalatoria se realizó con Sevoflorano (Abbvie, Madrid, España) y mantenida con Propofol (2 ml/Kg, Roche, Hoffman, Alemania). Tras el efecto anestésico inicial, realizamos una ecocardiografía basal para conocer los parámetros cardiacos que se detallan más adelante, antes del acceso vascular central donde se canalizó la arteria femoral con un introductor 6F heparinizado, momento en el que además se administró amiodarona (0,5 mg/Kg, Braun, Alemania) para evitar la ocurrencia de posibles taquiarritmias. Progresamos el balón de angioplastia entre la segunda y tercera rama diagonal de la arteria coronaria descendente anterior y una vez confirmado el correcto posicionamiento del balón, este lo insuflamos a 4-6 ATM y se mantuvo durante 45 minutos. Durante la isquemia, tomamos los parámetros hemodinámicos a los 15, 30 y 45 minutos, tiempo tras el cual llevamos cabo el desinflado del balón de angioplastia y administramos de forma aleatoria Ivabradina a una concentración de 0,5 mg/kg (Servier, Francia) o placebo a 0,5 mg/kg (solución salina). Ambos tratamientos se administraron tras los 60 minutos después del infarto de miocardio. Una vez completado el procedimiento y con los parámetros hemodinámicos estables, realizamos un segundo estudio ecocardiográfico (**Figura 1**).

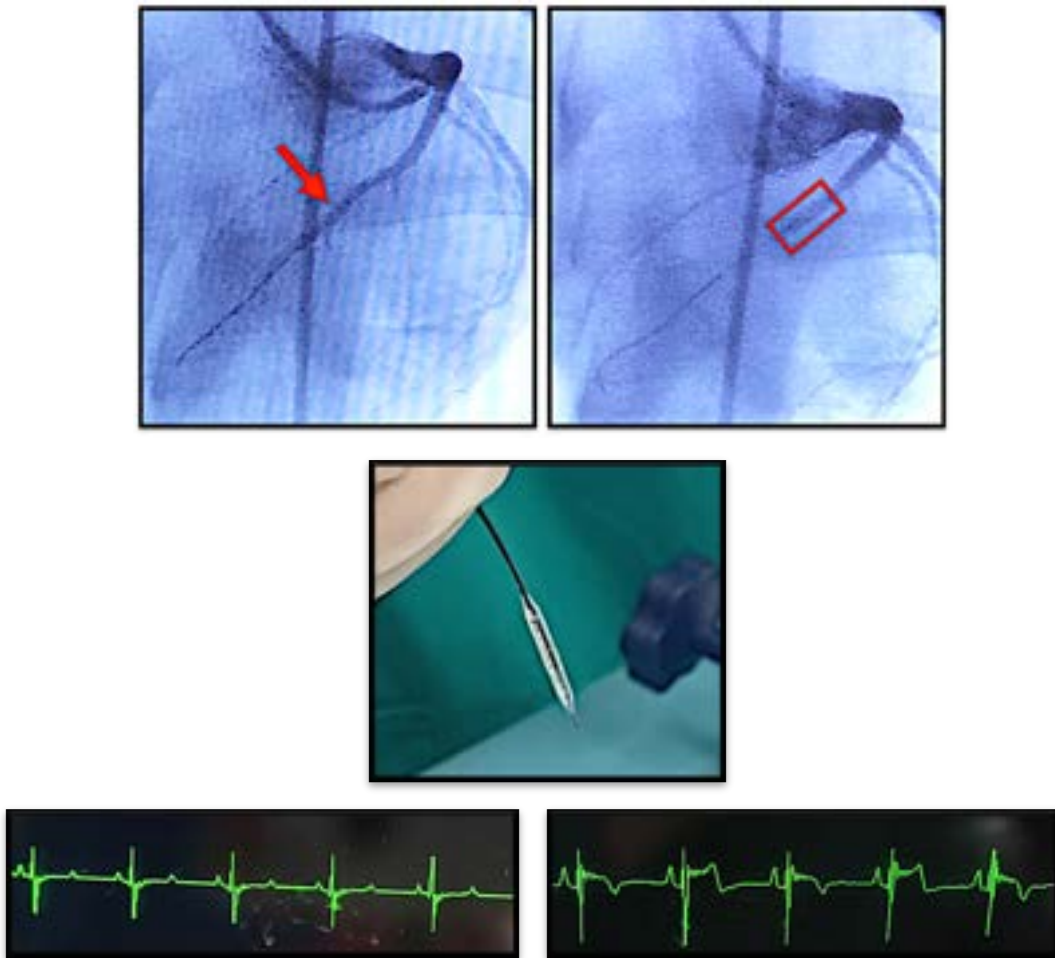


Figura 1. A. Angiografía de la anatomía coronaria. Posicionamiento del balón de angioplastia en la DEA. B. Balón de angioplastias insuflado. C. Electrocardiograma pre y post Isquemia. Elevación del segmento ST (SCACEST)).

2.2 Modelo murino de aterosclerosis

Este modelo lo llevamos a cabo en el Departamento de Cirugía Experimental de la Universidad Francisco de Vitoria (Pozuelo de Alarcón, España). Los procedimientos se ajustaron a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH, Publicación No. 85-23, revisada en 1985), el Comité de Ética en Bienestar Animal, la Directiva de la UE sobre animales de experimentación (63/2010 UE) y la legislación española relacionada (RD 53/2013). Los ratones jóvenes deficiente del gen de Apolipoproteína E ($ApoE^{-/-}$) tenían una edad de 8 semanas, mientras que los ratones de mayor edad contaban con 24 meses al ser estabulados y mantenidos durante un periodo de 12 semanas con una dieta rica en colesterol y grasas. Cada 4 semanas, extraíamos sangre de cada ratón,

Materiales y métodos

utilizando una lanceta 21G a través del seno venoso submandibular, hasta un volumen máximo de 100 µl por ratón. Tras 12 semanas de alimentación con la dieta hipercolesterolémica, procedimos al sacrificio de los animales, y realizamos la extracción y recopilación de las aortas para su posterior procesamiento. Una vez obtenida la muestra de sangre, llevamos a cabo el aislamiento de la aorta, junto con el corazón y los pulmones. Posteriormente, al separar la aorta de otros tejidos, realizamos un lavado con suero fisiológico frío (solución de NaCl al 0,9%) y eliminamos los residuos de grasa presentes en su entorno.

3. Valoración de la función cardíaca mediante ecocardiografía

Para evaluar la funcionalidad miocárdica tras el IAM, y a los tiempos pre, post y tras 7 días de reperfusión, llevamos a cabo un análisis ecocardiográfico utilizando el sistema portátil Vivid Q ultrasound de GE Healthcare, equipado con la sonda específica para animal grande (1.9-4 MHz). Tomamos diferentes planos, adquiriendo las imágenes del eje corto paraesternal izquierdo en modo Bidimensional B para ubicar con precisión el área ventricular izquierda. Posteriormente utilizamos el modo Monodimensional M para calcular los siguientes parámetros de función cardíaca, y en especial, el parámetro la Fracción de Eyección Ventricular Izquierda (FEVI), la cual se puede definir como el porcentaje de sangre que el corazón puede bombear con cada latido. Un ventrículo izquierdo fisiológico expulsa aproximadamente del 55% al 60% de la sangre que contiene. Además, evaluamos los siguientes parámetros (**Tabla 1**): el grosor del tabique intraventricular telediástólico (IVS), el diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la diástole (LVID), el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en telediástole y telesístole (LVPW), la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FS), la frecuencia cardíaca (FC) y el gasto cardíaco (GC).

<u>Parámetro ecocardiográfico</u>	
<u>Fracción de Eyección Ventricular</u>	<i>FEVI</i>
Grosor del Tabique Intraventricular	<i>IVS</i>
Diámetro interno del Ventrículo Izquierdo en Diástole	<i>LVID</i>
Pared Posterior Ventrículo Izquierdo en Telediástole y Telesístole	<i>LVPW</i>
Fracción de Acortamiento	<i>FS</i>
Frecuencia Cardíaca	<i>FC</i>
Gasto Cardíaco	<i>GC</i>

Tabla 1. Parámetros ecocardiográficos

4. Cultivos celulares

Cultivamos las células de la línea H9c2 (línea subclonal de cardiomiocitos embrionarios BD1X original) en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.), 50 mg/mL de penicilina y 50 mg/mL de estreptomina (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) e incubamos a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Además, sometimos a estas células en condiciones de hipoxia en incubadores que recreaban una atmósfera humidificada al 1% de O₂, 5% de CO₂ y 94% de N₂. Tratamos las células H9c2 con una solución 5 mM de Ivabradina (Servier Laboratorio, Suresnes, Francia), 15 µM de MG132 y 10 µM de cloroquina para testar distintas condiciones.

Sembramos las células endoteliales de aorta humana HAEC, (Science Cell, Carlsbad, California, USA) y de arteria coronaria humana CAEC, (Cell Biologics, Chicago, Illinois, USA) en placas de Petri de 100mm de diámetro (Merck Milipore, Burlington, Massachusetts, USA) utilizando un medio de crecimiento específico endotelial (500 ml de Medio endotelial H1168, 0,5 ml de Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (del inglés, VEGF), 0,5 ml de Heparina, Factor de Crecimiento de Fibroblastos (del inglés, FGF)), al que añadimos 10% Suero Fetal Bovino (del inglés, FBS) y 5 mg/ml de penicilina/estreptomina (P/S). Previamente a la siembra, tratamos las placas con 75 µl/ml de fibronectina durante dos horas para la línea celular HAEC y con 1 ml de gelatina durante 5 min para la línea celular CAEC, con el objetivo de crear una matriz donde puedan llevar a cabo el crecimiento en cultivo. Tras descongelar los viales de células, éstas las cultivamos durante 48 horas en un incubador bajo condiciones de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C.

Para llevar a cabo los subcultivos, una vez que las células alcanzaron una confluencia entorno al 80%, procedimos a retirar el medio de cultivo, realizamos dos lavados con tampón PBS y posteriormente añadimos 1 ml de Tripsina al 0,25% para el levantamiento químico de las células. Transcurridos 5 minutos de incubación con Tripsina, recolectamos las células y realizamos los subcultivos a una proporción de 1:4. De esta manera, continuamos el cultivo según el procedimiento previamente descrito. De esta manera, pudimos cultivar las dos líneas celulares, desde el pase temprano (P1) hasta el pase más tardío (P12).

5. Ensayo de senescencia β-galactosidasa.

La detección de la β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-Gal) la llevamos a cabo en los distintos pases celulares de HAEC y CAEC. En este procedimiento, fijamos las células con un 1% de formaldehído, lavadas con tampón PBS, y posteriormente

Materiales y métodos

expuestas a una solución de X-Gal (20 mg de 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta en 1 ml de Dimetil Sulfóxido (DMSO)) durante 1 hora a 37 °C. Tras la incubación, lavamos las células con tampón PBS y posteriormente, las observamos bajo un microscopio de campo claro para la captura de imágenes. Para medir la senescencia en el cultivo celular, contamos las células positivas azules para β -gal y las relativizamos al número total de células en el campo claro. Para determinar la actividad senescente en las aortas, transformamos las imágenes al formato de 16 bits, eliminamos el ruido de fondo y medimos la emisión del azul para relativizarlo con respecto a toda la aorta mediante el programa ImageJ versión 1.53 (Java, Wayne Rasband, EE. UU.).

6. Toma, procesado y análisis histológicos de muestras

6.1 Valoración del IAM mediante Evans Blue

Para el análisis histopatológico del corazón en los cerdos, tras 7 días de reperfusión, seguimos el mismo protocolo descrito en el apartado 2.1 de esta sección de Materiales y Métodos. Durante el procedimiento, de nuevo volvemos a ocluir la arteria coronaria descendente anterior (DA) en el mismo punto de la oclusión inicial, utilizando las mismas referencias anatómicas angiográficas. Además, introducimos un segundo catéter por la arteria femoral libre, apoyándolo en el ventrículo izquierdo (VI) del animal. Este segundo catéter, conocido como *Pigtail*, se empleó para perfundir la solución del colorante Evans Blue al 5% en NaCl al 0,9% directamente en el VI tras el inflado del balón de angioplastia en la DA. Esto permite que el colorante se distribuya a través del VI perfundiendo en todos los tejidos del animal, excepto la zona del corazón que estaba ocluida por el balón de angioplastia. Esta técnica nos permitió diferenciar entre el miocardio sano (S), el área de riesgo (R) y el área infartada (I). Posteriormente, procedimos a la eutanasia del animal, aislamos el corazón, lo almacenamos a -20°C para realizar secciones transversales de 8 mm de grosor en su eje corto. Estas secciones las incubamos en presencia de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) diluido al 1% en NaCl al 0,9% a 37°C durante 20 minutos. La incubación con TTC permite identificar tejidos metabólicamente activos, revelando actividad mitocondrial mediante la formación de Formazán rojo. Finalmente, las secciones las fijamos con una solución de paraformaldehído (PFA) al 10% y tomamos las distintas fotografías de las diferentes secciones.

6.2 Extracción de Sangre y Aislamiento de Plasma

Obtuvimos las muestras de sangre de los animales en tubos de citrato de sodio (363086) (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) a través de un sangrado submandibular (facial) en ratones y a través del introductor 6F enclavado en la arteria femoral del cerdo. Centrifugamos las muestras de sangre a 400g durante 10 minutos, y el plasma resultante se almacenó a -80°C.

6.3 Aislamiento de Vesículas Extracelulares.

Centrifugamos el plasma de ratón de forma inicial a 2400XG durante 15 minutos a 4°C, utilizando una centrífuga Eppendorf 5415 R, con el fin de eliminar células muertas y residuos celulares. Posteriormente, llevamos a cabo una segunda centrifugación a 12.000XG durante 5 minutos a 4°C en el mismo rotor para descartar cuerpos apoptóticos. El sobrenadante resultante lo sometimos a una tercera centrifugación de mayor intensidad a 20.500XG durante 50 minutos a 4°C. Tras esta etapa, el sedimento obtenido lo resuspendimos en tampón PBS (previamente filtrado mediante filtros de 0.22 µm) en un volumen igual a la inicial del sobrenadante. Finalmente, aislamos el sobrenadante y lo destinamos para los métodos empleados, cuantificándolo mediante la técnica BCA o para su almacenamiento a -80°C.

6.4 Histología y Tinción Oil Red O

Después de sacrificar a los animales, procedimos al aislamiento del tejido, al que sumergimos en agua destilada para posteriormente ser deshidratado gradualmente con etanol, comenzando con una concentración del 70% y aumentando hasta el 100%. Posteriormente, tratamos el tejido con Xilol para facilitar su inclusión en parafina utilizando un molde metálico. A partir de los bloques de parafina, obtuvimos secciones histológicas de 5 µm de grosor mediante el micrótopo de Thermo Fisher Scientific. Posteriormente, depositamos los cortes en agua a 37°C y los incluimos en portaobjetos recubiertos de Polilisina para a continuación desparafinar las muestras incubándolas durante 24 horas a 60°C, seguido de una segunda incubación con xilol. Finalmente, rehidratamos las muestras utilizando una serie de concentraciones decrecientes de etanol (100-70%) y volver a incubarlas en agua destilada. En este paso, por un lado, las muestras de las diferentes áreas del corazón las empleamos para llevar a cabo una tinción de Hematoxilina/Eosina para determinar la estructura anatómica tras la I/R, mientras que por otra parte, el día del sacrificio del animal, tras la exsanguinación,

Materiales y métodos

aislamos la aorta intacta. En primer lugar, llevamos a cabo una tinción con Hematoxilina/Eosina con el fin de examinar la morfología de la placa de ateroma en las aortas de ratones jóvenes y ancianos. Paralelamente, para identificar los lípidos, utilizamos la tinción de Oil Red O (ORO) en las arterias completas. Sumergimos las aortas en formalina y las lavamos tres veces con tampón PBS, posteriormente se incubaron durante una hora en ORO (6 mg/ml en isopropanol al 60%) y las lavamos a continuación durante 30 minutos en isopropanol al 60% (**Figura 2**). Tomamos fotografías de las aortas para determinar los depósitos de colesterol, y la cuantificación de lípidos lo realizamos mediante software de análisis de imágenes ImageJ versión 1.53 (Java, Wayne Rasband, EE.UU.).

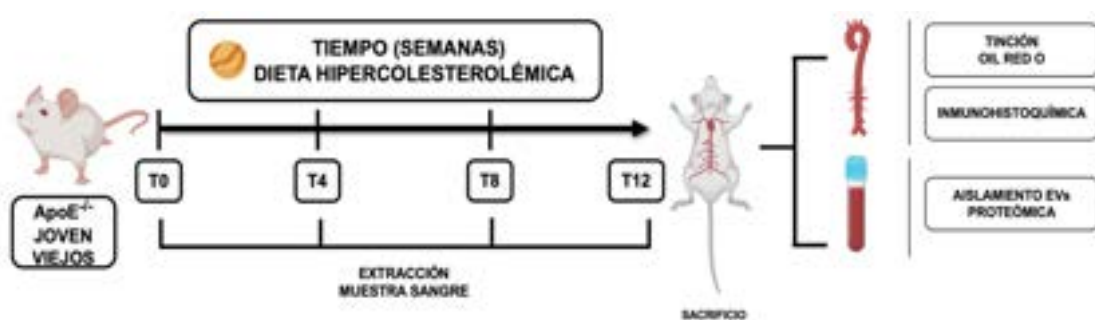


Figura 2. Modelo aterosclerótico en ratones ApoE^{-/-} y toma de muestras.

6.5 Inmunohistoquímica

Una vez aisladas tanto las aortas de ratón como las diferentes muestras de los corazones de cerdo las incluimos en parafina para su sección. Los respectivos cortes los sometimos al correspondiente desparafinado e hidratación para posteriormente ser sometidas a un proceso de desenmascaramiento antigénico utilizando tampón citrato con un pH de 6 (Dako, Glostrup, Dinamarca) para recuperar la inmunoreactividad de posibles epítomos enmascarados en la preparación. Posteriormente, inactivamos la peroxidasa endógena durante 10 minutos e incubamos con el correspondiente anticuerpo primario durante 24 horas a temperatura ambiente, utilizando la dilución recomendada por el proveedor. El exceso de anticuerpo primario, lo eliminamos con tres lavados con tampón PBS, para a continuación incubar las muestras durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a la dilución recomendada. Finalmente, después de repetidos lavados con tampón PBS, aplicamos el reactivo cromógeno diaminobencidina (DAB), que, al reaccionar con la enzima HRP conjugada con el anticuerpo secundario, genera un color marrón en el espectro visible. Para visualizar los núcleos celulares, realizamos una contra tinción con HE y montamos las preparaciones con un medio de montaje compuesto por resina acrílica a base de

Materiales y métodos

xileno (DPX). Al final obtuvimos las imágenes con un microscopio de campo claro en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

6.6 Inmunofluorescencia

Tanto las líneas celulares HAEC, CAEC y H9c2 como las muestras tisulares de los corazones las incluimos en cubreobjetos y las fijamos utilizando paraformaldehído al 3.5% durante 10 minutos. Posteriormente, realizamos dos lavados con tampón PBS y procedimos a la permeabilización con metanol frío durante 15 minutos. Tras otro ciclo de lavado, incubamos las muestras durante 1 hora con suero de albúmina bovina (BSA) al 3%. Seguidamente, realizamos lavados con PBS y llevamos a cabo incubaciones con los anticuerpos primarios correspondientes (diluidos en PBS+BSA 0.1%) durante 1 hora. Para eliminar los restos de anticuerpo primario, realizamos 4 lavados con tampón PBS, seguidos de una incubación de 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. Con el fin de visualizar los núcleos celulares, procedimos a la incubación de las muestras con el agente intercalante Hoechst. La tinción la visualizamos utilizando el microscopio de confocal LEICA TCS-SP5 en el Centro de Apoyo a la Investigación en la facultad de Medicina, en la Universidad de Alcalá de Henares (España).

7. Análisis de las proteínas del estudio

7.1 Obtención, cuantificación y análisis de proteínas

Hemos llevado a cabo el aislamiento de lisados proteicos procedentes tanto de células en cultivo como de muestras tisulares empleando el tampón de extracción y lisis comercial "Pierce® RIPA" de Thermo Fisher Scientific. Este tampón consta de 1,5M de NaCl, un 2,5% de ácido desoxicólico, un 10% de NoniDet P40, 0,5M de Tris-HCl y 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) suplementado con una pastilla del inhibidor de proteasas "cOmplete Mini" de Roche (Basilea, Suiza) y una pastilla de inhibidor de fosfatasas "PhosSTOP EASYpack" de Roche. Posteriormente, incubamos los lisados a 4°C durante 30 minutos en rotación y los centrifugamos a 1000XG durante 10 minutos. Una vez obtenido el sobrenadante que contiene el extracto proteico, cuantificamos la concentración de proteínas mediante la técnica colorimétrica con Ácido Bicinconímico (BCA) de Thermo Fisher, siguiendo las indicaciones del fabricante.

7.2 Detección de proteínas mediante Western Blot (inmunoblot)

Con el propósito de detectar la expresión de proteínas y su cuantificación, utilizamos una cantidad de 20 µg de extracto proteico total en ensayos de Western Blot. Para ello, el extracto proteico se combinó con un tampón de carga compuesto por β-mercaptoetanol 1x y Laemli Sample Buffer 1x, que contiene azul de bromofenol al 0.004%, 400 mM de DTT, 0.125 de Tris, un 20% de glicerol y SDS al 4%. A continuación, incubamos la mezcla durante 5 minutos a 95°C con el objetivo de reducir y desnaturalizar las proteínas, permitiendo así la accesibilidad del anticuerpo a su sitio de unión en la estructura primaria de las proteínas. Separamos las proteínas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida con una concentración variable según el peso molecular de la proteína objetivo. Utilizamos un tampón Tris Glicina 1x y SDS 20%. Posteriormente, las proteínas las transferimos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante un tampón de transferencia compuesto por Tris Glicina 1x y 20% de metanol, utilizando un método de transferencia semiseco con el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System de Bio-Rad.

Las membranas las sometimos a un proceso de bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA) diluida al 3% en tampón tris salino compuesto por 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.4 o tampón tris salino con el detergente Tween 20 (TTBS, para posteriormente incubarlas con el correspondiente anticuerpo primario, diluido en tampón BSA al 1.5%, a 4°C en rotación durante 16 horas. Después de este período, lavamos las membranas tres veces con tampón TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario y las incubamos con el anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, lavamos nuevamente las membranas tres veces con tampón TTBS, eliminamos el exceso de humedad y finalmente procedimos a la detección de las proteínas mediante luminiscencia utilizando el kit "Pierce ECL Western Blotting Substrate" de Thermo Fisher Scientific, con un equipo de detección de quimioluminiscencia Fusion Solo-S (Vilber Lourmant, Collégien, Francia), junto con el software Fusion-Capt para la detección específica de las proteínas. Las proteínas las cuantificamos comparando sus niveles de expresión con los de las proteínas reportadoras gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o β-Tubulina, al supuestamente no variar sus niveles de expresión con los tratamientos.

7.3 Inmunoprecipitación

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación, incubamos 500 µg de extracto proteico con 8 µg del correspondiente anticuerpo primario a 4°C durante 24 horas, en agitación. A continuación, agregamos 30 µL de proteína A/G-Agarosa (de Santa Cruz, Texas, EE. UU.) e incubamos la mezcla durante 2 horas adicionales. Seguidamente, centrifugamos los complejos a 3.000XG durante 5 minutos, realizando tres lavados con tampón PBS filtrado. Por último, resuspendimos los pellets que contenían los extractos inmunoprecipitados en tampón de carga RIPA (Merck Milipore, EE. UU.) para su posterior separación mediante electroforesis y detección mediante inmunoblot, con el anticuerpo primario de la otra proteína que queremos detectar en el complejo, como se ha descrito previamente.

7.4 Análisis Proteómico de las Vesículas Extracelulares

Para analizar el contenido de las vesículas realizamos un análisis proteómico utilizando el espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-Orbitrap Q Exactive™ HF-X (Thermo Scientific) en la unidad de proteómica de los Servicios Centrales a la Investigación de la Universidad de Málaga (Málaga, España). Este espectrómetro combina un analizador de masas de alta resolución y masa precisa (HRAM) con una ultra alta resolución en el Orbitrap con una potencia de resolución máxima de 240,000 a m/z 200 (ancho completo a la mitad). La identificación de proteínas de vesículas extracelulares se realizó utilizando la base de datos UniProtKB de *Mus musculus* (versión 2023-03-01), identificando un total de 424 proteínas, de las cuales 187 cumplen con los siguientes criterios:

- Son proteínas "Maestras" dentro de su grupo de proteínas (incluye isoformas). Porcentaje de falsos positivos < 1.
- Las muestras se normalizaron a la misma concentración de proteínas antes del análisis.

8. Cuantificación de cofactores mediante ELISA.

Para la evaluación de los cofactores de BH2 y BH4, utilizamos dos kits ELISA de manera independiente (ver apartado de materiales en esta sección), de acuerdo con las instrucciones suministradas por los proveedores de los reactivos. Las lecturas de las

placas las realizamos mediante espectrofotometría en un equipo Hospital Universitario Ramón y Cajal.

9. Estudio de la expresión de ácidos nucleicos

9.1. Aislamiento de ARN y PCR-RT

Aislamos el ARN total de las tres áreas de los corazones de los animales utilizando el kit RNeasy Mini siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen) y su posterior cuantificación mediante espectrofotometría (NanoDrop). Posteriormente realizamos la transcripción inversa del ARN, y los cADN correspondientes utilizando cebadores específicos para la CyPA. La amplificación la realizamos con un programa de PCR consistente en 30 ciclos que comprenden una desnaturalización durante 30 segundos a 95°C, alineación de cebadores 30 segundos a 66°C, y una extensión de cebadores durante 60 segundos a 72°C. Los correspondientes cADN los separamos en geles horizontales de agarosa al 4%, visualizándolos con tinción RedSafe (EcoGen).

9.2 Silenciamiento de CAP1 en células HAEC y CAEC.

Las células endoteliales aórticas humanas (HAEC) y las células endoteliales coronarias humanas (CAEC) las sembramos en placas de cultivo de 6 pocillos con 2 ml de medio de cultivo. Procedimos a transfectar el siRNA de CAP1 (ARN de interferencia selecto para CAP1 en *H.Sapiens*, AM16708) de Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.) en medio Opti-MEM con suero reducido, en presencia de Lipofectamina RNAiMAX siguiendo las instrucciones del fabricante. La transfección la realizamos durante 24 horas, tiempo tras el cual reemplazamos del medio de cultivo para proceder finalmente con la extracción de proteínas.

9.3. Transfección del plásmido CAP1 en células HAEC y CAEC.

Sembramos las células HAEC y CAEC en placas de Petri de 35 mm y las incubamos durante 24 con la mezcla de transfección que contiene el reactivo de transfección Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher), junto con un 1 µg de ADN plásmido (CAP1 (NM_001105530; ADNc contenido en el vector *pLenti-C-mGFP-P2A-Puro* con dos sitios de restricción *Sgfl-Mlul* y selecto para el antibiótico Puromicina))) (Origene, Rockville, Maryland, EE.UU), en un medio suplementado con neomicina (500 µg/ml) a 37°C con una atmósfera de CO₂ (**Figura 3A**). Después de retirar los reactivos de transfección, lavamos las células dos veces con medio de cultivo precalentado y luego las cultivamos durante 48 horas adicionales para realizar la selección positiva de aquellas células que

solo habían sido transfectadas. Posteriormente, realizamos un ensayo β -galactosidasa para evaluar su actividad senescente (**Figura 3B**)

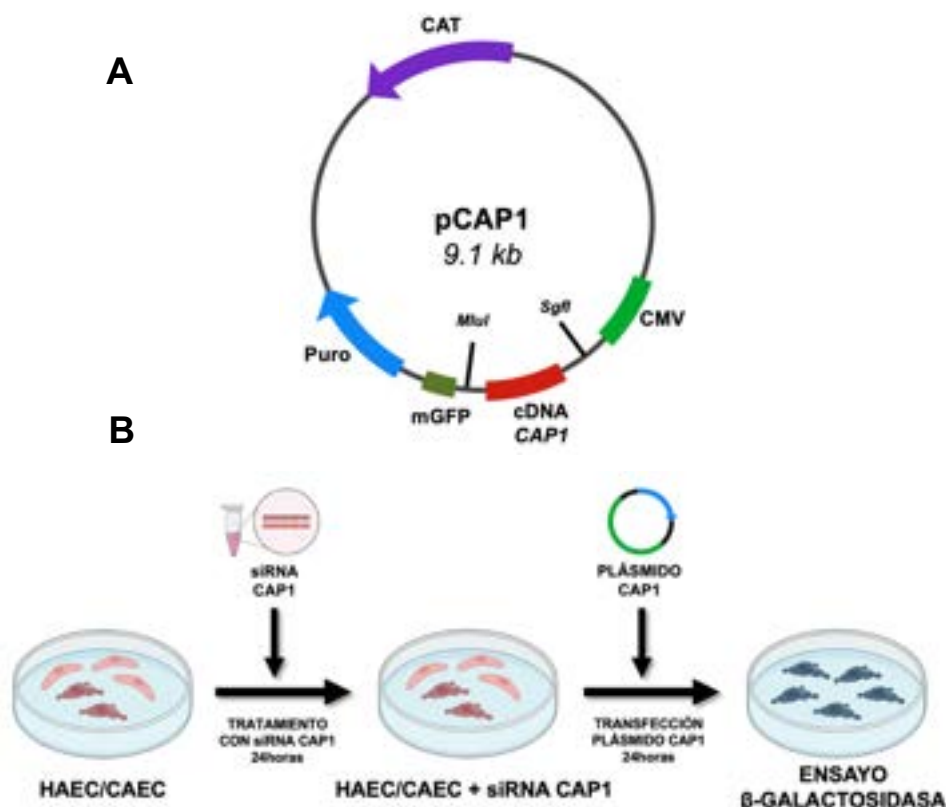


Figura 3. Tratamiento de células endoteliales

A. Estructura Plásmido pCAP1

B. Silenciamiento mediante siRNA (siRNA CAP1) y transfección de plásmido (cADN CAP1) en líneas endoteliales HAEC y CAEC.

10. Estudio Humano

Se obtuvieron muestras de endarterectomía carotídea humana de 6 pacientes (3 hombres mayores de 80 años y 3 hombres menores de 60 años) con una estenosis carotídea >70%, según lo mostrado por angiografía y ecografía en el servicio de imagen de cardiología del Hospital Ramón y Cajal. Todas las muestras se obtuvieron como residuos quirúrgicos de acuerdo con las regulaciones del comité de ética local.

11. Análisis Estadístico

Todos los datos los analizamos mediante el paquete estadístico SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.), presentando los valores como media \pm desviación estándar de las muestras, empleando unos niveles de significación estadística del 5%. Cuando realizamos comparaciones con un control común, llevamos a cabo un análisis de varianza seguido de la modificación de la prueba t de Dunnett. Consideramos

Materiales y métodos

diferencias significativas con valores de p fue inferiores a 0,05 en todos los cálculos estadísticos realizados

Resultados

RESULTADOS

Resultados

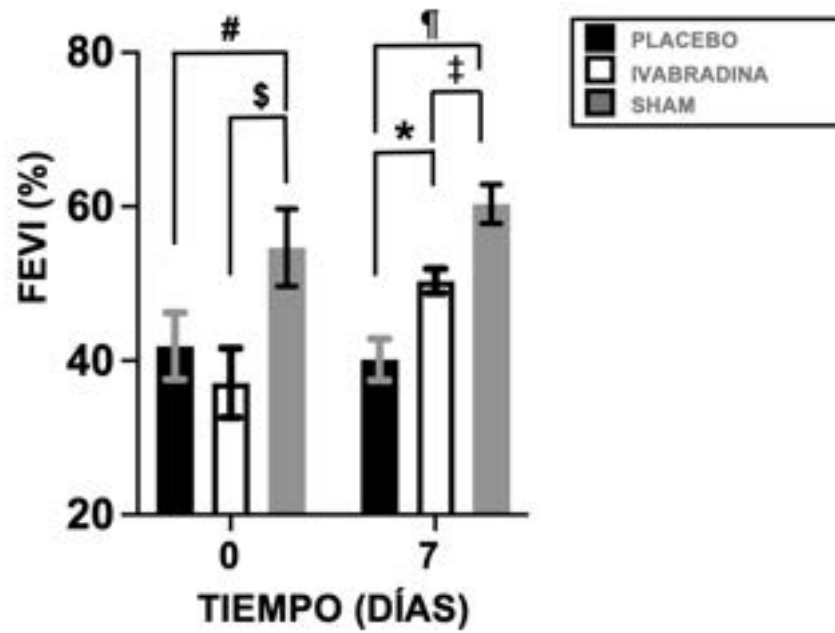
BLOQUE I y II. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y SÍNDROME CORONARIO.

1. La Ivabradina induce cardioprotección en un modelo porcino de Isquemia/Reperusión miocárdica.

Como ya hemos mencionado, la Ivabradina es un fármaco bradicardizante sobre la corriente marcapasos I_f , diseñada originalmente como un antagonista selectivo del canal HCN4, de ahí su efecto sobre la frecuencia cardíaca. Nuestro grupo de investigación previamente demostró el efecto cardioprotector de la Ivabradina en un modelo de IAM (Ramirez-Carracedo et al., 2020; Tesoro et al., 2021; Pascual et al., 2017), en donde el grado de cardioprotección ejercida por el fármaco debería ir más allá del mero efecto sobre el canal de la corriente marcapasos. Por este motivo, y teniendo en cuenta la respuesta inflamatoria que surge tras la isquemia, decidimos investigar el potencial efecto de la Ivabradina en un modelo de IR miocárdica porcina.

Para determinar en nuestro modelo porcino (ver Métodos por los detalles del procedimiento) la extensión y tamaño del infarto de miocardio y analizar el posible efecto antiinflamatorio de la Ivabradina, inyectamos 0,3 mg/kg de Ivabradina por vía intravenosa, evaluando mediante ecocardiografía la función cardíaca tras el tratamiento. Del total de parámetros evaluados (ver sección de Métodos en el listado de parámetros cardíacos), elegimos la Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo (FEVI), como marcador determinante al igual que sucede en humanos, observando una mejora significativa de este parámetro en animales tratados con Ivabradina en comparación con el grupo Placebo a los 7 días posteriores a la IR (**Figura 1A**). Con el objetivo de profundizar sobre la mejora funcional del ventrículo izquierdo, quisimos además evaluar la extensión del área necrosada mediante doble tinción Evans Blue (EB) / cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en secciones transversales del eje corto paraesternal de los corazones (ver metodología por los detalles del procedimiento), donde identificamos el área perfundida en color azul (área sana), el área de riesgo en rojo (tejido miocárdico bajo el punto de la oclusión coronaria, viable, con capacidad de ser perfundido, pero susceptible de sufrir necrosis dada la oclusión) y el área infartada necrótica en color blanco, (no es susceptible a la perfusión ni permeable al TTC), demostrando un efecto cardioprotector de la Ivabradina frente a la IR (**Figura 1B**).

A



B

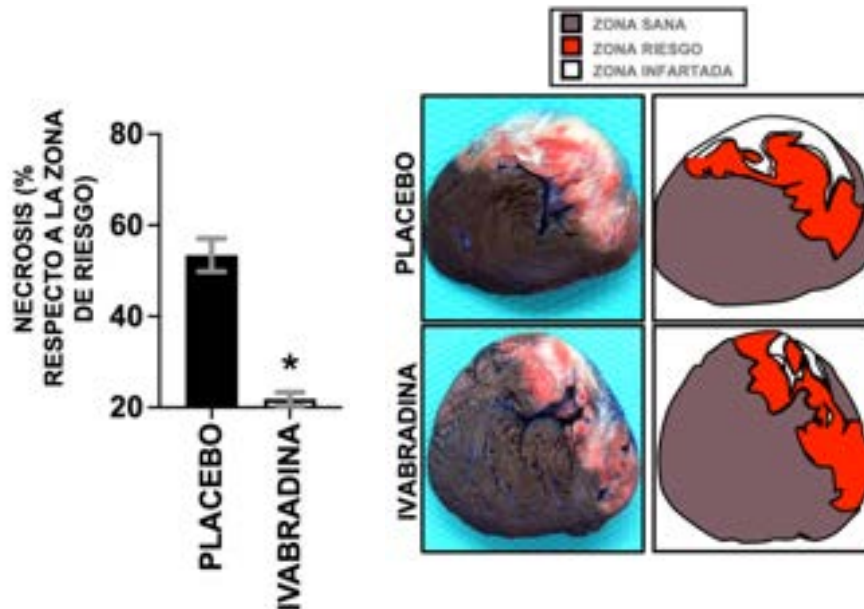


Figura 1. La Ivabradina induce cardioprotección en cerdos sometidos a Isquemia/Reperusión (IR).

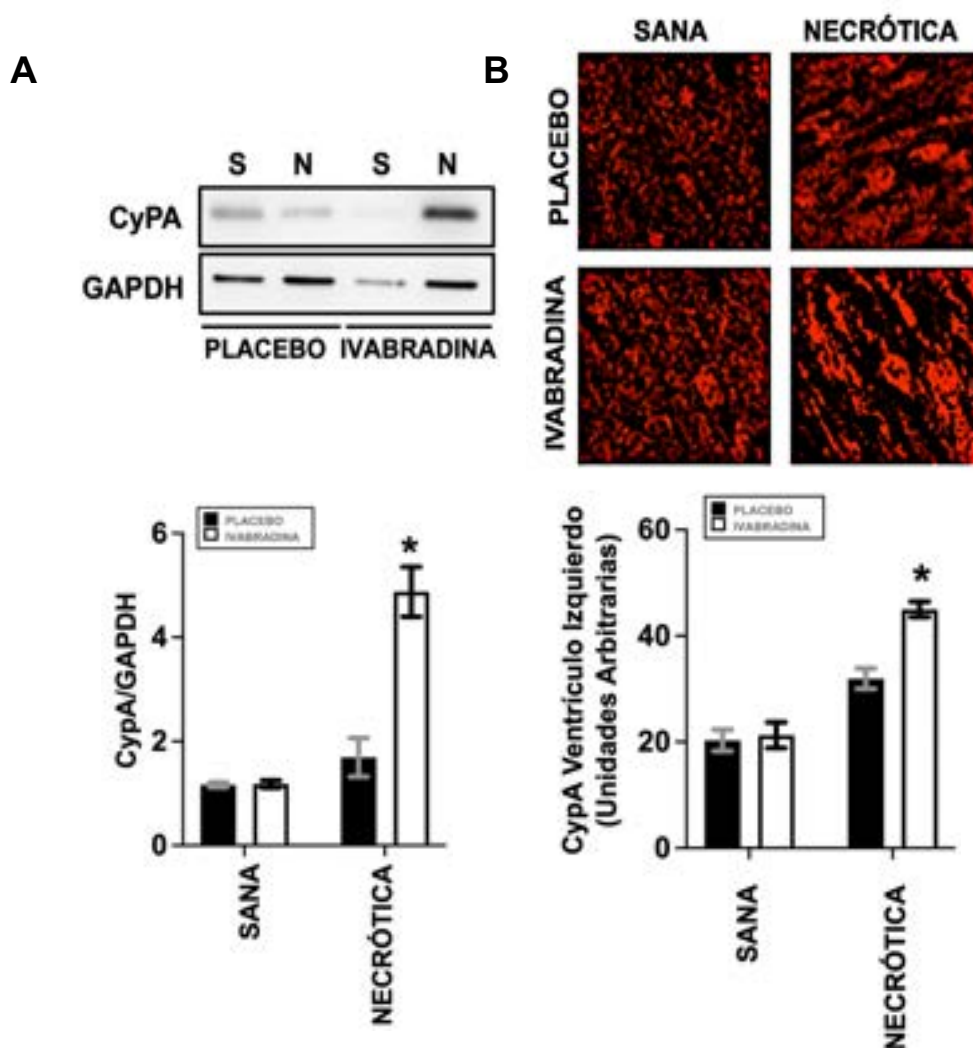
A) Valores de FEVI obtenidos en a los 0 y 7 días post-IR (N=9 Ivabradina/8 Placebo/3 Sham. Media ± DE. #p < 0,001 día 0 Placebo vs Sham; p < 0,001 día 0 Ivabradina vs Sham. * p < 0,05 día 7 placebo vs. Ivabradina. ¶ p < 0,001 día 7 Placebo vs Sham. ‡ p < 0,001 día 7 Ivabradina vs Sham)

B) Tinción doble EB/TTC realizada en secciones cardíacas de 0,5 cm aisladas tras 7 días post-IR de cerdos tratados con 0,3 mg/kg de Ivabradina y Placebo IR (N=9 Ivabradina/8 Placebo. Media ± DE. *p < 0,05 Placebo vs Ivabradina.

2. La Ivabradina aumenta la expresión de Ciclofilina A en los corazones de cerdos tras la Isquemia/Reperfusión.

Nosotros previamente demostramos que, como parte de la respuesta inflamatoria, el infarto de miocardio induce la expresión de EMMPRIN, mientras que la Ivabradina, mediante mecanismos aún por determinar, redujo los niveles de EMMPRIN tras la I/R (Ramirez-Carracedo et al., 2020).

Para explorar el mecanismo por el que la Ivabradina puede estar ejerciendo tal efecto, evaluamos la expresión de la Ciclofilina A (CyPA), ligando natural del receptor EMMPRIN, y su papel clave como molécula inflamatoria. La detección mediante inmunoblot de CyPA a partir de lisados proteicos extraídos de zonas sanas y necróticas de corazones sometidos a I/R mostró que, en respuesta a la Ivabradina, los niveles de CyPA aumentaron significativamente en el área necrótica tras los 7 días post-I/R, en comparación con la zona sana de los mismos corazones (**Figura 2A**), mientras que con el fin de dotar de validez a este resultado, también pudimos observar un aumento en los niveles de CyPA en las mismas zonas seleccionadas mediante microscopía confocal en los cortes histológicos del ventrículo izquierdo (VI) (**Figura 2B**).



Resultados

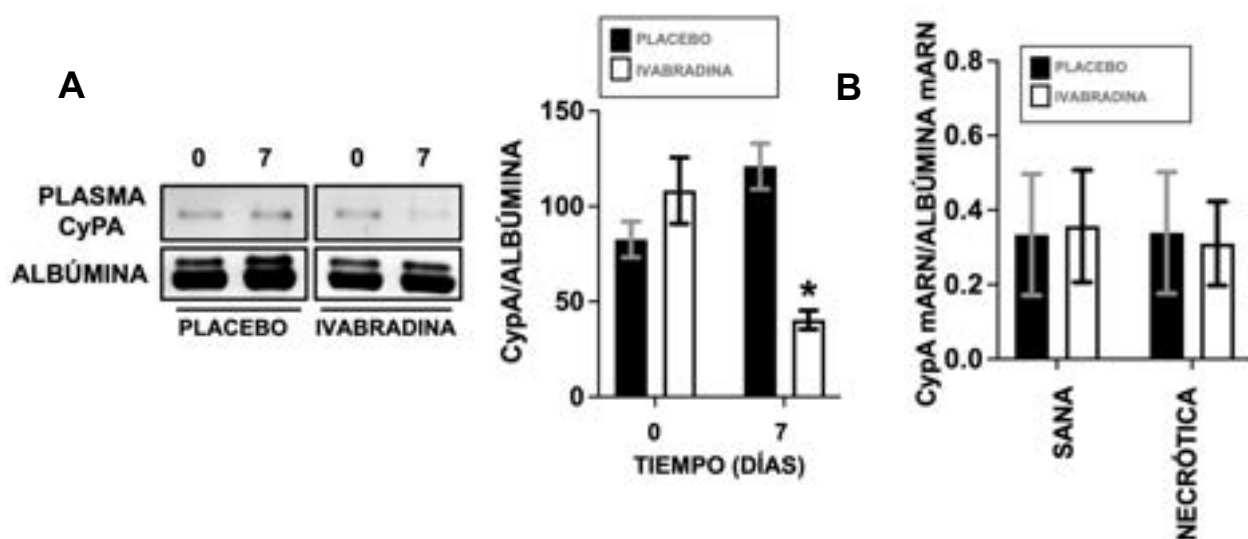
Figura 2. La Ivabradina aumenta la expresión de Ciclofilina A en los corazones de cerdos sometidos a I/R

A) Expresión de CyPA mediante inmunoblot en las zonas sanas y necróticas de corazones de animales tratados con Placebo o Ivabradina (N=9 Ivabradina/8 Placebo. Media \pm DE. * p <0.01 Placebo vs Ivabradina)

B) Microscopía confocal de CyPA (Alexa 647) en secciones sanas y necróticas de corazones (VI) aislados de animales tratado con Placebo e Ivabradina (N=9 Ivabradina/8 Placebo. Media \pm DE. * p <0.01 Placebo vs Ivabradina)

3. La Ivabradina reduce los niveles de CyPA en el plasma de los animales tras la Isquemia/Reperusión miocárdica

Tras la respuesta inflamatoria desencadenada por la isquemia, la CyPA es secretada al espacio extracelular, gracias a lo cual tiene la capacidad para formar complejos con distintos receptores, entre los que, como ya hemos mencionado, se encuentra su receptor natural EMMPRIN, desencadenando una cascada de señalización de daño cardiaco (Seizer et al., 2016). Por ello, nuestro siguiente objetivo fue valorar la expresión de CyPA sanguínea circulante en respuesta a la Ivabradina. Así pudimos constatar mediante inmunoblot que los niveles plasmáticos de CyPA se redujeron significativamente en comparación con los encontrados en el grupo Placebo tras 7 días de reperusión (**Figura 3A**). Ante este resultado, y con el objetivo de descartar un posible efecto transcripcional de la Ivabradina, procedimos a estudiar la transcripción génica de la CyPA en respuesta al tratamiento con Ivabradina, destacando la ausencia de efecto del fármaco a este nivel (**Figura 3B**). En conjunto, nuestros datos sugieren por vez primera que uno de los mecanismos de cardioprotección inducido por la Ivabradina reside, al menos, y además de su efecto bradicardizante, en evitar la secreción de CyPA en la respuesta inflamatoria tras el IAM, evitando de esta forma la posibilidad acomplejarse con receptores, entre otros, de inflamación como es el caso de EMMPRIN.



Resultados

Figura 3. La Ivabradina reduce los niveles de CyPA plasmáticos post-I/R

A) Expresión de CyPA plasmática mediante inmunoblot en los días 0 y 7 post-I/R (N=9 Ivabradina/8 Placebo. Media \pm DE. * $p < 0.05$ Placebo vs Ivabradina)

B) Expresión de ARNm de CyPA de secciones sanas y necróticas de corazones sometidos a IR en respuesta a Placebo e Ivabradina (N=9 Ivabradina/8 Placebo. Media \pm DE).

4. La Ivabradina promueve el complejo entre CyPA y las formas bajamente glicosiladas de EMMPRIN (LG-EMMPRIN).

Nuestro grupo de investigación ha desvelado que, como parte de la respuesta inflamatoria, las formas altamente glicosiladas de EMMPRIN (HG-EMMPRIN) inducen la secreción y en especial, la activación de varias enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, la denominadas Metaloproteinasas (MMPs) de matriz extracelular (Hernandez et al., 2021, Cuadrado et al., 2016). Además, uno de los mecanismos que favorecen la activación catalítica de EMMPRIN pasa por la unión de CyPA en su dominio Ig2, proceso activador de la cascada de señalización inflamatoria. Por lo tanto, nuestro siguiente paso fue analizar la contribución de la Ivabradina en el complejo entre CyPA y EMMPRIN en respuesta a la IR y cómo la glicosilación de EMMPRIN podría verse afectada. Utilizando anticuerpos específicos anti-EMMPRIN y anti-CyPA, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos procedentes de los corazones de animales tratados con Ivabradina, detectando sorprendentemente un incremento de la formación de complejos entre CyPA y las formas bajamente glicosiladas de EMMPRIN (LG-EMMPRIN) en respuesta al fármaco (**Figura 4A**). Además, para confirmar que la actividad de EMMPRIN se veía alterada, evaluamos la expresión de los niveles de MMP9, metaloproteasa crucial en el proceso inflamatorio, observando un descenso significativo de su expresión bajo el tratamiento con la Ivabradina (**Figura 4B**). En conjunto, nuestros datos demuestran que, más allá del efecto sobre la corriente I_f descrita anteriormente, la Ivabradina presenta un claro efecto cardioprotector frente a los daños posteriores a la reperusión a través del efecto negativo sobre la secreción de CyPA, independientemente de su expresión génica, así como favoreciendo los complejos proteicos con LG-EMMPRIN, evitando de esta forma, y aun sin desvelar el mecanismo, la glicosilación de EMMPRIN y por tanto, previniendo la degradación de la matriz extracelular del miocardio tras la IR.

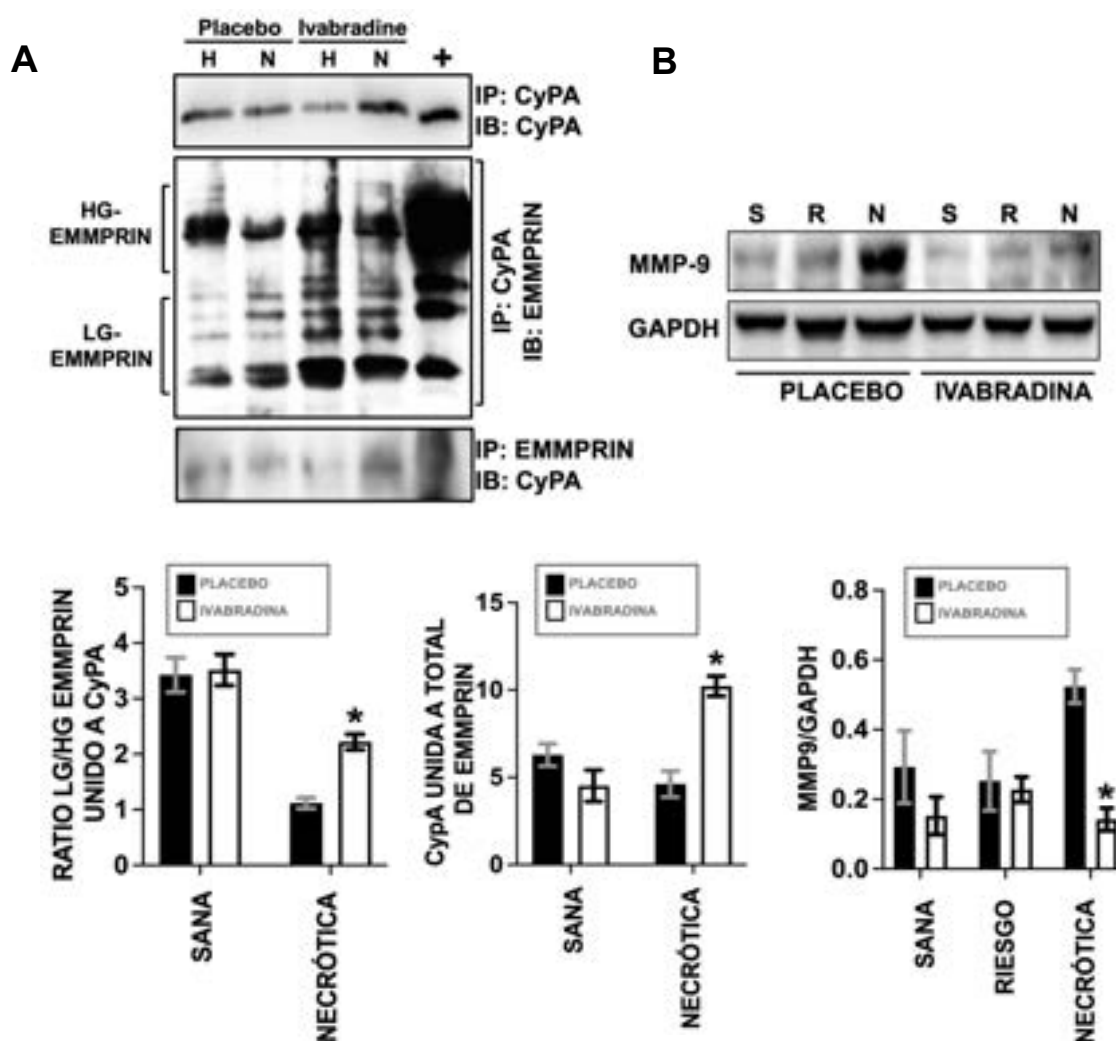


Figura 4. La Ivabradina promueve la unión de CyPA con las formas bajamente glicosiladas de EMMPRIN (LG-EMMPRIN)

A) Inmunoprecipitación de CyPA y EMMPRIN en las zonas sanas y necróticas de corazones tratados con Placero o Ivabradina (N=9 Ivabradina/8 Placero. Media ± DE. *p<0.05 Placero vs Ivabradina)

B) Expresión de MMP9 mediante inmunoblot en las zonas sanas y necróticas de corazones tratados con Placero o Ivabradina (N=9 Ivabradina/8 Placero. Media ± DE).

5. La Ivabradina reduce la secreción de CyPA en células cardiacas.

La secreción de CyPA requiere de su transporte vesiculizado en forma de EVs, junto con su posterior acoplamiento y fusión con la membrana plasmática diana (Suzuki et al., 2006). Por este motivo nosotros también quisimos analizar si la Ivabradina pudiera tener un efecto en el mecanismo secretor de la CyPA. Para ello, incubamos células cardiacas H9c2 con Ivabradina y visualizamos la posible colocalización de CyPA con la proteína VAMP1 (del inglés *Vesicle Associated Membrane Protein 1*), uno de los principales componentes de la maquinaria de la exocitosis denominados receptores de Proteínas

Resultados

de Fijación Soluble de NSF (SNARE). La microscopía confocal mostró que la CyPA y VAMP1 co-localizan en las células cardíacas, indicativo claro de la secreción granular de CyPA (**Figura 5 Panel Superior, T0**), mientras que, por el contrario, la co-localización se redujo significativamente en la primera hora en respuesta a la Ivabradina de forma tiempo dependiente (**Figura 5, Paneles Inferiores T1, T2, T4, T8**). Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten afirmar que la Ivabradina, además de lo citado anteriormente, también podría modular su mecanismo de secreción, dando así respuesta su papel inhibitorio sobre la secreción sanguínea de CyPA.

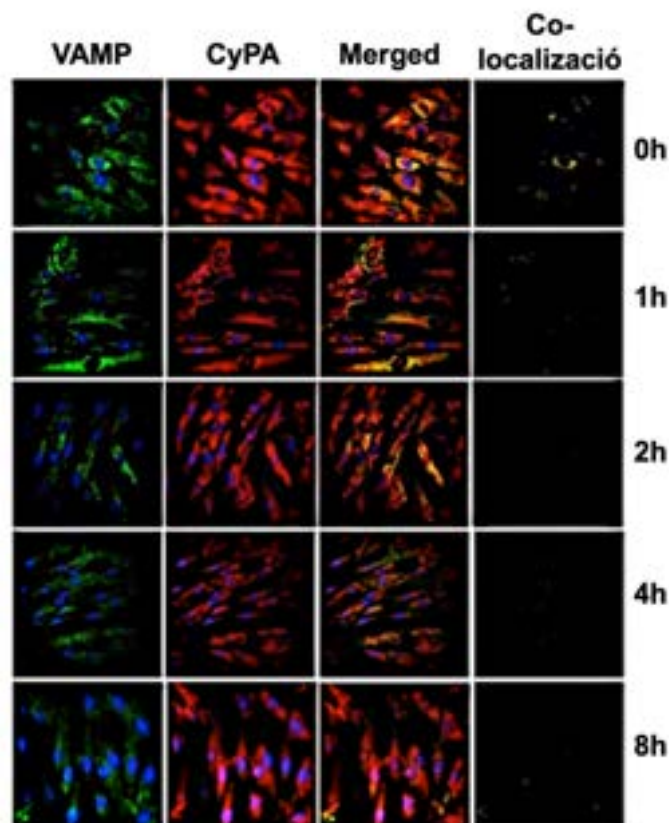


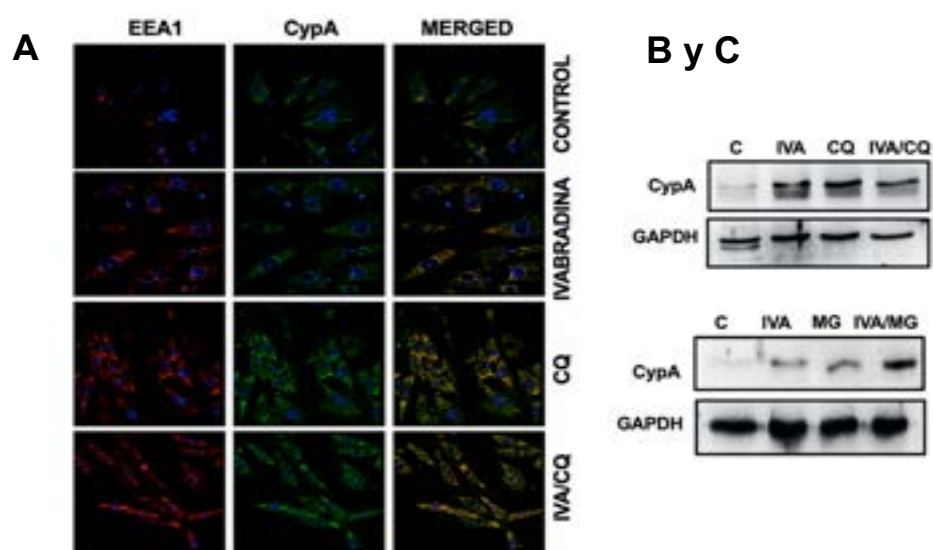
Figura 5. La Ivabradina reduce la secreción de CyPA en células cardíacas.

Microscopía confocal de VAMP1 (FITC) y CyPA (Alexa 647) en células H9c2 tratadas con 5 mM de Ivabradina durante 0, 1, 2, 4 y 8 horas (Tiempo). Las imágenes fusionadas muestran la co-localización de ambas señales (amarillo). N=3 Media \pm DE. * $p < 0.05$

6. La Ivabradina disminuye la degradación lisosomal del CyPA en células cardíacas.

Los resultados mostrados hasta el momento , indican claramente el efecto de la Ivabradina sobre el incremento de los niveles endógenos de CyPA en el corazón de los animales, aunque evita así su secreción al torrente sanguíneo en respuesta a la IR, a través de la regulación exosomal del fármaco. Sin embargo, y ante la sospecha de un posible efecto de la Ivabradina sobre la degradación de la CyPA, estudiamos el efecto en células cardíacas H9c2 incubadas con 5 mM de Ivabradina y 10 mM del inhibidor selectivo lisosomal, la cloroquina (CQ), visualizando mediante microscopía confocal la presencia del marcador clásico lisosomal temprano EEA1 (del inglés Early Endosomal Associated-1), mostrando que tanto CyPA como EEA1 co-localizan en respuesta a Ivabradina, CQ y la combinación de ambos estímulos, lo que nos sugiere que la Ivabradina previene la degradación lisosomal de la CyPA, aunque el hecho de no verse afectada dicha colocalización con los dos estímulos nos sugiera que la degradación de la CyPA, además de la vía lisosomal, debe tener lugar a través de un mecanismo independiente inducido por el fármaco (**Figura 6A**). Para averiguar una posible contribución por la vía del proteasoma, el efecto de la co-incubación de las células H9c2 con 5 mM de Ivabradina y 15 mM del inhibidor del proteasoma MG-132 mostró el mismo efecto (**Figura 6B**), lo que abre la posibilidad del estudio de rutas alternativas que expliquen la/s causa/s por las que el fármaco, además de la degradación lisosomal y por el proteasoma, pueda estar ejerciendo un efecto adicional aún por definir.

Sea como fuere, el conjunto de resultados obtenidos en el modelo de IR porcina posiciona inequívocamente a la Ivabradina como agente cardioprotector en la prevención de la respuesta inflamatoria generada por la CyPA en varios niveles de actuación.



Resultados

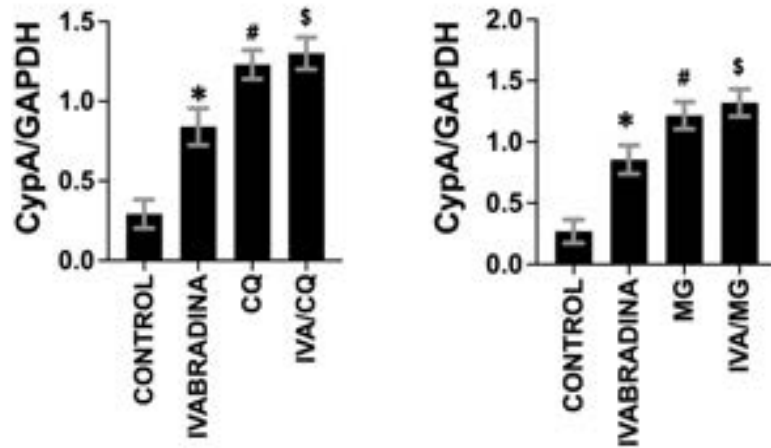


Figura 6. La Ivabradina no tiene efecto en la degradación de CyPA.

A) Microscopía confocal de CyPA (FITC) y EEA (Alexa 647) en células H9c2 tratadas con Ivabradina y Cloroquina (CQ). Las imágenes fusionadas muestran la co-localización de ambas señales (amarillo). (N=3)

B) Expresión de CyPA mediante inmunoblot en células H9c2 tratadas con Ivabradina y Cloroquina (CQ). (N=3. Media \pm DE. * $p < 0.03$ Control vs. Ivabradine. # $p < 0.01$ Control vs. Cloroquina (CQ), \$ $p < 0.006$ Control vs. IVA/CQ).

C) Expresión de CyPA mediante inmunoblot en células H9c2 tratadas con Ivabradina y MG-132 (MG). (N=3. Media \pm DE.

* $p < 0.003$ Control vs. Ivabradine. # $p < 0.005$ Control vs. Cloroquina (CQ), \$ $p < 0.005$ Control vs. IVA/CQ).

Resultados

BLOQUE I y II. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y EL SÍNDROME CORONARIO.

Resumen

1. La Ivabradina induce cardioprotección en un modelo porcino de Isquemia/Reperusión reduciendo el tamaño de la zona necrosada.
2. La Ivabradina incrementa la expresión de CyPA en las zonas necrosadas de los corazones y reduce los niveles plasmáticos de CyPA post-I/R
3. La Ivabradina promueve el complejo entre el CyPA y las formas bajamente glicosiladas de EMMPRIN (LG-EMMPRIN) como mecanismo antiinflamatorio frente a la I/R.
4. La Ivabradina reduce la secreción de CyPA en células cardiacas a través de la modulación de la maquinaria de exocitosis
5. La Ivabradina no participa en la degradación lisosomal de CyPA.

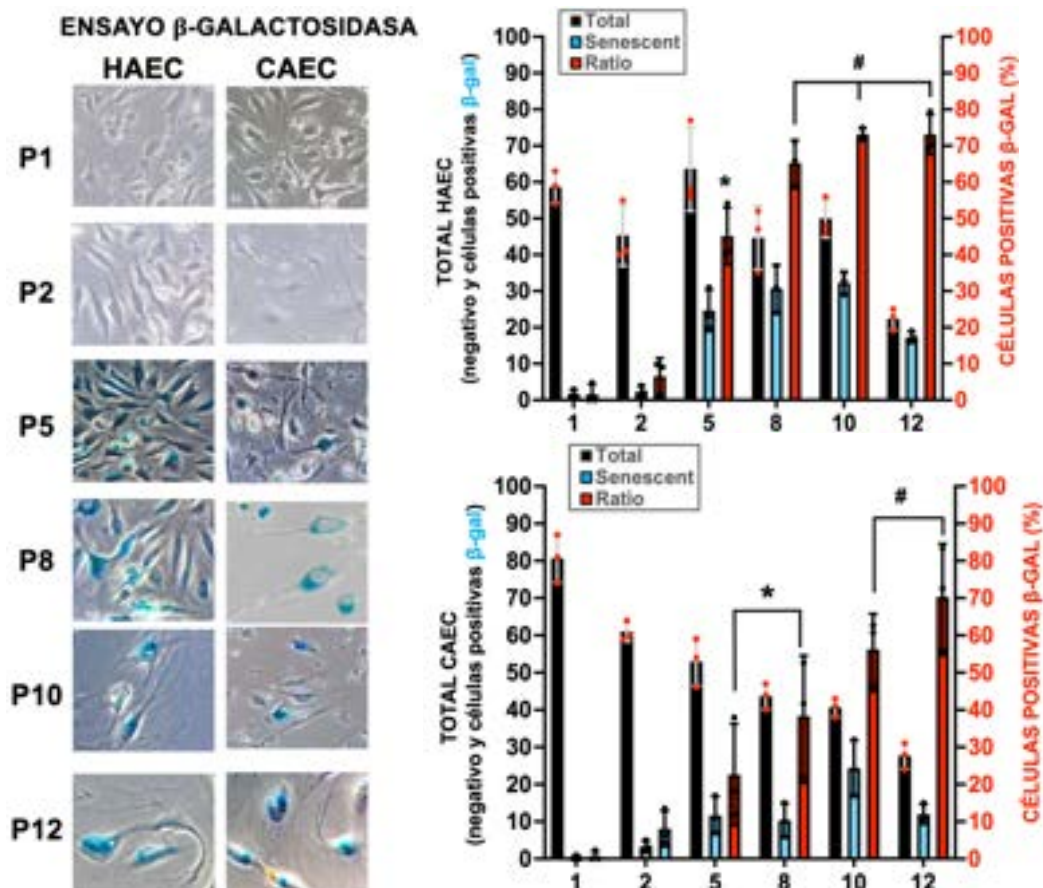
Resultados

BLOQUE III. INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS.

1. Los cultivos celulares de endotelio vascular de arteria aorta y coronaria son utilizados como modelo denominado de senescencia replicativa.

En este bloque de la Tesis doctoral, quisimos valorar la relación que puede existir entre el fenómeno de disfunción endotelial (DE) y el fenotipo senescente endotelial, con el objetivo de hallar nuevas dianas moleculares que nos permitan actuar con la finalidad de evitar la senescencia endotelial (SE) que en definitiva es responsable en buena parte del fenotipo disfuncional asociado con la edad, origen de diversas patologías cardiovasculares.

Lo primero fue establecer un modelo de Senescencia Endotelial (SE) replicativa en las líneas celulares HAEC (Células Endoteliales de arteria Aorta Humana) y CAEC (Células Endoteliales de arteria Coronaria Humana) que abarca los pases celulares desde P1 a P12, empleando el ensayo colorimétrico β -Galactosidasa como indicador de senescencia, como anteriormente citamos. Nuestros resultados mostraron una clara correlación negativa entre la población de células vivas y la aparición de células endoteliales positivas para β -Gal. El aumento de la SE se incrementó a partir del P5 para ambos tipos celulares (**Figura 7**), lo que subraya que este modelo pueda ser extrapolable a lo que sucede de forma fisiológica durante el envejecimiento vascular en ser humano (Jimenez Trinidad et al., 2021) y por lo tanto, base para nuestra búsqueda de nuevos marcadores.



Resultados

Figura 7. Inducción de senescencia en HAEC y CAEC cultivadas.

Tinción de β -galactosidasa en HAEC y CAEC cultivadas desde el Pase P1 hasta el P12. N=3 Media \pm DE. * $P < 0.05$ P1 vs P5. # $P < 0.01$ P1 vs P8, P10, P12 (HAEC). * $P < 0.01$ P1 vs P5, P8. # $p < 0.001$ P1 vs P10, P12 (CAEC).

2. La ausencia de Óxido Nítrico (NO) endotelial se asocia con la Disfunción Endotelial asociada a la SE.

Como hemos citado en la introducción, la DE se define como la pérdida de la capacidad relajante de los vasos dependiente del endotelio, proceso en el que la ausencia de Óxido Nítrico (NO) desempeña un papel fundamental. A la luz de esto, nuestra investigación inicial se centró en evaluar la regulación de la señalización del NO en respuesta al envejecimiento de las células HAEC y CAEC. Por ello, en primer lugar, examinamos mediante inmunoblot la expresión de la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS) a partir de lisados celulares desde P1 hasta P12, mostrando una disminución significativamente progresiva en su expresión, correlacionando de esta forma la DE con la SE (**Figura 8A**). Una vez confirmada la pérdida de la expresión de eNOS, nos preguntamos si, además de un descenso en el enzima productor de NO, se pudiera producir un descenso de NO en relación con la incapacidad del enzima para mantenerse funcional, para lo cual, comenzamos a examinar los factores que intervienen en el mantenimiento de la actividad eNOS, comenzando por la tetrahidrobiopterina (BH4), cofactor indispensable para preservar a eNOS acoplada como veremos con posterioridad.

La pérdida de BH4 o su no disponibilidad (su oxidación a dihidrobiopterina (BH2) es el caso más común de pérdida de biodisponibilidad de BH4), es uno de los factores clave en el desacoplamiento de eNOS, dando lugar a la incapacidad del enzima para generar NO y, en consecuencia, el equilibrio BH2/BH4 nos podría servir como indicador de la actividad de eNOS. Nuestros resultados mostraron un claro aumento progresivo en el ratio BH2/BH4 con el pase en ambos tipos celulares endoteliales, lo que nos sugiere que además de la pérdida de expresión de eNOS, la SE se correlaciona con la pérdida de su funcionalidad por el descenso que tiene lugar en cuanto a la biodisponibilidad del cofactor BH4, evitando de esta manera la producción de NO “por partida doble” durante el proceso senescente (**Figura 8B**).

La tercera causa de pérdida de la biodisponibilidad de BH4 se debe a la ausencia del enzima que interviene en su síntesis “*de novo*”, el enzima GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), en donde nuevamente pudimos corroborar la reducción significativa de los niveles de GTPCH con el incremento del fenotipo senescente (**Figura 8C**). Por último, BH2 puede reducirse a BH4, incrementando su biodisponibilidad, a través de un proceso conocido como la “vía de rescate”, en la cual está implicada la enzima Dihidrofolato Reductasa (DHFR), y al igual que en el caso anterior, los niveles de DHFR también se redujeron

Resultados

significativamente (**Figura 8D**). Tomando todos los hallazgos en conjunto, nuestros datos indican que la SE sufrida en HAEC y CAEC se correlaciona con la ocurrencia de DE, al menos , a través de una notable reducción en la biodisponibilidad de NO por los mecanismos que hemos desvelado en la presente Tesis Doctoral.

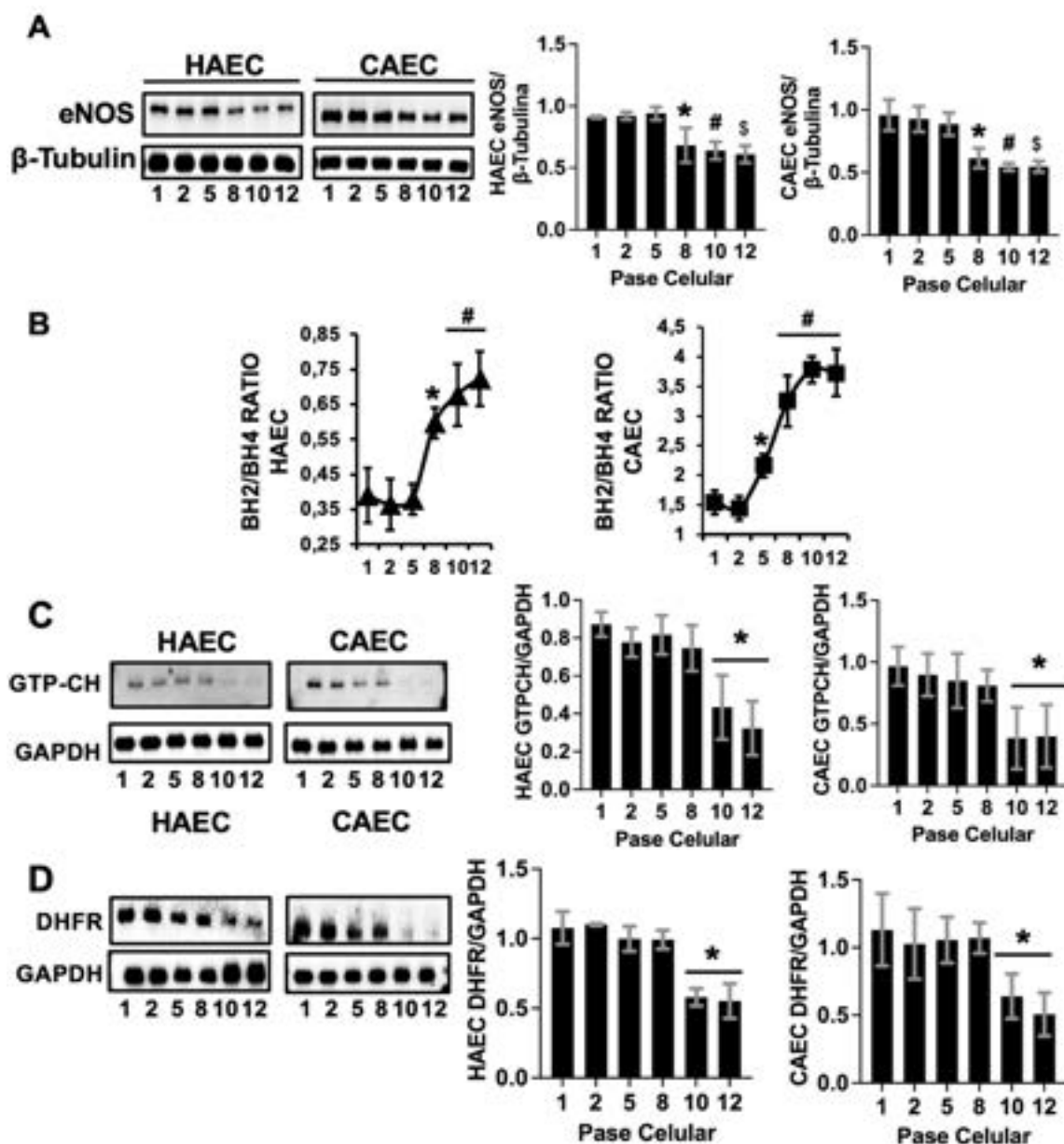


Figura 8. SE reduce la expresión de eNOS y promueve la oxidación de BH4 en HAEC y CAEC.

A) Expresión de eNOS mediante inmunoblot desde P1 hasta P12 en HAEC y CAEC (N=3. Media ± DE. * $p < 0.01$, # $p < 0.001$, \$ $p < 0.0001$ P1 vs Pase celular seleccionado).

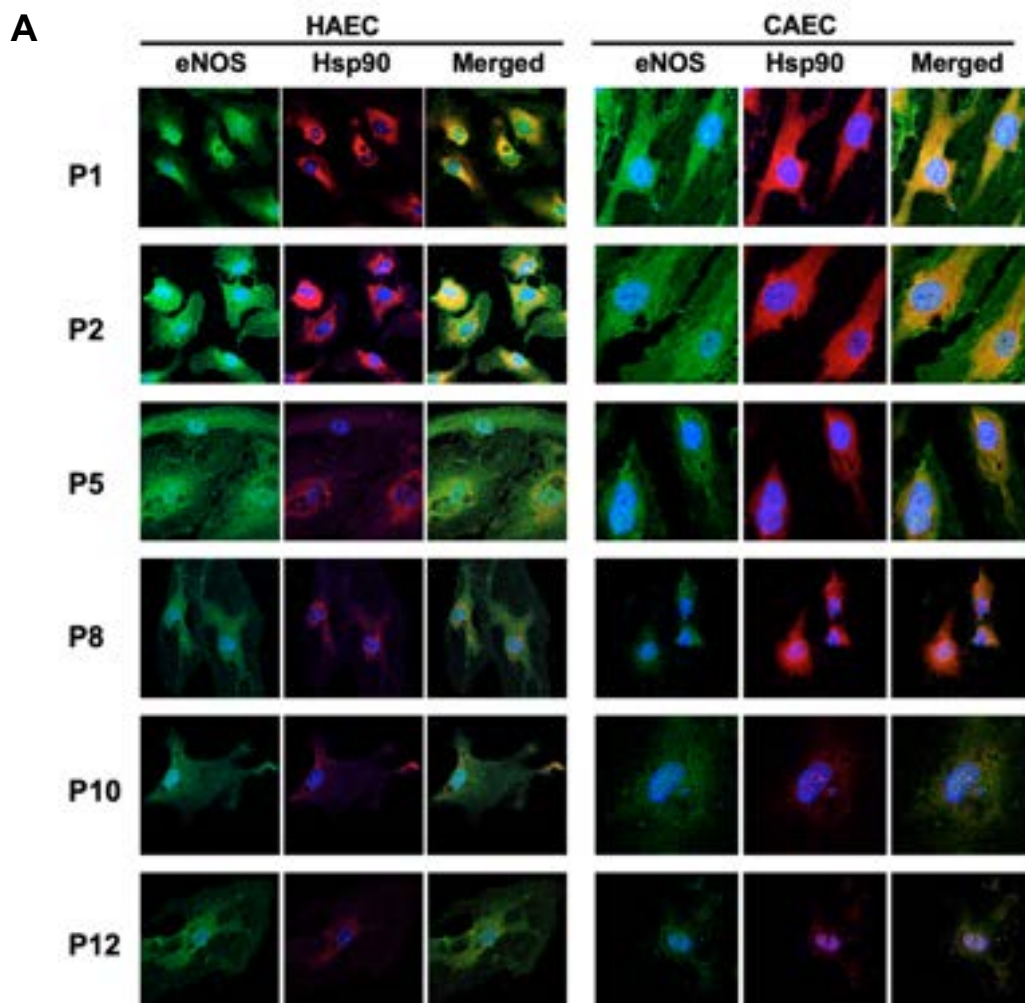
B) Relación BH2/BH4 mediante ELISA desde P1 hasta P12 en HAEC y CAEC (N=3. Media ± DE. * $p < 0.01$, # $p < 0.001$).

C y D) Expresión de GTP-Ciclohidrolasa (GTP-CH) y Dihidrofolato Reductasa (DHFR), respectivamente, mediante inmunoblot desde P1 hasta P12 en HAEC y CAEC (N=3. Media ± DE. * $p < 0.01$ vs Pase celular seleccionado).

3. La Senescencia endotelial induce el desacoplamiento de la eNOS en HAEC y CAEC.

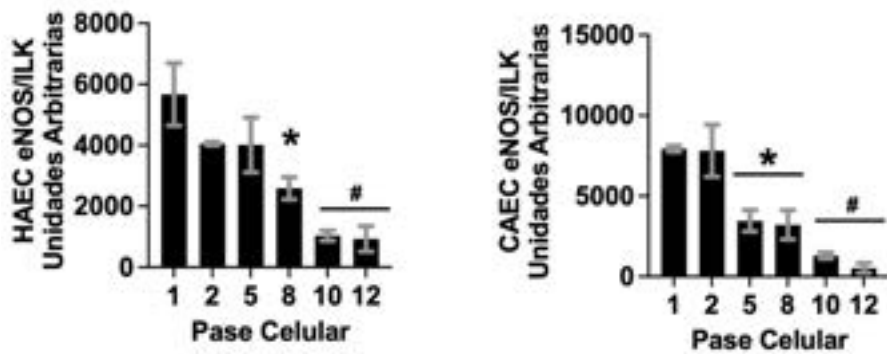
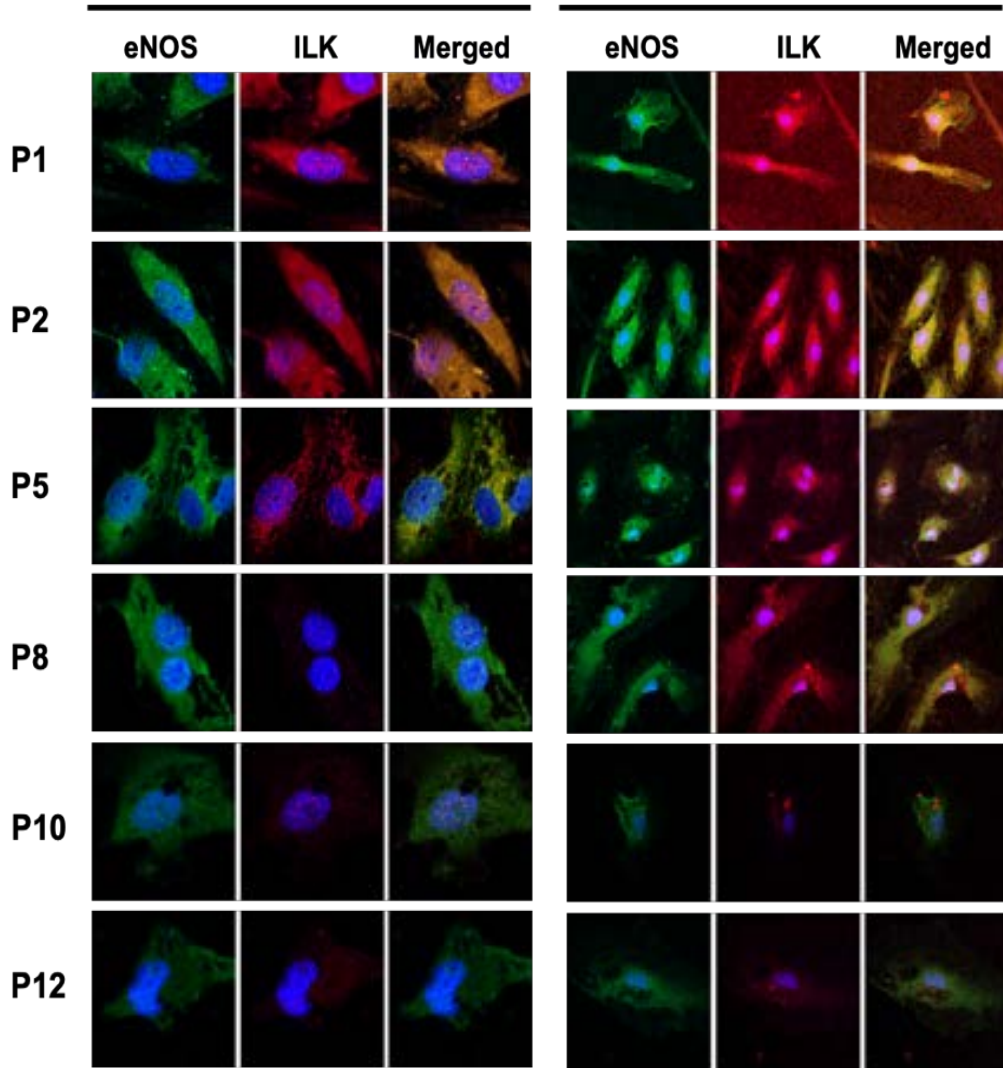
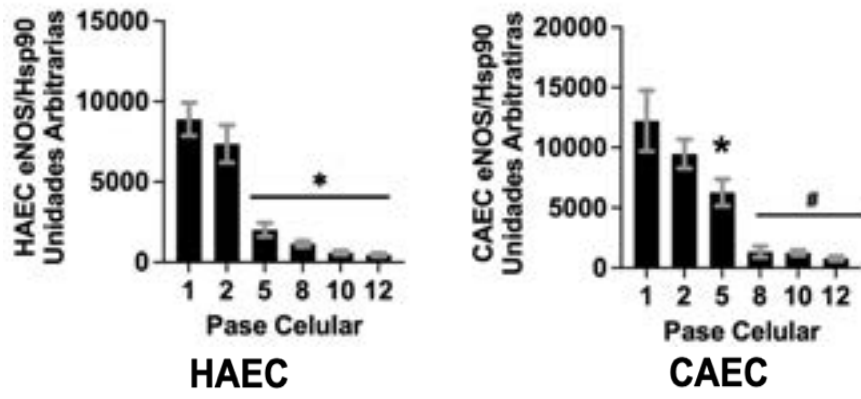
Los datos mostrados anteriormente sugieren que la SE impide una correcta producción de NO, tanto por la inhibición en la expresión del enzima, como por la pérdida de la biodisponibilidad de su cofactor BH4, que además, en su ausencia, el desacoplamiento de eNOS con otras proteínas agravan más aun la situación. De hecho, el desacoplamiento de la eNOS, en lugar de promover la producción de NO, conduce a un escenario de inflamación en el territorio endotelial, al promover la generación de anión superóxido y por tanto, contribuyendo de forma importante al estrés oxidativo (Reventun et al., 2017). Además de BH4, la funcionalidad de eNOS depende de su capacidad para interactuar con la Proteína De Choque Térmico 90 (Hsp90) y la Quinasa Ligada a Integrina (ILK), que participan activamente en la respuesta vasomotora dependiente del endotelio, como hemos descrito previamente (Herranz et al., 2012), siendo dicho acoplamiento, el responsable de la producción de NO por el enzima.

Nuestros resultados han mostrado una reducción progresiva en la co-localización de los complejos eNOS/Hsp90 y eNOS/ILK en función pase celular (**Figuras 9A y 9B, respectivamente**), evidenciando por vez primera el desacoplamiento de eNOS en respuesta a SE asociado a la DE.



Resultados

B



Resultados

Figura 9. La senescencia celular induce el desacoplamiento de eNOS con ILK Y Hsp90 en células senescentes HAEC y CAEC.

A) Microscopía confocal de eNOS (FITC) y Hsp90 (Alexa 647) en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12. Las imágenes fusionadas muestran la co-localización de ambas señales (amarillo). N=3 Media ± DE. * $p < 0.01$ vs Pase celular seleccionado (HAEC). * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ vs Pase celular seleccionado (CAEC).

B) Microscopía confocal de eNOS (FITC) e ILK (Alexa 647) en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12. Las imágenes fusionadas muestran la co-localización de ambas señales (amarillo). N=3 Media ± DE. * $p < 0.05$ P1 vs P8. # $p < 0.01$ P1 vs P10, P12 (HAEC). * $p < 0.01$ P1 vs P5, P8. # $p < 0.001$ P1 vs P10, P12 (CAEC)

4. Los radicales Superóxido y Peroxinitrito se ven incrementados durante la DE asociada a la SE.

El desacoplamiento de la eNOS en células endoteliales senescentes tiene importantes implicaciones, siendo la principal consecuencia la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, del inglés), generando así un escenario de Estrés Oxidativo (EO), el cual es uno de los principales determinantes moleculares inductivo del fenotipo senescente (Davalli et al., 2016). A este respecto, nuestros datos indican, a través del uso de la tinción histológica con DiHidroEtidina (DHE), un incremento gradual de la tinción observada mediante microscopía confocal, indicativo de un incremento de la presencia del anión Superóxido (O_2^{-1}) tanto en HAEC como en CAEC durante la SE (**Figura 10A**), lo que además promueve la generación del radical libre del nitrógeno denominado peroxinitrito ($ONOO^-$) por la combinación entre el radical superóxido con el NO, de una elevada citotoxicidad e indicativo de muerte celular. El peroxinitrito, induce el fenómeno que conocemos como nitración de proteínas (Tarin et al., 2009), al reaccionar con rapidez con los residuos hidroxilo (HO) de los restos del aminoácido Tirosina de las proteínas, el cual es fácilmente detectable mediante el uso de anticuerpos específicos anti-Nitro-Tirosina, observando en nuestro caso un incremento gradual de su presencia asociado a la SE (**Figura 10B**).

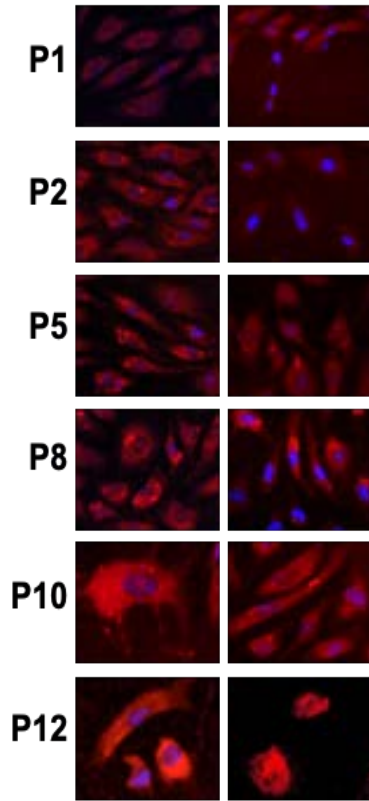
Por último, y con el objetivo de averiguar la presencia de fuentes adicionales de ROS, evaluamos la expresión de otro marcador decisivo en la formación EO, el enzima NADPH oxidasa (NOX), observando, al igual que con el peroxinitrito, su incremento gradual asociado a la SE (**Figura 10C**).

Con todos los resultados obtenidos, podemos afirmar que la SE está claramente asociada con el incremento de EO, que en el caso del endotelio vascular tiene como principales componentes la pérdida de la capacidad por parte de eNOS para producir NO a través de todos los mecanismos citados en la presente Tesis Doctoral, junto con el incremento significativo en los niveles de NADPH oxidasa, que junto con el radical superóxido proporcionado por la eNOS desacoplada, son determinantes para crear un entorno idóneo de EO y nitrosativo, desencadenantes del fenómeno senescente.

A

**SUPERÓXIDO
(DHE POSITIVO)**

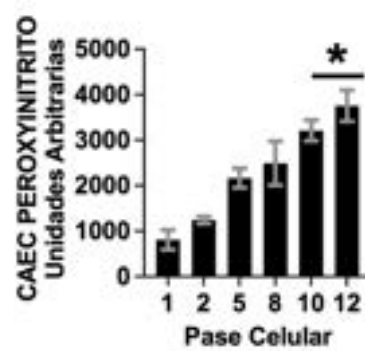
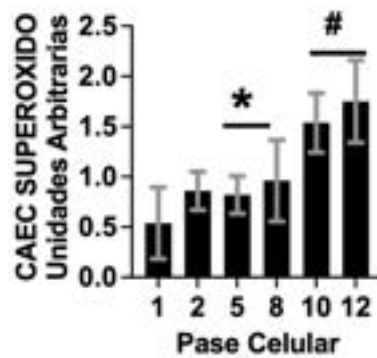
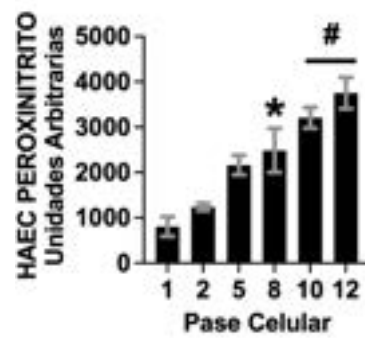
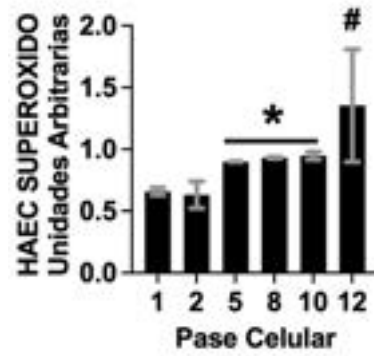
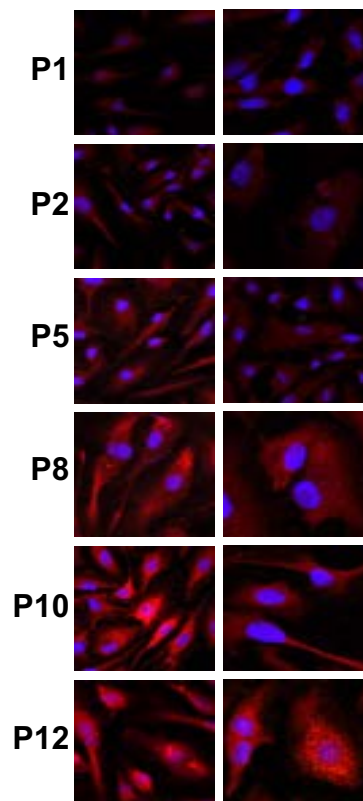
HAEC CAEC



B

**PEROXYNITRITO
(NITRO-TYROSINA
POSITIVA)**

HAEC CAEC



C

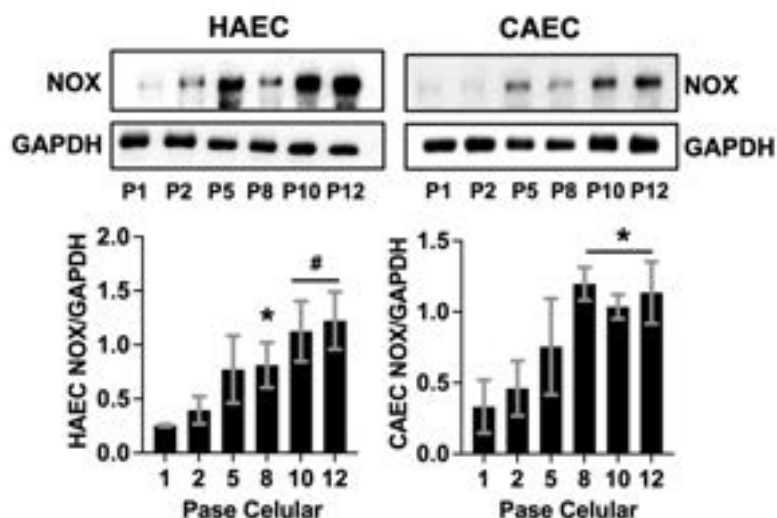


Figura 10. La senescencia endotelial induce estrés oxidativo y nitrosativo.

A) Detección de radical superóxido mediante microscopía confocal en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12. (N=3 Media \pm DE. $p < 0.05$ P1 vs pase celular seleccionado. $\#p < 0.01$ P1 vs pase celular seleccionado).

B) Detección de peroxinitrito mediante microscopía confocal en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12 (N=3 Media \pm DE. $p < 0.05$ P1 vs pase celular seleccionado. $\#p < 0.01$ P1 vs pase celular seleccionado).

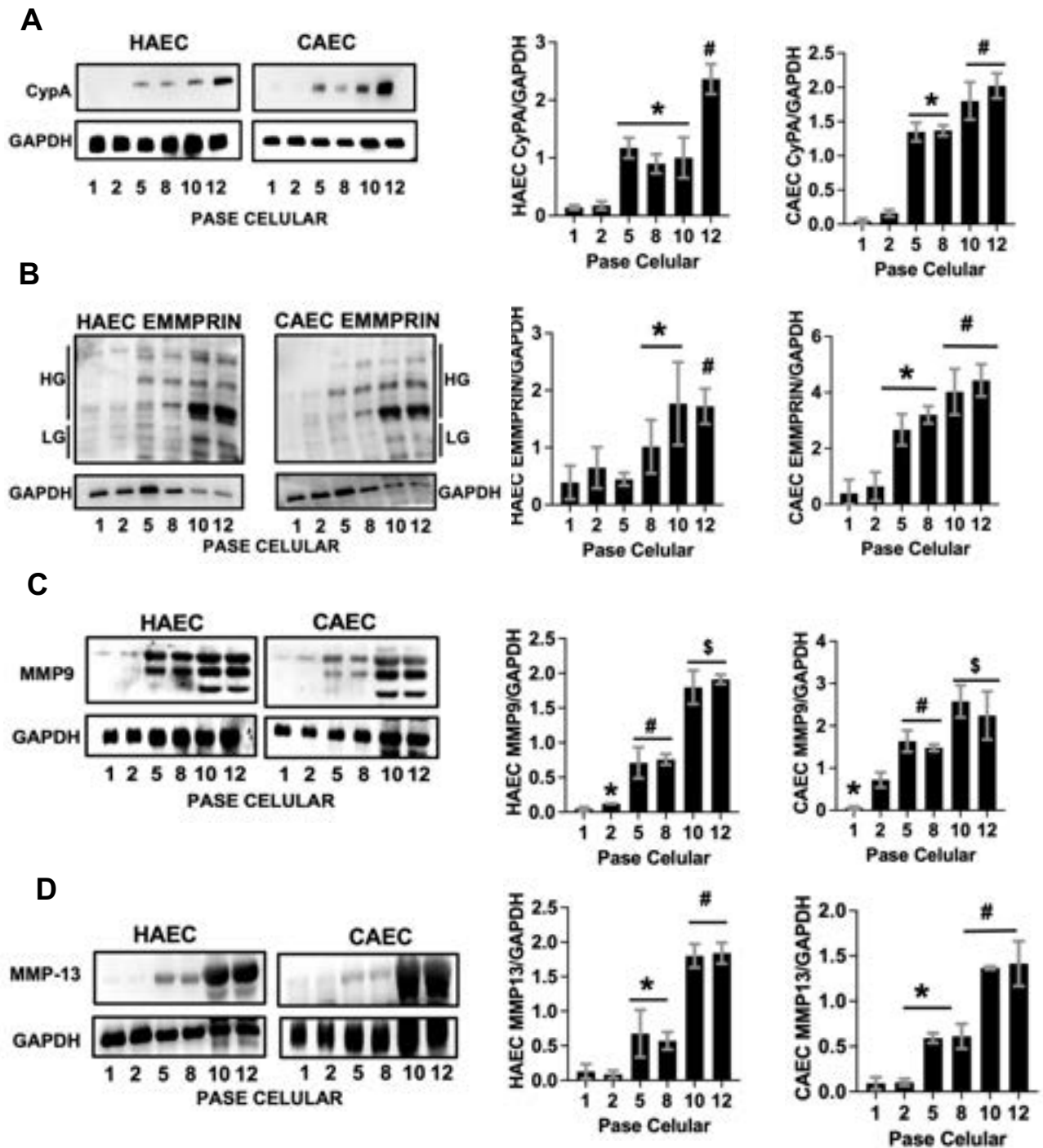
C) Expresión de NOX mediante inmunoblot en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12 (N=3 Media \pm DE. $p < 0.05$ P1 vs pase celular seleccionado. $\#p < 0.01$ P1 vs pase celular seleccionado).

5. La Senescencia Endotelial induce la expresión de marcadores de inflamación en las células senescentes.

Como hemos comentado, la sobreproducción de ROS es un factor central en el comienzo de complicaciones relacionadas con la senescencia y el disparo de una respuesta inflamatoria (Moris et al., 2017; D’Oria et al., 2020), como sucede con diversas enfermedades cardiovasculares, incluida la aterosclerosis. Notablemente, como hemos reportado en el anterior bloque de la presente tesis doctoral, la CyPA es un factor primario inducido por las ROS que amplifica las respuestas inflamatorias dentro del sistema vascular. De hecho, como ya hemos citado en distintas ocasiones, la CyPA sirve como el ligando endógeno para EMMPRIN, desencadenando una serie de eventos inflamatorios que incluyen la degradación de la matriz extracelular inducida por metaloproteinasas, seguida de la necrosis de las células musculares lisas y endoteliales. Paralelamente a la producción excesiva de ROS, observamos también que los niveles tanto de CyPA y EMMPRIN fueron significativamente elevados durante la SE (**Figura 11A,B**). Es especialmente destacable la presencia elevada de formas altamente glicosiladas de EMMPRIN (HG-EMMPRIN), que se asocian con la activación de diversas MMPs, en especial MMP9 y MMP13, claves en la degradación de la MEC

Resultados

durante las DE. Así, mediante inmunoblot mostramos un aumento de la expresión de ambas en respuesta a la SE (**Figura 11C**), lo que sugiere que el estrés oxidativo induce al menos en HAEC y CAEC el disparo de una respuesta inflamatoria favorecida por la aparición de los complejos CyPA/EMMPRIN y la subsiguiente activación de enzimas degradativos de la matriz extracelular.



Resultados

Figura 11. SE promueve la expresión de marcadores inflamatorios en HAEC y CAEC.

A y B) Expresión de CyPA (panel superior) y EMMPRIN (formas altamente glicosadas (HG) y bajamente glicosiladas (LG)) (panel inferior) mediante inmunoblot en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12. (N = 3 Media \pm DE * $p < 0.01$, # $p < 0.001$, \$ $p < 0.0001$ P1 vs Pase celular seleccionado)

C y D). Expresión de las metaloproteinasas de matriz MMP9 (paneles superiores) y MMP13 (paneles inferiores) respectivamente en las mismas células. (N = 3 Media \pm DE. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, \$ $p < 0.001$ P1 vs Pase celular seleccionado)

BLOQUE III. INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS.

Resumen

1. La Senescencia Endotelial es una respuesta relacionada con el envejecimiento y principal causa de la disfunción endotelial.
2. Durante la Senescencia Endotelial se produce el desacoplamiento de eNOS con sus cofactores BH4, ILK y Hsp90.
3. El desacoplamiento de eNOS durante la Senescencia Endotelial promueve un escenario de Estrés Oxidativo como consecuencia de la sobreproducción de Especies Reactivas de Oxígeno.
4. El Estrés Oxidativo debido al desacoplamiento de eNOS lidera a un ambiente proinflamatorio en el territorio endotelial con el incremento de CyPA y EMMPRIN.

Resultados

BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE ATEROSCLEROSIS.

1. Los ratones ApoE^{-/-} añosos promueven el desarrollo de la aterosclerosis.

En este último bloque de la presente tesis doctoral nos centramos en la búsqueda de nuevas dianas moleculares de la SE asociada a unas de las patologías cardiovascular con mayor prevalencia, la aterosclerosis. El primer propósito de nuestra investigación es demostrar mediante un modelo animal aterosclerótico, que los ratones de edad avanzada deficientes para el gen de la apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) con un modelo establecido de aterosclerosis (Tarin et al., 2009) tienen una mayor propensión al desarrollo de aterosclerosis asociada al envejecimiento. Para demostrar si la aterosclerosis es un trastorno relacionado con el envejecimiento y si los ratones de edad avanzada son más propensos a desarrollarla, alimentamos al mismo tiempo ratones ApoE^{-/-} jóvenes (8 semanas) y de edad avanzada (24 semanas) con una dieta hipercolesterolémica durante 12 semanas, tiempo tras el cual procedimos a evaluar la presencia de depósitos lipídicos en las aortas completas de los animales con el compuesto Oil Red O (ORO), y la presencia de placas de ateroma en secciones microscópicas de las aortas, teñidas con Hematoxilina/Eosina (H/E), revelando en ambos casos un aumento significativo en la acumulación de lípidos en la aortas aisladas de los animales de mayor edad en comparación con sus homólogos más jóvenes y, además, mostrando una mayor tamaño de la placa de ateroma (**Figura 12 AB**). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la edad de animal está condicionando la diferencia en la formación y desarrollo de la placa de ateroma.

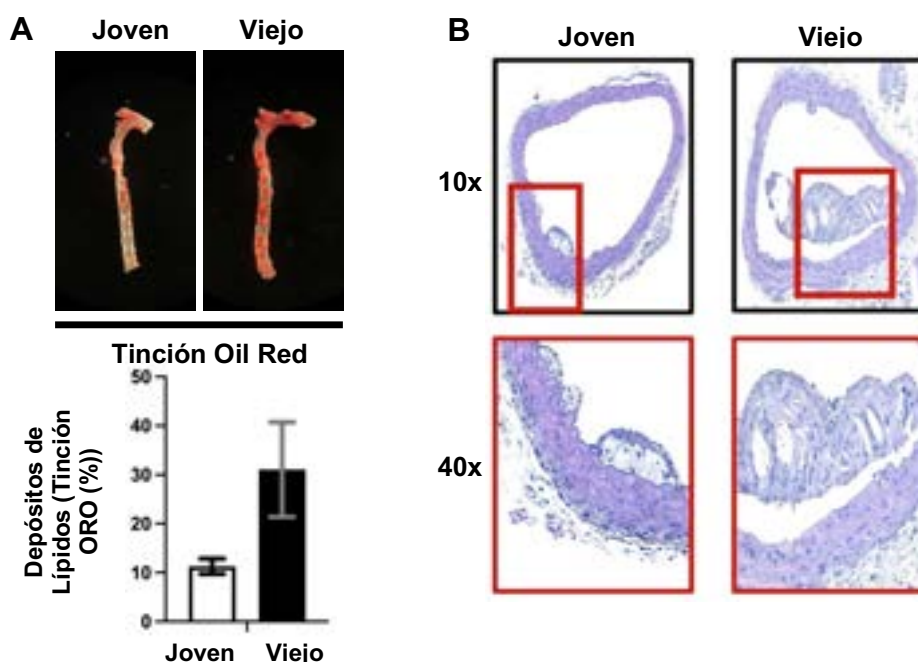


Figura 12. Aterosclerosis inducida en ratones ApoE^{-/-} suplementados con dieta hipercolesterolémica.

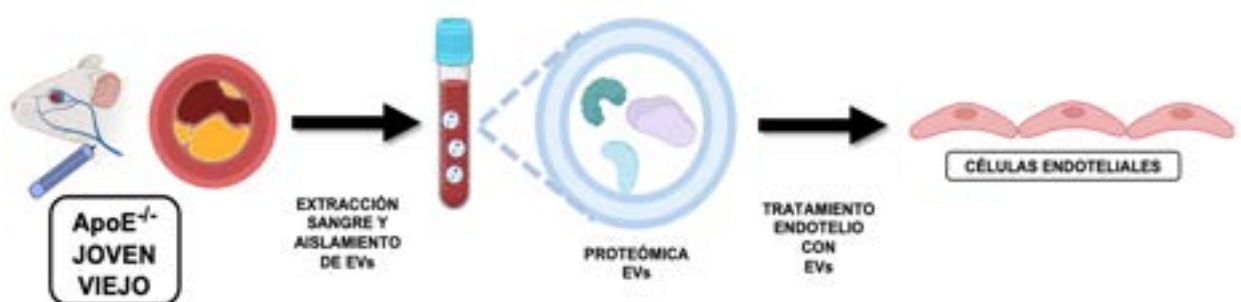
A) Tinción con Oil Red O en la aorta de ratones jóvenes y de edad avanzada ApoE^{-/-} ateroscleróticos suplementados con dieta alta en grasas durante 12 semanas (N=3 ratones/grupo. Media ± DE. *p<0.05).

B) Tinción de Hematoxilina/Eosina de secciones aórticas de los mismos ratones mencionados en la sección A.

2. Las EVs aisladas de ratones ApoE^{-/-} añosos inducen SE en HAEC y CAEC.

Como mencionamos con anterioridad, la aterosclerosis es una enfermedad relacionada con el envejecimiento que subyace a la SE, al EO y a la inflamación, factores que se incrementan en personas más de mayor edad. Además, la senescencia implica la activación del denominado Fenotipo Secretor Asociado a La Senescencia (SASP), lo que supone la liberación al medio extracelular una serie de componentes específicos dentro de varios tipos de EVs. Para analizar si la liberación de estas EVs puede jugar un papel clave en la SE, aislamos EVs circulantes en sangre tanto de ratones jóvenes como de ratones añosos ApoE^{-/-} en cuatro momentos del tiempo distintos (a las 0, 4, 8 y 12 semanas posteriores a la dieta hipercolesterolémica), para posteriormente agregarlas a los cultivos primarios de células endoteliales jóvenes (P1), que no mostraron ningún signo de senescencia (**Figura 13A**). Notablemente, todas las EVs aisladas de ratones ateroscleróticos añosos indujeron SE en cultivos de células P1 (**Figura 13B**). En contraste, cuando se agregaron a estas mismas células, pero en pases más altos (P5), los EVs derivados de ratones jóvenes, y aisladas exactamente a los mismo tiempos, experimentaron un retraso significativo en la inducción del fenotipo senescente (**Figura 13C**). Todo ello nos indica que efectivamente, la edad del animal determina la liberación de un serie de EVs con un contenido concreto (aún desconocido) que puede inducir la actividad senescente de las células endoteliales.

A



Resultados

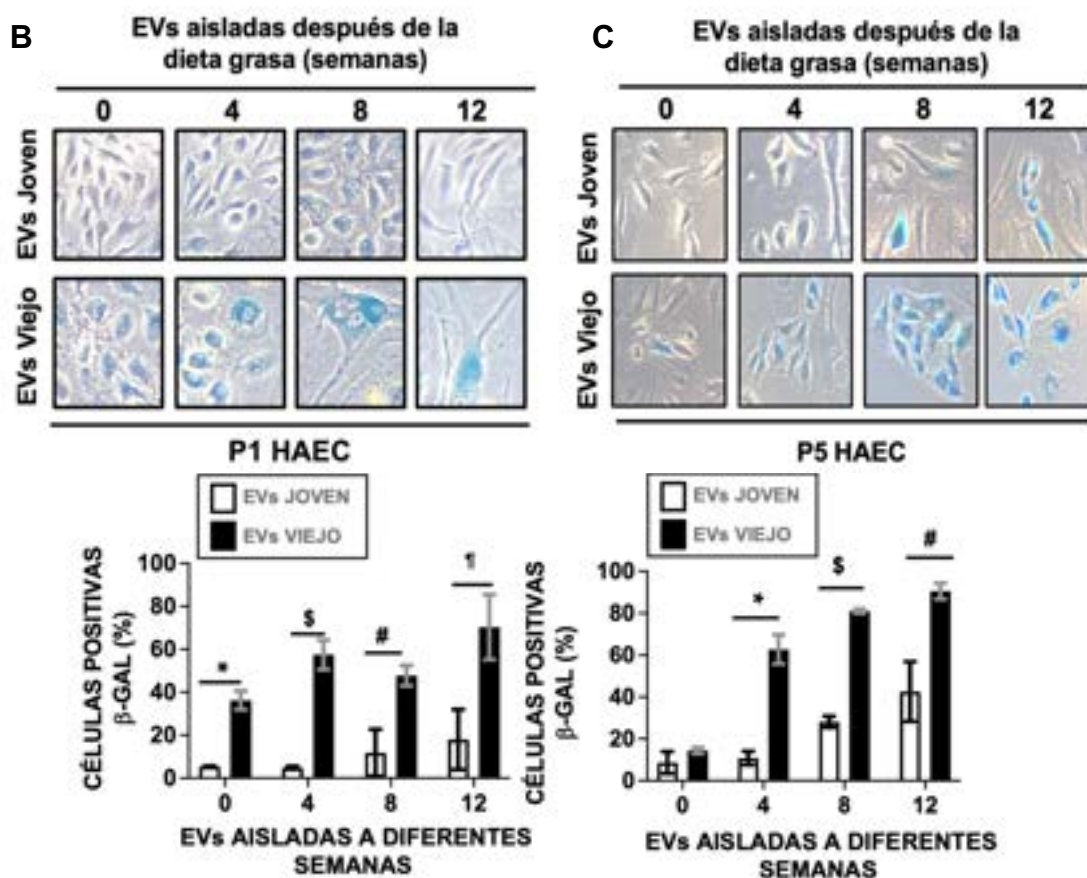


Figura 13. EVs aisladas de sangre de ratones ateroscleróticos añosos $ApoE^{-/-}$ inducen SE en células endoteliales jóvenes.

A) Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro (400x) del ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia con el tratamiento de EVs en endotelio sano (P0). (N=3. Media \pm DE. * $p < 0.01$, # $p < 0.01$, \$ $p < 0.001$, † $p < 0.0001$ EVs Joven vs EVs Viejo).

B) Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro (400x) del ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia con el tratamiento de EVs en endotelio senescente (P5). (N=3. Media \pm DE. * $p < 0.01$, # $p < 0.01$, \$ $p < 0.001$ EVs Joven vs EVs Viejo)

3. Las EVs circulantes de ratones ateroscleróticos muestran una firma Proteómica asociada al envejecimiento y al metabolismo lipídico.

Una vez determinado que la edad cronológica del animal está determinando el proceso de la aterosclerosis, entre otros mecanismos, a través de la inducción de la SE, nos preguntamos qué relación existe entre la edad y el contenido que se encuentran en las EVs. Hipotetizamos que ratones $ApoE^{-/-}$ añosos liberan una serie de EVs cargadas con una serie de componentes específicos distintos a la de las EVs liberadas por ratones más jóvenes, y ese hecho podría ser clave en el mayor o menor efecto sobre la aterosclerosis. Para dar respuesta a esta cuestión, realizamos un análisis proteómico mediante espectrometría de masas (QExactive™ HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap del Servicio de Apoyo de la Universidad de Málaga (SCAI)) de las EVs aisladas de ratones $ApoE^{-/-}$ tanto jóvenes y como añosos alimentados con dieta hipercolesterolémica

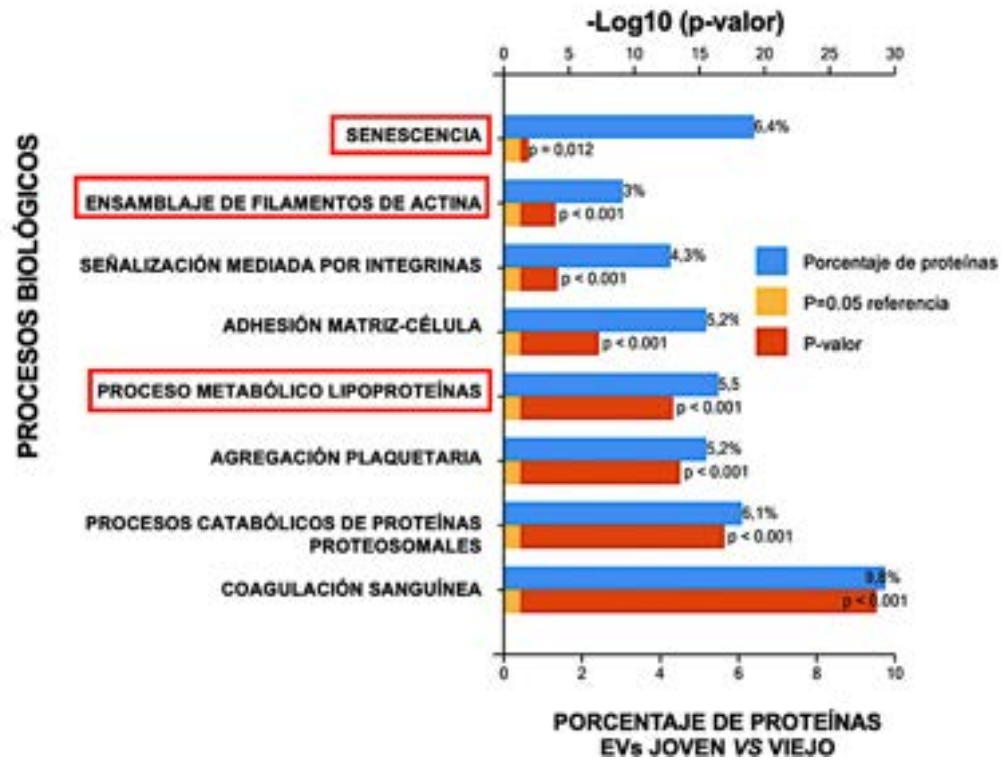
Resultados

durante 12 semanas, proceso tras el cual pudimos llegar a identificar hasta un total de 424 proteínas. Un análisis más detallado mediante la herramienta de análisis de enriquecimiento funcional *FUNRINCH*, nos permitió además identificar hasta un total de 22 proteínas aisladas de ratones ApoE^{-/-} añosos (**Tabla 2**) y caracterizar su funcionalidad, identificando proteínas involucradas en procesos biológicos como el envejecimiento, el metabolismo lipídico y el ensamblaje de filamentos de actina (**Figura 14A**), mientras que un examen detallado (Volcano Plot) nos reveló la existencia de tres proteínas diferencialmente expresadas en las EVs de ratones añosos, focalizando gran parte de nuestra atención en la Proteína 1 asociada a la Ciclasa (CAP1) (**Figura 14B**). El interés de esta proteína reside fundamentalmente en su estrecha relación recientemente revelada con la aterosclerosis, en donde CAP1 se identificó recientemente como un cofactor crucial de unión a PCSK9, como anteriormente ya hemos descrito, facilitando la degradación de los receptores de LDL (LDLr) y por tanto, clave para que PCSK9 contribuya al incremento del LDLc en sangre. Un dato a tener en cuenta consiste en que mientras que CAP1 se encontraba diferencialmente presente en las EVs de los ratones añosos, PCSK9 fue hallada tanto en las EVs de ratón joven y añoso de manera indistinta. Es en este punto donde comenzamos a evaluar y caracterizar en profundidad a esta proteína en el contexto de la SE asociada a la aterosclerosis.

Nombre proteína	Símbolo	Nombre proteína	Símbolo
Betaina--homocisteína S metiltransferasa	<i>Bhmt</i>	Proteína Subunidad α del Proteasoma 2	<i>Pσμα2</i>
Proteína Asociada a la Adenilil Ciclasa 1	<i>Cap1</i>	Cavina 2	<i>Cavin2</i>
Proteína Olfactomedina 3	<i>Olfml3</i>	Proteína Tenascina-C	<i>Tnc</i>
Inhibidor de Serina Proteasa C1	<i>Serpinc1</i>	Enolasa 3	<i>Eno3</i>
Calponina 2	<i>Cnn2</i>	Tubulina α 1B	<i>Tuba1b</i>
Cadena Ligera de Miosina 12B	<i>Myl12b</i>	Proteína Inter α Inhibidor H4	<i>Itih4</i>
Proteína Mitocondrial Creatina Quinasa Tipo 1	<i>Ckmt1</i>	Troponina T tipo 4	<i>Tpm4</i>
Subunidad α Proteasoma Tipo 3	<i>Pσμα3</i>	Proteína Subunidad β 4 del Proteasoma	<i>Pσμα4</i>
Haptoglobina	<i>Hp</i>	Proteína del Canal del Anión dependiente de Voltaje	<i>Vdac2</i>
Proteína Subunidad β del Proteasoma	<i>Pσμα1</i>	Subunidad pesada 1 de Dineína Ciliar	<i>Dync1h1</i>
Proteína Subunidad β del Proteasoma 2	<i>Pσμα2</i>	Proteína Subunidad α del Proteasoma 6	<i>Pσμα6</i>

Tabla 2. Listado de las 22 proteínas diferencialmente expresadas en las EVs aisladas de ratones ApoE^{-/-} añosos.

A



B

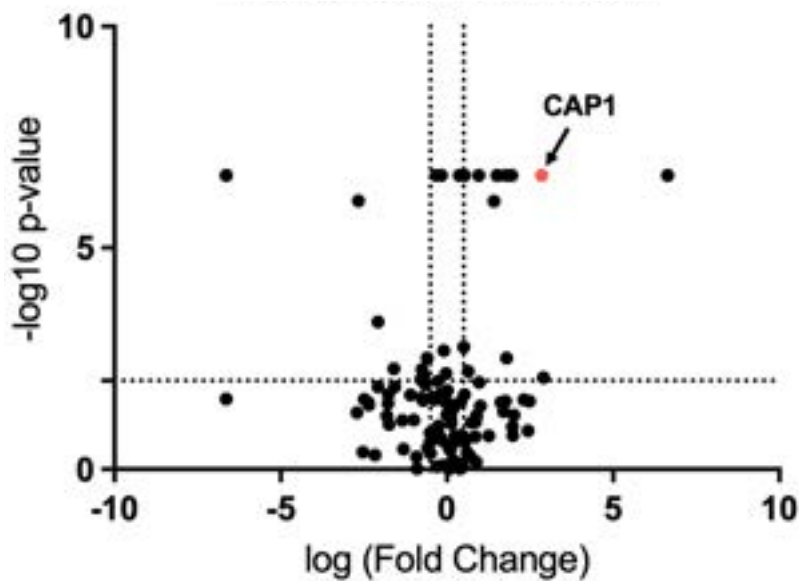


Figura 14. Firma proteómica de EVs aisladas de ratones ateroscleróticos ApoE^{-/-} jóvenes y añosos.

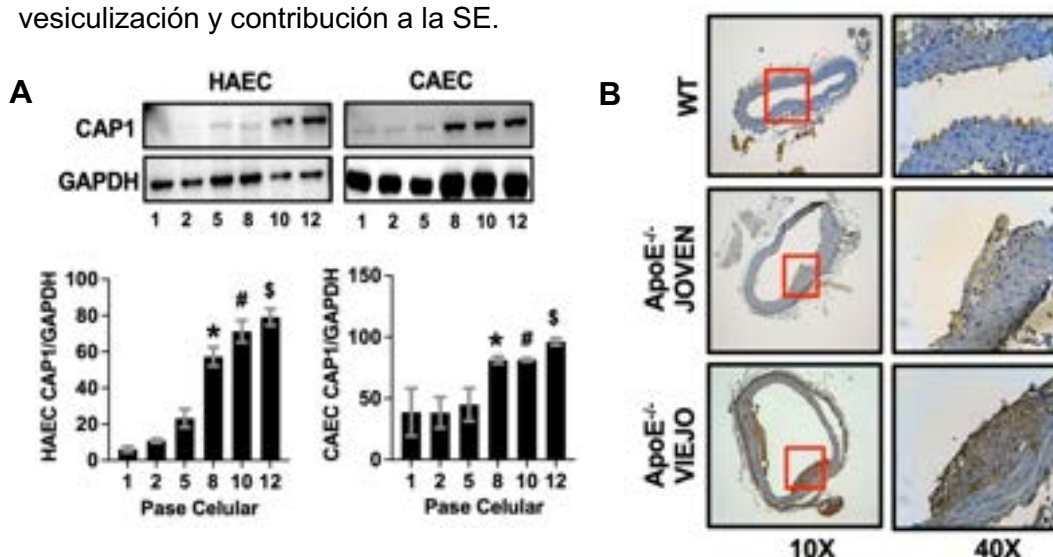
A) Análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas presentes en las VE circulantes en sangre de ratones con ApoE nula envejecidos frente a ratones con ApoE nula jóvenes.

B) Gráfico Volcano Plot representando una expresión disminuida (izquierda) o aumentada (derecha) de proteínas de EVs aisladas de ratones ApoE^{-/-} viejos en comparación con ApoE^{-/-} jóvenes.

4. CAP1 está asociada a la Senescencia Endotelial en aterosclerosis.

Hoy en día no existen marcadores moleculares fiables en número suficiente que nos permitan determinar si una persona, independientemente de su edad cronológica, vaya a desarrollar o no una de las enfermedades cardiovasculares con mayor prevalencia como es la aterosclerosis, aparte de los estudios con tecnología de imagen por resonancia, PET y Ecografía 3D, los cuales requieren tiempo y especialmente disponibilidad de una infraestructura que extremadamente pocos centros de atención primaria disponen (Mendieta et al., 2023; Fernández-Friera et al., 2019). Nosotros hemos postulado a CAP1 como una diana molecular predictiva para determinar la salud endotelial y por ende, padecer aterosclerosis.

Estudiamos inicialmente mediante inmunoblot la expresión de CAP1 en el modelo de SE replicativa, observando que a medida que aumentaban los pases celulares, la expresión de CAP1 también lo hacía (**Figura 15A**). Además, de las células también quisimos evaluar su expresión en las aortas de los ratones ApoE^{-/-} tanto jóvenes como añosos, observando una mayor presencia de CAP1 en las placas de ateroma del grupo de ratones más envejecidos (**Figura 15B**). Dada la especial relación con PCSK9 recientemente descrita, quisimos además estudiar si esta proteína pudiera estar siendo expresada de forma semejante a CAP9, pero no fue así, detectando su presencia por igual en los dos tipos de endotelio vascular, sin diferencias significativas en relación con la SE (**Figura 15C**). Finalmente, y no menos interesante, CAP1 también se localizó en los sobrenadantes de los cultivos celulares, indicativo de su posible secreción en forma particulada (**Figura 15D**). Respecto a este último resultado, la incubación tanto de HAEC como de CAEC en pase 5 con los sobrenadantes indujeron un incremento e la senescencia de manera significativa (**Figura 15E**). Este conjunto de resultados apunta inequívocamente a la existencia de una relación directa entre la expresión de CAP1, su vesiculización y contribución a la SE.



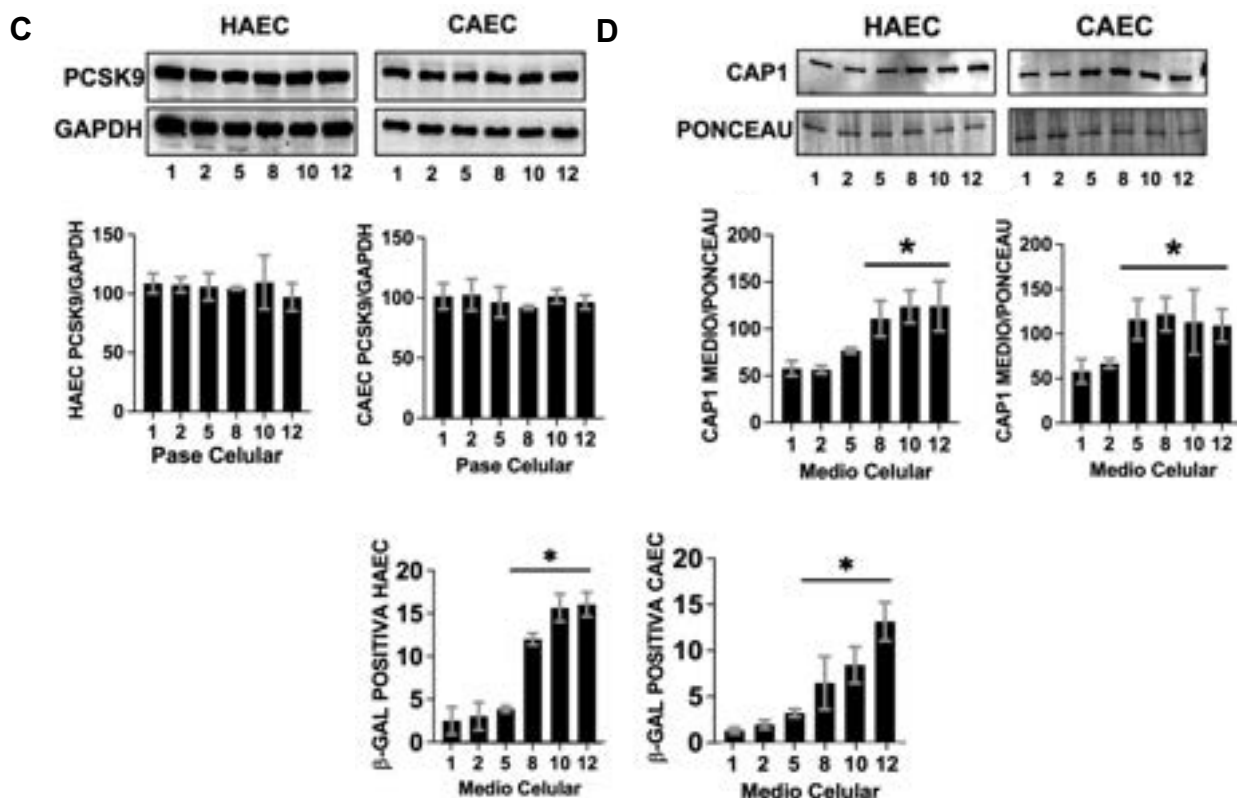


Figura 15. CAP1 tiene relación directa en la Senescencia Endotelial

A) Expresión de CAP1 mediante inmunoblot en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12 (N=3 Media ± DE. * $p < 0.05$; # $p < 0.01$; \$ $p < 0.001$ P1 vs pase celular seleccionado)

B) Detección de CAP1 mediante inmunohistoquímica en placas de ateromas de ratones WT, ApoE^{-/-} joven y ApoE^{-/-} viejo. Campo claro (400x) (N=3 animales/grupo).

C) Expresión de PCSK9 mediante inmunoblot en HAEC y CAEC desde P1 hasta P12 (N=3 Media ± DE)

D) Expresión de CAP1 mediante inmunoblot en medio de cultivo HAEC y CAEC desde P1 hasta P12 (N=3 Media ± DE. * $p < 0.05$ vs medio de cultivo seleccionado)

E) Ensayo de β-galactosidasa asociada a senescencia con el tratamiento de EVs aisladas de medios de cultivos HAEC y CAEC. (N=3. Media ± DE. * $p < 0.05$)

5. CAP1 promueve la Senescencia Endotelial en HAEC y CAEC

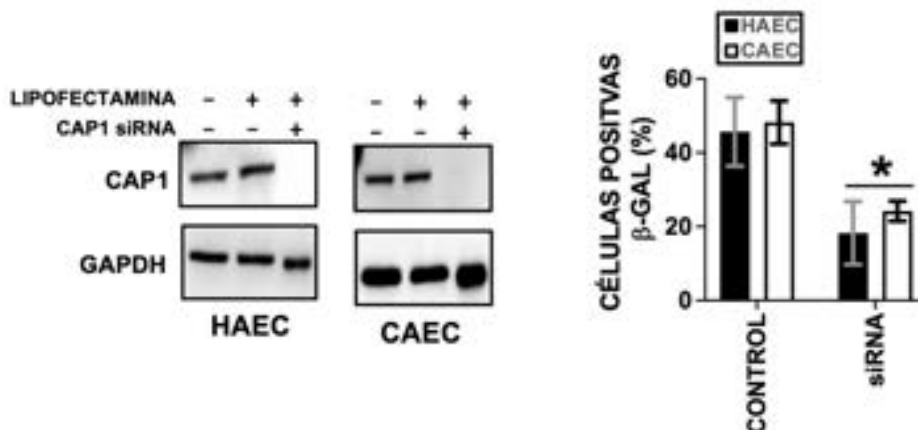
Una vez confirmado que los niveles de CAP1 se correlacionan positivamente con la SE, nuestro siguiente paso fue determinar qué papel podría específico pudiera estar jugando en el proceso senescente. Para ello, llevamos a cabo su silenciamiento génico a través del uso de un ARN de interferencia específico para CAP1 (siRNA CAP1) en las dos líneas endoteliales, gracias a lo cual pudimos constatar tanto su inhibición, como un descenso significativo de la SE que se genera tanto en HAEC como en CAEC (**Figura 16A**). La validez de este resultado surgió tras restablecer la expresión de CAP1 mediante transfección de las mismas células endoteliales silenciadas con un vector de expresión eucariótico que expresa el cDNA de CAP1 (al que denominamos pCAP1, ver Material y Métodos para conocer el detalle). Sorprendentemente, pudimos rescatar el

Resultados

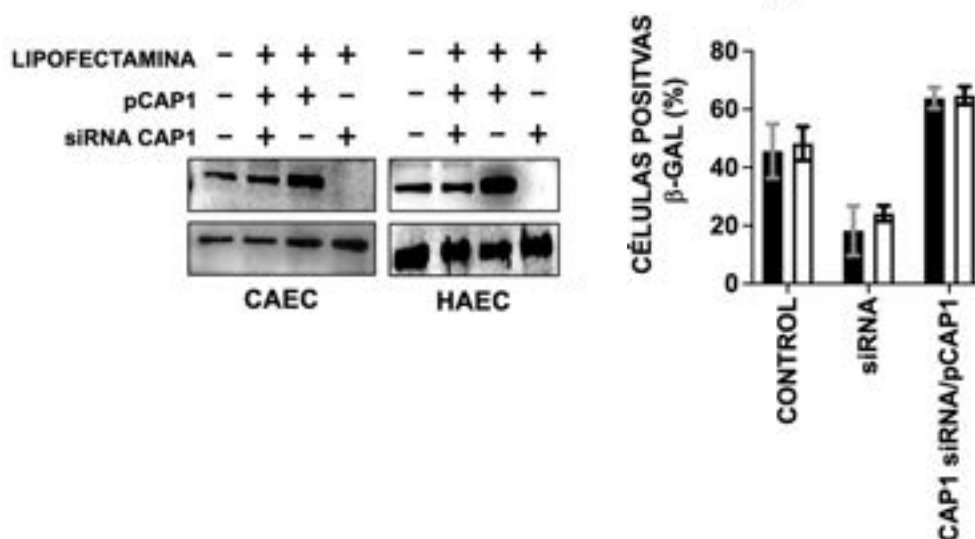
fenotipo secretor, disparando en este nuevo entorno la SE, previamente comprometida con el silenciamiento inicial (**Figura 16B**). El conjunto de estos resultados nos muestra, por vez primera, el papel fundamental de la proteína CAP1 para inducir SE, lo que nos reafirma en nuestro planteamiento sobre el uso de CAP1 como una nueva diana terapéutica contra la aterosclerosis.

Por último, hemos citado que CAP1 es un cofactor clave de PCSK9, proteína decisiva en la orquestación del metabolismo del colesterol. Para dar respuesta a la posible implicación de PCSK9 en los efectos de CAP1 sobre la SE, procedimos a incubar el endotelio vascular en presencia del fármaco Evolocumad, un anticuerpo inhibidor selectivo de PCSK9 utilizado en la clínica, que sin embargo, no reportó diferencia alguna en respuesta a la SE en ambos tipos celulares (**Figura 16C**), ni si quiera al sobreexpresar CAP1 (pCAP1) en células silenciadas (**Figura 16D**). Por todo ello, podemos afirmar que el efecto de CAP1 sobre la SE es independiente de su asociación con PCSK9, lo que refuerza la idea de CAP1 como una nueva diana terapéutica.

A



B



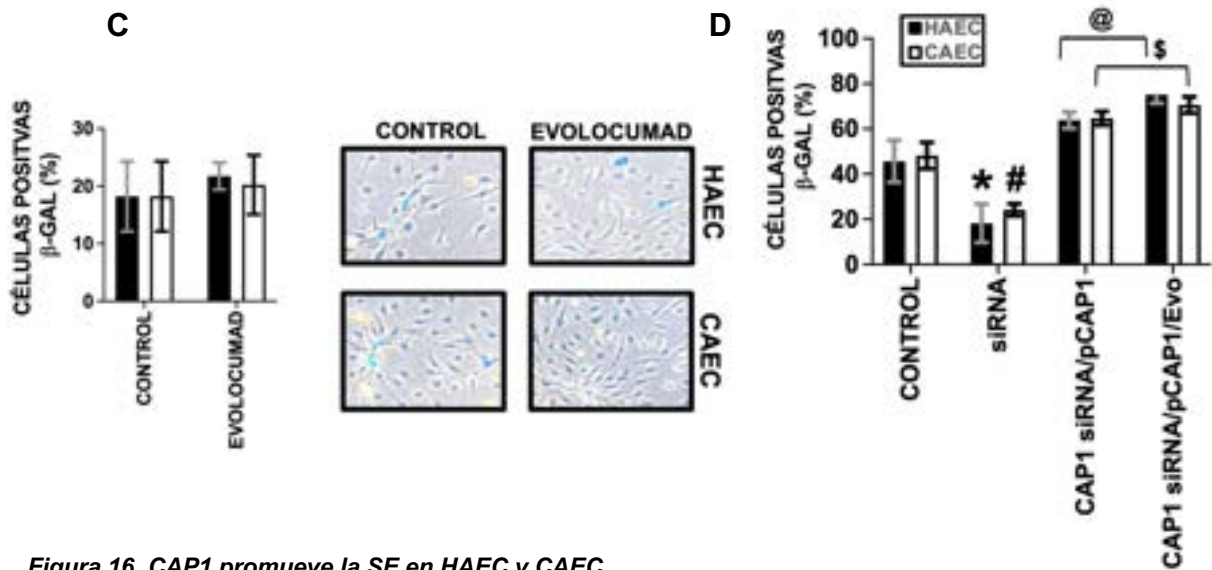


Figura 16. CAP1 promueve la SE en HAEC y CAEC.

A) Ensayo β-galactosidasa y inmunoblot en HAEC y CAEC silenciadas con siRNA CAP1 (N=3 Media ± DE. *p<0.05 siRNA vs Control)

B) Ensayo β-galactosidasa y inmunoblot en HAEC y CAEC silenciadas con siRNA CAP1 y transfectadas con el plásmido pCAP1 (N=3 Media ± DE. *p<0.05 siRNA vs Control; *p<0.05 siRNA vs siRNA CAP1/pCAP1)

C) Ensayo β-galactosidasa en HAEC y CAEC tratadas con 100 μg/ml del inhibidor selectivo PCSK9 Evolocumab (N=3. Media ± DE).

D) Ensayo β-galactosidasa en células endoteliales tratadas con Evolocumab como en C. (N=3 Media ± DE. *p<0,05, y #p<0,05 Control vs CAP1 siRNA en HAEC y CAEC respectivamente. @p<0,05 HAEC CAP1 siRNA/pCAP1 y CAP1 siRNA/pCAP1/Evo vs Control. p<0,05 CAP1 siRNA/pCAP1 y CAP1 siRNA/pCAP1/Evo vs Control en CAEC.

6. Las EVs aisladas de ratones ApoE^{-/-} que contienen CAP1 promueven la aterosclerosis y la SE en las aortas de ratones Wild Type.

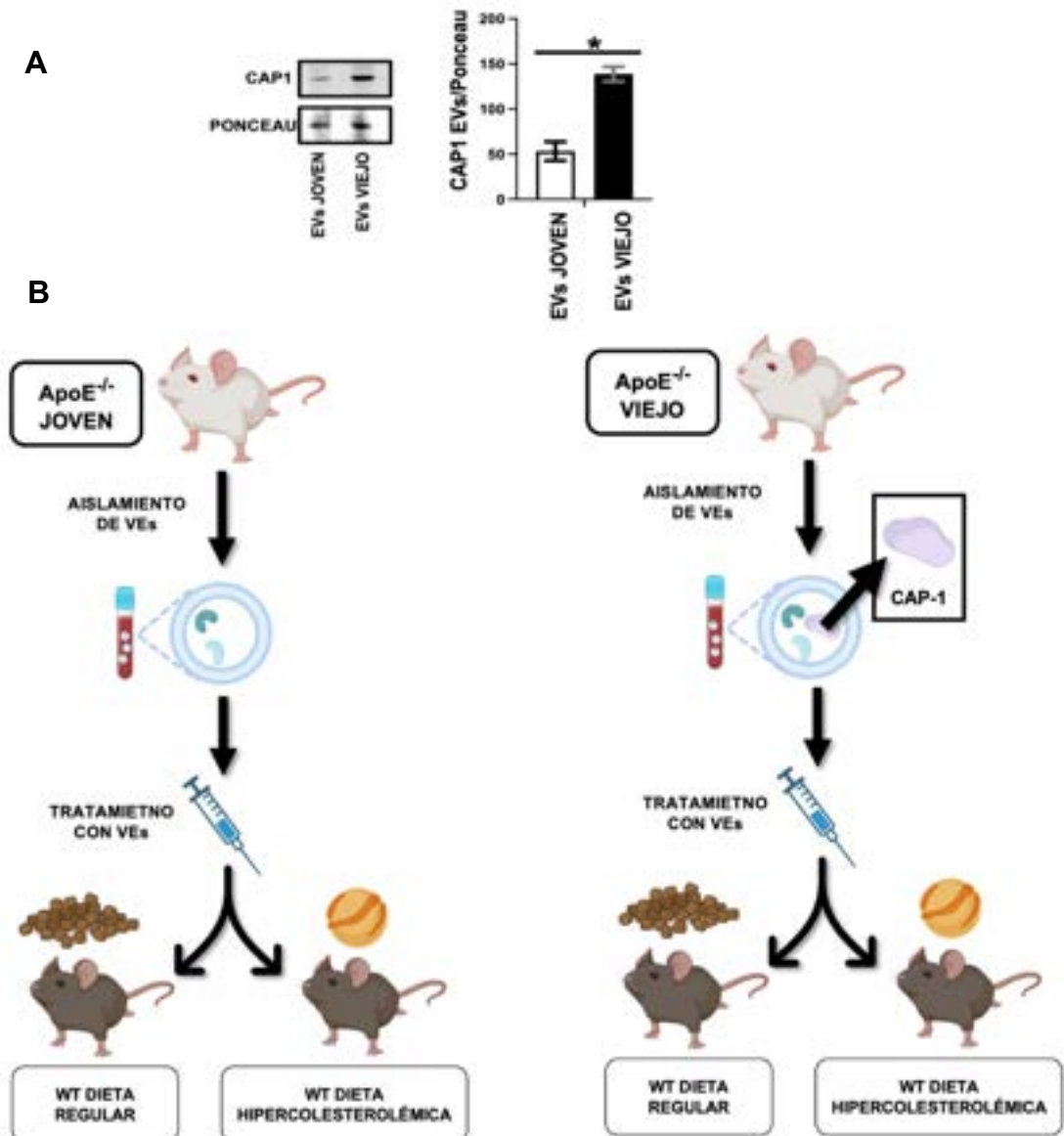
Una vez determinado el papel que juega CAP1 en la SE, nuestro siguiente paso fue determinar cómo influye esta proteína directamente en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis.

Para evaluar la relevancia de CAP1 en un modelo *in vivo*, aislamos EVs de ratones jóvenes y añosos deficientes para ApoE^{-/-}, observando como era de esperar, un aumento significativo de CAP1 en las EVs de los ratones añosos (**Figura 17A**), lo que nos llevó a preguntarnos si esto también podría tener un impacto directo *in vivo* en ratones Wild Type de la cepa C57BL/6, la misma cepa de los ratones KO para ApoE.

Para intentar resolver esa cuestión, inyectamos 300 μg/semana de EVs de ratones jóvenes y añosos ApoE^{-/-} en ratones WT jóvenes durante un período de 2 semanas a

Resultados

los cuales también les suplementamos con dieta regular o dieta hipercolesterolémica (Diseño experimental, **Figura 17B**). Posteriormente, llevamos a cabo el aislamiento de las aortas, donde practicamos un ensayo de senescencia en secciones de los dos tipos de ratones, observando que, a pesar del aumento observado en la tinción positiva dentro de las aortas de los ratones envejecidos, la inyección de EVs también indujo SE en sus homólogos más jóvenes, lo que sugiere una correlación con la SE asociada al envejecimiento. Notablemente, también encontramos el inicio de formación de placas ateroscleróticas en los ratones WT añosos suplementados con dieta hipercolesterolémica tras la inyección de EVs, lo que produjo un resultado altamente inesperado en comparación con las aortas de ratones WT jóvenes (**Figura 17C**). Por todo ello, y tomados en conjunto, los resultados aquí planteados sugieren claramente la capacidad de las EVs portadoras de CAP1 para inducir SE y un fenotipo claramente aterosclerótico en ratones WT suplementados con dieta hipercolesterolémica.



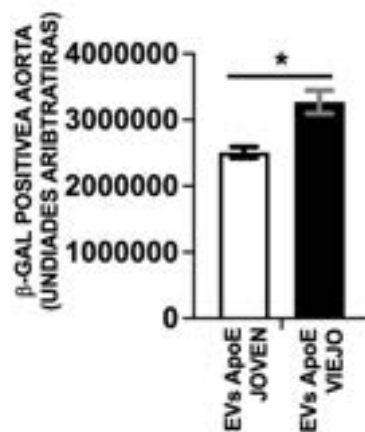
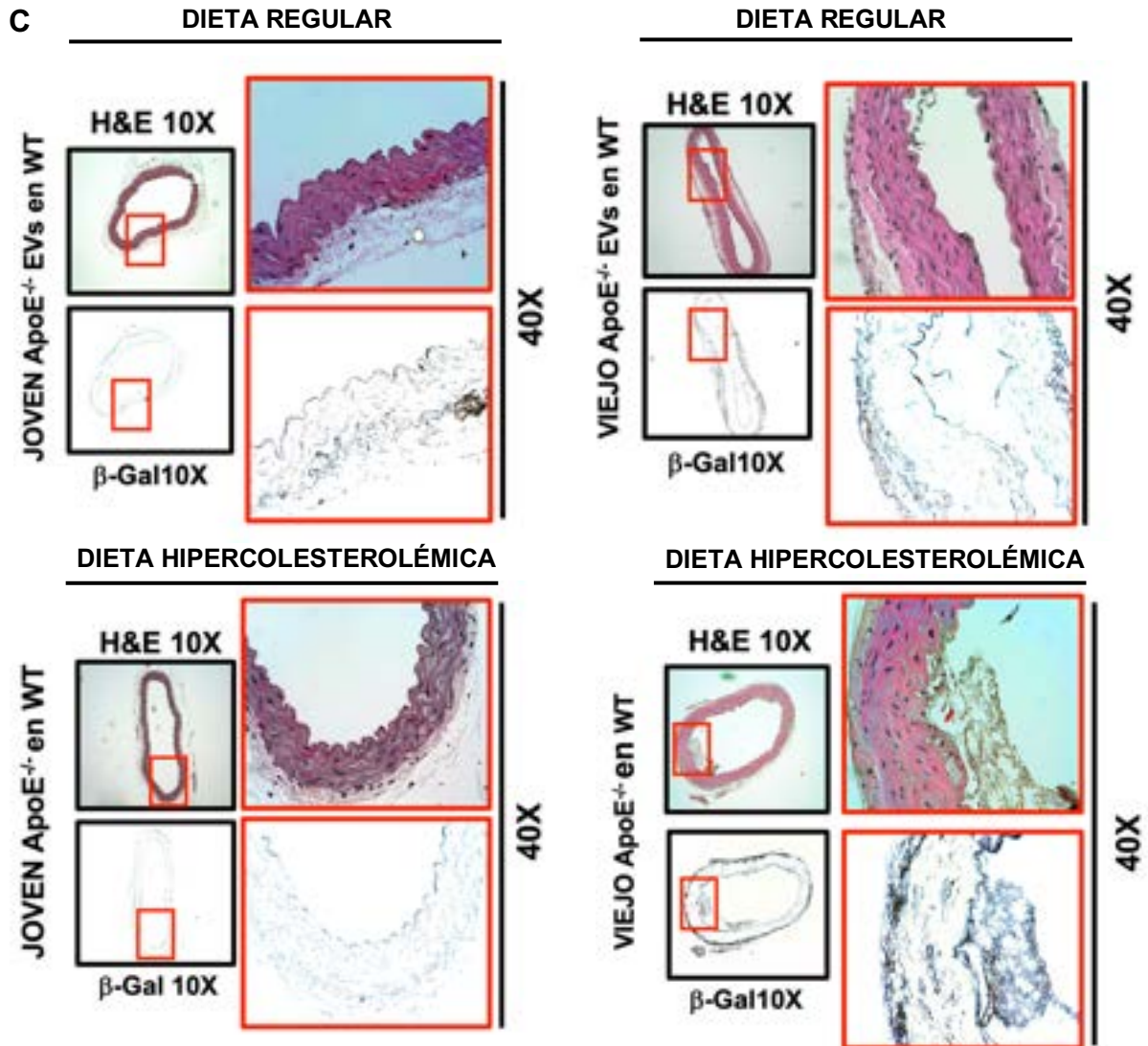


Figura 17. EVs de ratones ateroscleróticos ApoE^{-/-} promueven la SE y la formación de placa de ateroma en ratones WT.

A) Expresión de CAP1 mediante inmunoblot en EVs de ratones ApoE^{-/-} jóvenes y añosos (N=3 Media \pm DE. * $p < 0.05$).

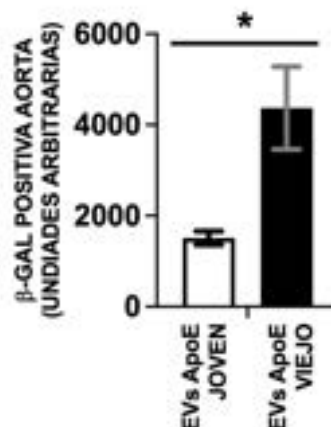
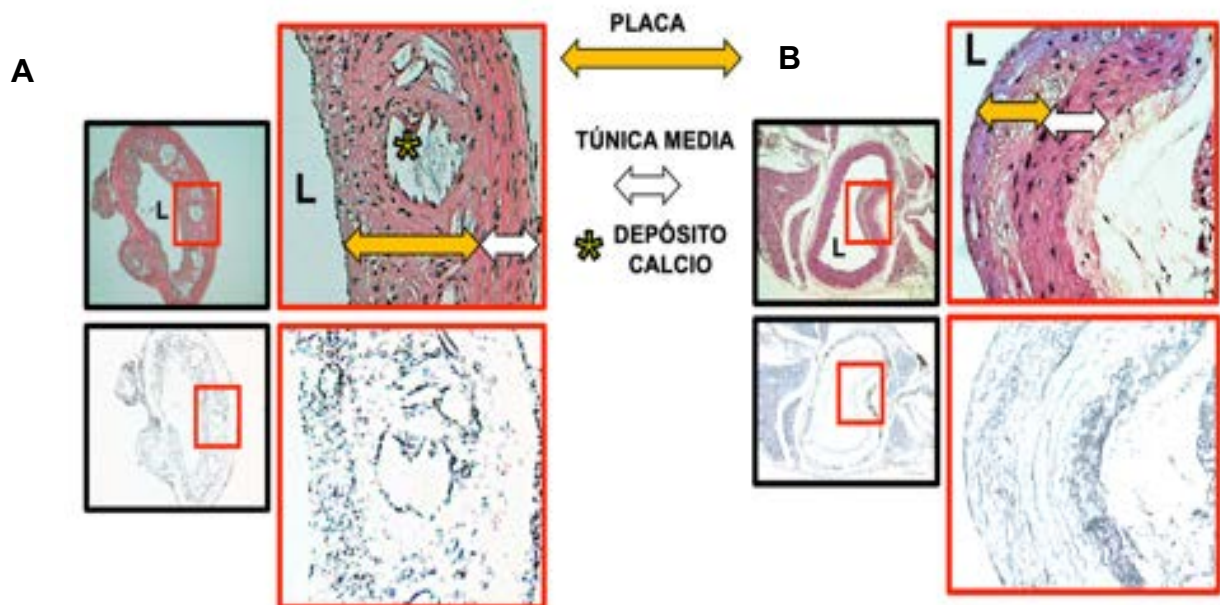
B) Esquema del diseño experimental del tratamiento de VEs en ratones WT.

Resultados

C) Ensayo de β -Galactosidasa y H/E en aorta de ratones WT tratadas con EVs de ratones ateroscleróticos ApoE^{-/-} (N=3 Media \pm DE. *p<0.05).

7. Las EVs de ratones ateroscleróticos promueven la formación de depósitos de calcio en ratones ApoE^{-/-}

Además de lo mostrado previamente, y a la luz del nuevo fenotipo generado en los ratones WT tras la inyección de EVs que contienen CAP1 (provenientes de ratones añosos ApoE^{-/-}), nos preguntamos si este efecto podría ser aún más relevante en ratones jóvenes ApoE^{-/-} sometidos a la inyección con estas mismas EVs. Confirmamos que después de la inyección, los ratones jóvenes ApoE^{-/-} presentaban placas ateromatosas que se asemejaban más al fenotipo de los ratones ApoE^{-/-} añosos alimentados con una dieta alta en grasas, en los cuales el grosor de la placa calcificada estrechaba significativamente el lumen arterial (**Figura 18A,B**). Por el contrario, al administrar EVs derivados de ratones jóvenes ApoE^{-/-} jóvenes en animales jóvenes, observamos una reducción en la senescencia endotelial y una formación de placa más pequeña. En conjunto, nuestros datos señalan a las EVs que contienen CAP1 como un nuevo objetivo molecular contra la ES y la aterosclerosis, al menos en ratones.



Resultados

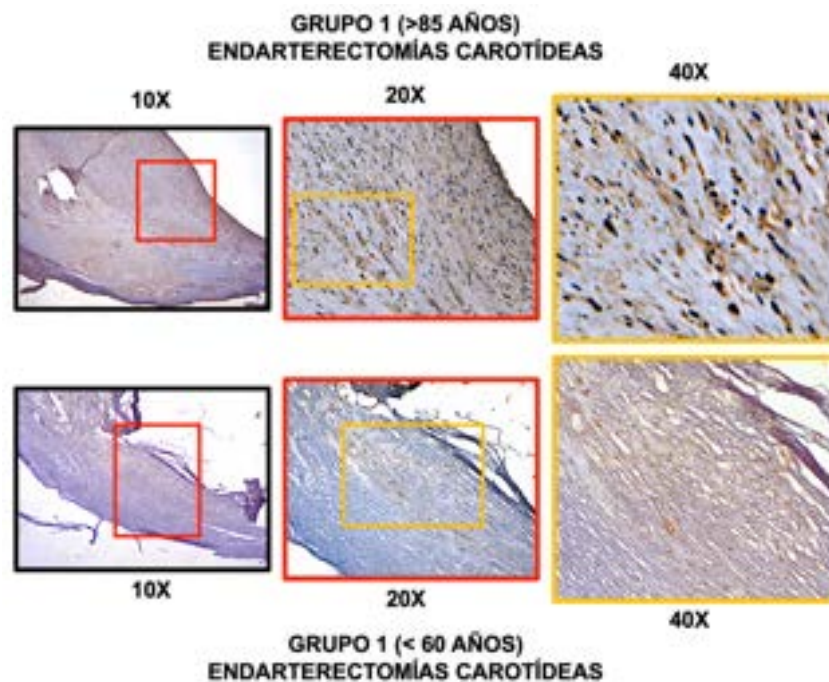
Figura 18. EVs de ratones ateroscleróticos ApoE^{-/-} promueven los depósitos de calcio en la placa de ateroma en ratones ApoE^{-/-}.

A) Ensayo de β -Galactosidasa y H/E en aorta de ratones ApoE^{-/-} tratadas con EVs de ratones ateroscleróticos jóvenes ApoE^{-/-} (N=3 Media \pm DE. *p<0.05).

B) Ensayo de β -Galactosidasa y H/E en aorta de ratones ApoE^{-/-} tratadas con EVs de ratones ateroscleróticos añosos ApoE^{-/-} (N=3 Media \pm DE. *p<0.05).

8. CAP1 está diferencialmente expresada en endarterectomías carotídeas humanas de pacientes jóvenes vs ancianos.

Nuestros datos señalan por primera vez a CAP1 como una nueva diana terapéutica frente a la SE en un modelo de aterosclerosis murina. Para probar si CAP1 se relaciona con el envejecimiento en humanos, llevamos a cabo un pequeño estudio piloto analizando los niveles de CAP1 mediante tinción inmunohistoquímica en secciones microscópicas provenientes de endarterectomías carotídeas, en el cual los pacientes fueron segregados en dos grupos en función de su edad: grupo 1, pacientes mayores de 80 años, y grupo 2, pacientes menores de 60 años. Aunque se debe tener especial precaución dado lo reducido del tamaño muestral (3 muestras/grupo), pudimos encontrar un nivel claramente distinto de CAP1 entre los grupos, en el cual los pacientes mayores mostraron niveles incrementados de CAP1, lo que sugiere que CAP1 también es un nuevo objetivo humano asociado al envejecimiento de la enfermedad (**Figura 20**). No obstante, y dado lo reducido del estudio, los datos obtenidos hemos de tomarlos con la debida precaución, aunque claramente abren la puerta a realizar estudios adecuados encaminados a corroborar la hipótesis de que CAP1 pudiera ser utilizado como marcador predictivo del desarrollo de aterosclerosis. *vivo*.



Resultados

Figura 20. Expresión de CAP1 en la aterosclerosis carotídea humana.

Inmunohistoquímica en secciones de endarterectomía carotídea humana para detectar CAP1 en el grupo 1 (pacientes mayores de 80 años, paneles superiores) y grupo 2 (pacientes menores de 60 años, paneles inferiores). N=3 pacientes/grupo.

BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS.

Resumen

1. La edad cronológica de ratones ApoE^{-/-} determina el desarrollo de la aterosclerosis.
2. La expresión de CAP1 tiene relación directa con la Senescencia Endotelial
3. CAP1 promueve específicamente la Senescencia Endotelial en líneas celulares endoteliales de aorta y coronaria humana.
4. Vesículas Extracelulares aisladas de ratones añosos ApoE^{-/-}, aquellas que contienen CAP1, promueven el desarrollo de la formación de placa de ateroma en ratones *Wild Type*
5. Vesículas Extracelulares aisladas de ratones añosos ApoE^{-/-}, aquellas que contienen CAP1, promueven la formación de depósitos de calcio en ratones ApoE^{-/-}.
6. CAP1 determinada en endarterectomías carotídeas tiene relación directa con la edad cronológica de las personas.

Resultados

Discusión

DISCUSIÓN

Discusión

Discusión

En la presente tesis doctoral, hemos comprobado la tremenda relevancia de la respuesta inflamatoria durante el desarrollo y la progresión de enfermedades cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio y la aterosclerosis y en este contexto, la CyPA se destaca como una diana molecular inflamatoria clave en el proceso. Utilizando un fármaco bradicardizante como la Ivabradina, y sabiendo que en base a nuestra experiencia previa, su efecto cardioprotector va más allá de su acción sobre la corriente marcapasos, tuvimos la oportunidad de desvelar su acción directa precisamente sobre la secreción de CyPA, y además, prevenir su unión con su receptor natural EMMPRIN evitando de esta forma la necrosis miocárdica a través, al menos, de complicaciones cardiovasculares, la mostramos en el contexto de otra patología cardiovascular asociada a la edad como es la aterosclerosis. La disfunción endotelial es origen inequívoco para el disparo inflamatorio, origen del proceso aterogénico. Hemos confirmado, su correlación con el proceso senescente, en donde la interacción CyPA/EMMPRIN en HAEC y CAEC vuelve a estar manifiestamente activo. Finalmente, utilizando un modelo de aterosclerosis murino, como parte de la respuesta senescente, hemos explorado a nivel molecular nuevas posibles dianas terapéuticas relacionadas con el disparo del proceso inflamatorio en esta patología, estudiando el contenido de las EVs secretadas por animales jóvenes y añosos. Entre muchas de sus características, dentro de la firma proteómica de estas vesículas, hemos caracterizado la presencia de CAP1, de la que muy recientemente, sabemos acerca de su especial contribución en el desarrollo de la aterosclerosis por su interacción con PCSK9 en el reciclado de LDLr. Todos nuestros datos apuntan inequívocamente hacia CAP1 como nuevo marcador molecular en esta patología y, por tanto, la consideramos como una nueva diana terapéutica para la prevención de este evento cardiovascular.

BLOQUE I y II. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y SÍNDROME CORONARIO

En el presente bloque, mostramos un mecanismo subyacente para prevenir la respuesta inflamatoria desencadenada por la isquemia cardíaca en respuesta a la Ivabradina. La Ivabradina previene la secreción de CyPA e incrementa su secreción por lisosomas, evitando así su unión a su receptor natural EMMPRIN, como mecanismo cardioprotector para evitar la degradación de la matriz extracelular.

CyPA es una proteína intracelular que se expresa en condiciones inflamatorias por varios tipos de células; algunas de ellas han demostrado secretar CyPA durante las etapas iniciales de patologías que incluyen la aterosclerosis, enfermedad coronaria e

Discusión

infarto agudo de miocardio. Durante la aterosclerosis, CyPA media la activación de macrófagos inducida por LDLox, y recientemente se ha demostrado que la inhibición de la degradación de CyPA también es prevenida por LDLox, mediante un mecanismo que inicia la formación aterosclerótica temprana (Tian-Tian et al., 2013). Además de los macrófagos, las plaquetas también se unen a CyPA en pacientes con enfermedad coronaria significativa y se correlacionan con hipercolesterolemia e hipertensión (Rath et al., 2020; Xue et al., 2017). Precisamente nosotros describimos dos nuevos hallazgos con una posible implicación clínica: la Ivabradina previene la secreción de CyPA, y además es claro su papel durante su degradación lisosomal, demostrando que la Ivabradina, a diferencia de lo que sucede con el músculo liso vascular, en donde VAMP1 es una proteína clave para la secreción de CyPA (Satoh et al., 2014; Li & Yang., 2022), en este caso disminuye la secreción de CyPA mediante una menor compartimentalización en vesículas marcadas con VAMP1, lo que pone a un fármaco como la Ivabradina como una nueva herramienta para el tratamiento de enfermedades en las que la respuesta inflamatoria pudiera estar jugando un papel clave en su origen.

En los últimos años, se ha investigado el papel que juega directamente CyPA en la enfermedad coronaria. Como se reportó recientemente, CyPA plasmática es un biomarcador de CAD, mostrando que una disminución progresiva de sus niveles en sangre tiene carácter predictivo en una mejora ventricular en pacientes con SCACEST (Ohtsuki et al., 2017). Después de la reperfusión coronaria, la superoxigenación desencadena una respuesta inflamatoria que conduce a una producción excesiva ROS, siendo el remodelado cardiaco, la respuesta subyacente que contribuye al fenómeno hipertrófico que avocando al paciente a un proceso de insuficiencia cardiaca. Niveles excesivos de ROS estimulan la secreción de CyPA que al final contribuye a su vez a perpetuar el proceso aumentando aún más el estrés oxidativo por mecanismos aún por explorar (Suzuki et al., 2006; Satoh et al., 2017). Sin embargo, y aunque los quimiocinas son los componentes clave en el tráfico celular inflamatorio, datos recientes muestran que CyPA también es un quimioattractor para los leucocitos (Dawar et al., 2017). En virtud de los datos obtenidos, no podemos excluir el disparo de CyPA como consecuencia de la activación de un proceso senescente, en donde hemos comprobado que el endotelio senescente y disfuncional expresa elevados niveles de CyPA.

La CyPA intracelular puede desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares al actuar como una chaperona y jugar un papel en el plegamiento, tráfico y función de proteínas (Nigro et al., 2013). Sin embargo, hallazgos recientes muestran que una de las posibles funciones de CyPA es actuar como un factor

Discusión

intramitocondrial, mejorando las señales antiapoptóticas y sugiriendo así un papel en la supervivencia celular (Daneri-Becerra et al., 2021;). De hecho, se ha demostrado que CyPA inhibe el estrés oxidativo y la apoptosis mediante la modulación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en células cancerosas (Ma et al., 2021). Nosotros encontramos que, en respuesta a la Ivabradina, la CyPA se acumula en el área necrótica de los cerdos sometidos a IR en comparación con el grupo Placebo, lo que hemos demostrado por primera vez como uno de los posibles mecanismos moleculares cardioprotectores de este fármaco frente al IAM.

En el sistema cardiovascular, y como mencionamos anteriormente, una disminución progresiva en CyPA plasmática puede prever un mejor rendimiento ventricular en pacientes con IAM (Huang et al., 2015). En el presente trabajo, encontramos que la Ivabradina, en lugar de inducir la transcripción de CyPA, contribuye claramente con la inhibición de su secreción extracelular en los corazones infartados, en contra de lo que sucede en pacientes con enfermedad isquémica cardíaca, en donde la secreción de CyPA es muy significativa (Bayon et al., 2020), motivo por el cual, gracias a nuestro trabajo hemos podido desvelar una nueva funcionalidad de la Ivabradina y su posible uso terapéutico en este grupo de pacientes, para los que la Ivabradina no es un fármaco de referencia.

EMMPRIN es una glicoproteína que se expresa de forma significativa en respuesta al IAM. Se sabe que las formas altamente glicosiladas de esta proteína (HG-EMMPRIN) inducen la activación de varias MMPs, incluyendo las MMP-9 y MMP-13. Además, EMMPRIN ha sido identificado como un importante receptor de CyPA en la inflamación (Seizer et al., 2014). Nosotros y otros encontramos que la inhibición de EMMPRIN mediante diferentes estrategias promueve la protección cardíaca en humanos y en animales sometidos a isquemia/reperfusión coronaria, incluyendo estrategias como la incubación con anticuerpos específicos anti-EMMPRIN (Tarin et al., 2011) y nanopartículas magnéticas dirigidas contra EMMPRIN en modelos de ratón y cerdo de IR (Ramirez-Carracedo et al., 2018; Cuadrado et al., 2016). El complejo CyPA/EMMPRIN lidera el daño miocárdico al contribuir al reclutamiento de leucocitos y también al inducir la degradación de la matriz extracelular mediante la activación de EMMPRIN (Seizer et al., 2016). Recientemente, encontramos que la Ivabradina induce protección cardíaca al inhibir la activación de MMPs mediada por EMMPRIN, pero el papel específico del complejo CyPA/EMMPRIN no se ha investigado previamente. Recientemente, SP-8365, un nuevo inhibidor farmacológico del complejo CyPA/EMMPRIN, se encontró como un tratamiento efectivo para la aterosclerosis al

Discusión

reducir la progresión y estabilizar la placa en ratones ApoE^{-/-} (Pahk et al., 2020). Nosotros encontramos que, en lugar de interrumpir el complejo, la Ivabradina contribuye con el incremento del complejo entre CyPA y LG-EMMPRIN, la forma bajamente glicosilada de EMMPRIN, la cual es incapaz de ejercer efecto alguno sobre la degradación de la matriz extracelular (Hernandez et al., 2021; Tesoro et al., 2021).

En conclusión, en el presente bloque de esta tesis doctoral proponemos el uso de la Ivabradina como un mecanismo para prevenir la señalización inflamatoria desencadenada en respuesta al infarto agudo de miocardio mediante la inhibición de la secreción y unión de CyPA a su receptor EMMPRIN, como una forma de evitar la degradación de la matriz extracelular y la necrosis. Más allá de su uso en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda y crónica, la Ivabradina puede ser efectiva en otras enfermedades cardiovasculares de origen inflamatorio. Además, el uso de Ivabradina en enfermedades no cardiovasculares inflamatorias también podría representar una nueva área de investigación para el tratamiento de otras patologías inflamatorias.

BLOQUE III. INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS.

Desde la década de 1980, la investigación en el campo cardiovascular se ha centrado en la búsquedas de nuevas dianas que permitan establecer las bases inflamatorias asociadas al envejecimiento (North & Sinclair., 2012). Como hemos mencionado a lo largo del trabajo, la relación entre envejecimiento y senescencia endotelial ha sido ampliamente estudiado en esta tesis doctoral, en donde la disfunción es clave para el origen de procesos inflamatorios asociados a las patologías cardiovasculares. A este respecto, el NO es clave para prevenir precisamente la disfunción del endotelio, desempeñando múltiples roles en el sistema cardiovascular, incluyendo algunos como la regulación de la presión arterial (Moncada et al., 1989; Zaragoza et al., 2002), la inhibición de la adhesión de leucocitos y agregación plaquetaria (Saura et al., 2002), y el mantenimiento del tono vascular (Saura et al., 2012; Saura et al., 2017; Saura et al., 2022). En los últimos años, se ha podido comprender en detalle los mecanismos exactos mediante los cuales el enzima que lo produce, la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial, eNOS, contribuye a mantener una correcta vasodilatación en el endotelio. Sin embargo, el papel preciso que desempeña el NO en conjunto junto con sus cofactores durante el envejecimiento aún no está del todo claro y esta cuestión es el foco central de este apartado en la presente Tesis Doctoral.

Discusión

Nuestro estudio en el presente bloque tuvo como propósito investigar la correlación entre la expresión de la eNOS y el proceso inflamatoria asociado a la senescencia celular. Si bien se ha demostrado en estudios previos que la ausencia de eNOS posee un papel fundamental en el inicio de la disfunción endotelial (Saura et al., 2002; Saura et al., 2005; Zaragoza et al., 2006), nuestro análisis destaca por establecer una correlación directa entre la actividad senescente medida por la enzima β -galactosidasa y la expresión de eNOS, proponiendo que los cambios en el equilibrio redox endotelial son factores limitantes para la transición entre la salud y la enfermedad. De hecho, otros investigadores han hallado una relación entre GSSG/GSH como mecanismo que regula el envejecimiento biológico, y la adhesión monocitaria asociada a la enfermedad (Erdenal et al., 2002). En nuestro trabajo mostramos dos de los cofactores más estudiados en nuestro grupo de investigación, ILK y Hsp90 (Reventun et al., 2023; Herranz et al., 2012), mostrando la misma correlación: disminuyendo su presencia en células senescentes, además de perder su interacción con eNOS, lo que se traduce en el desacoplamiento del enzima y, como consecuencia, en la pérdida de su funcionalidad primaria, a favor del incremento de estrés oxidativo.

Ante la cuestión de la pérdida de la capacidad para producir NO, e independientemente del descenso de los niveles de eNOS detectado en las HAEC y CAEC senescentes, este fenómeno puede tener también lugar por una alteración de los niveles del cofactor clave para la funcionalidad de eNOS: la tetrahidrobiopterina, BH4. Numerosos estudios han destacado la estrecha relación entre la disminución en la disponibilidad de BH4 y la disfunción endotelial (Alp & Channon, 2004), en donde, además, se ha demostrado que la suplementación con BH4 tiene la capacidad de revertir situaciones relacionadas con patologías inflamatorias como la aterosclerosis (Alp et al.; 2004). Por este motivo, cualquier factor que pudiera incidir sobre los niveles de BH4, podrían estar creando un fenotipo senescente, al evitar la producción de NO. Esta hipótesis fue corroborada al comprobar el incremento oxidativo de BH4 hacia BH2 y lo mas importante, los enzimas implicados en el retorno hacia la forma reducida, la GTP ciclohidrolasa, así como la enzima implicada en la síntesis de novo de BH4, la hidrofolato reductasa (Xie et al., 2010; Whitsett et al., 2013), se encontraron significativamente reducidas a medida que se incrementó el fenotipo senescente. Por lo tanto, postulamos que la relación BH4/BH2 podría ser utilizado como nuevo marcador predictivo de SE y la disfunción endotelial, con la consecuencia que tiene como factores predictivos de enfermedad cardiovascular.

Uno de los principales efectos adversos del desacoplamiento de la eNOS es la síntesis de ROS. Es bien sabido que el estrés oxidativo es clave en la disfunción endotelial,

Discusión

especialmente en las fases iniciales de la formación de placas de ateroma (Incalza et al., 2018). Nuestros resultados revelan que este fenómeno no se debe únicamente al desacoplamiento de la eNOS, sino que también está vinculado a la senescencia celular en los territorios del endotelio aórtico y coronario. Dentro de los subproductos derivados durante el estrés oxidativo, hemos observado un aumento significativo en la producción de dos de ellos: el anión superóxido (Schiffrin., 2008) y el radical libre del nitrógeno peroxinitrito (Gürsoy et al., 2000). Este hallazgo es especialmente relevante ya que, hasta ahora, no se había evaluado esta relación ni en el endotelio de aorta ni en el coronario durante la SE. Además, el aumento de un entorno oxidativo va a activar procesos inflamatorios dentro del endotelio, resultando en muchas ocasiones en una inflamación crónica. A pesar de que existen numerosos marcadores bien establecidos, como la Proteína C reactiva (Devaraj et al., 2011) y marcadores de coagulación claves (Pablo-Moreno et al., 2022), hemos decidido caracterizar dos moléculas inflamatorias particulares que son de gran relevancia en nuestro grupo de investigación: EMMPRIN y la CyPA.

EMMPRIN, es reconocida como el principal inductor de metaloproteinasas en el contexto vascular, y como hemos demostrado en el anterior bloque, crucial en el remodelado adverso tras el IAM. Además, trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que EMMPRIN puede ser una diana terapéutica, utilizando fármacos como la Ivabradina para reducir su actividad o realizando un abordaje basado en nanotecnología para bloquear su función (Tesoro et al., 2021; Cuadrado et al., 2016; Ramirez-Carracedo et al., 2018), gracias al cual se ha podido patentar el uso de una nanopartícula NAP9, cuya finalidad es inhibir el disparo de la respuesta inflamatoria asociada a la degradación de la matriz extracelular (COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF CARDIAC DAMAGES AFTER CORONARY ISCHEMIA/REPREFUSION. EUROPEAN PATENT No. EP2668960. UNITED STATES PATENT N° 14/110,805), pendientes en este momento de comenzar el primer ensayo clínico para su validación en pacientes con SCACEST.

En la presente Tesis Doctoral hemos analizado los niveles de EMMPRIN durante la progresión de la SE, detectando claramente, un crecimiento gradual de su forma activa altamente glicosilada (HG-EMMPRIN), al igual que para la CyPA, su ligando natural, todo ello indicativo del comienzo de un proceso inflamatorio. En diversos trabajos, incluyendo los nuestros, se ha destacado la importancia de la unión de CyPA a su receptor para desencadenar una cascada de señalización inflamatoria (Hernandez et al., 2021 Ramirez-Carracedo et al., 2022; Tesoro et al., 2021). Es cierto que diversos

Discusión

estudios, incluyendo los nuestros, han reportado la implicación de ciertas MMPs en la disfunción endotelial, especialmente en contextos patológicos como la isquemia coronaria o la propia ruptura de placas ateroscleróticas (Lopez-Rivera et al., 2005; Tarin et al., 2009). Sin embargo, es importante destacar que, hasta la fecha, no se ha proporcionado una comprensión detallada sobre cómo estas MMPs actúan y cómo varían su expresión en el contexto de la senescencia endotelial, proponiendo a la CyPA unida a EMMPRIN como mecanismo disparador de la respuesta inflamatoria.

BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS

En este último bloque, hemos estudiado el fenotipo secretor senescente de las células endoteliales estudiando las vesículas extracelulares (EVs). Estas estructuras son pequeñas nanopartículas bilipídicas liberadas por casi todos los tipos celulares y secretadas a diversos fluidos, incluyendo plasma, suero, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, entre otros (Zhang et al., 2022; Lananna & Imai., 2021). Las EVs son secretadas en respuesta a muchas condiciones patológicas, conteniendo distintos componentes de diversa naturaleza, que pueden desempeñar un papel importante en la progresión de enfermedades relacionada con el envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer (Eren et al., 2020), la enfermedad renal crónica (Karpman et al., 2017) y patologías cardiovasculares como la aterosclerosis (Minamino et al., 2002; Garcia-Contreras & Thakor., 2023; Badimon et al., 2022). De hecho, las EVs de tejidos envejecidos o lesionados pueden guiar señales de senescencia celular, como nosotros hemos visto en la presente Tesis doctoral en los ratones ateroscleróticos ApoE^{-/-}.

Las EVs contienen como parte de su contenido desde ácidos nucleicos, metabolitos, hasta proteínas, que pueden ayudar a comprender la progresión de varias enfermedades (Kowal et al., 2016; Kumar et al., 2024). Los enfoques multiómicos han permitido caracterizar con mayor precisión la carga específica de estas vesículas, pudiendo destacar cómo en aterosclerosis las proteínas de adhesión tanto ICAM-1 como PECAM-1, son indispensables para la adhesión de las mismas al endotelio vascular, lo que se traduce en un mayor reclutamiento de monocitos y neutrófilos, causando de esta forma una respuesta inflamatoria a través de la activación del factor de transcripción inflamatorio NF- κ B en células endoteliales (Rautou et al., 2023; Kuravi et al., 2019). Nosotros hemos detectado un incremento de estrés oxidativo y nitrosativo

Discusión

extenso en células endoteliales senescentes, y la activación de la respuesta inflamatoria CyPA/EMMPRIN.

Nuestro análisis proteómico reveló una serie de proteínas expresadas diferencialmente en las vesículas liberadas por ratones ApoE^{-/-} más añosos. Estas proteínas tienen implicación en procesos biológicos clave como la senescencia y el metabolismo de lípidos. De entre todas las proteínas valoradas, nosotros hemos identificado la proteína CAP1 como un nuevo candidato vinculado a la enfermedad aterosclerótica en relación con la SE. CAP1 es una proteína involucrada en el ensamblaje de actina del citoesqueleto celular presenten en muchos tipos celulares (Heinze & Rust., 2023), Recientemente, en diversas patologías, con especial relevancia en las de carácter metabólico y oncológico, la desregulación de CAP1 ha llamado la atención sobre la progresión de la enfermedad (Bergqvist et al., 2020; Jin et al., 2023). En el caso de las enfermedades cardiovasculares, varios trabajos apuntan a CAP1 en el desarrollo de placas de ateroma (Gaillard et al 2020), aunque no fue hasta 2020 cuando se propuso por primera vez un mecanismo molecular a través de la formación de un complejo con PCSK9, necesario para prevenir el reciclaje de LDLr, postulando la especial relevancia de CAP1 acompañado con PCSK9 para que ésta ejerza su función sobre la degradación de LDLr, lo que hace de CAP1 una nueva diana con finalidad terapéutica, ya que su inhibición impediría a PCSK9 ejercer su función, favoreciendo de esta manera el reciclado de LDLr y por tanto reduciendo significativamente los niveles de LDLc (Gaillard et al., 2020; Lagace et al., 2014). Nosotros aportamos una nueva funcionalidad de CAP1, como claro efector de SE, siendo además importante el descubrimiento de que es totalmente independiente de PCSK9, lo que hace de esta proteína un posible nuevo marcador de predictivo aislado de senescencia asociado al desarrollo de aterosclerosis.

Nuestro estudio representa un nuevo descubrimiento, ya que es el primero en reportar de la presencia de CAP1 en vesículas derivadas de ratones ateroscleróticos envejecidos. También aclara un papel directo de CAP1 en la progresión de la SE, evidenciado por la inducción del envejecimiento en células endoteliales aórticas humanas y células endoteliales coronarias a través de EVs que contienen CAP1. De acuerdo con esta observación, vale la pena señalar que PCSK9 se expresa en células endoteliales vasculares y, al igual que con CAP1, los niveles de PCSK9 también muestran un aumento en HAEC envejecidos. No obstante, la inhibición farmacológica de PCSK9 no reportó ningún efecto sobre la SE inducida por CAP1. Caba aclarar, sin embargo, si CAP1 es el único responsable o se acompleja con otras proteínas aun por descubrir. En este contexto, es digno de mención que CAP1 sirve como receptor para

Discusión

la proteína resistina humana, participando en la inflamación mediada por monocitos (Munjas et al., 2017; Zhou et al., 2021). Esta interacción tiene implicaciones en condiciones como la enfermedad arterial coronaria y la aterosclerosis. Además, investigaciones recientes han vinculado la secreción de resistina por macrófagos alveolares con la disfunción endotelial (Jung et al., 2006).

Nuestro trabajo aporta luz a un problema tan complejo como el de la SE, reconociendo que CAP1 puede representar solo uno de los numerosos objetivos aún por descubrir. En este sentido, como indicamos en el análisis proteómico, pudimos identificar nuevos candidatos potenciales como componentes de carga presentes en los EVs de ratones ApoE^{-/-} añosos, presentes en el envejecimiento, el ensamblaje de actina, la señalización de integrinas, la adhesión celular a la matriz, el metabolismo lipoproteico, la agregación plaquetaria, la actividad del proteasoma y la coagulación sanguínea. En consecuencia, esta Tesis Doctoral abre una gran oportunidad de profundizar sobre el descubrimiento de nuevos objetivos potenciales con implicaciones significativas para patologías, en las que el envejecimiento asociado a su origen es fundamental.

Discusión

Conclusiones

CONCLUSIONES

Conclusiones

BLOQUE I y II. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y EL SÍNDROME CORONARIO.

1. La Ivabradina aumenta la expresión de CyPA en el área necrótica de los corazones de cerdos sometidos a IR, ligando natural del enzima degradativo de la matriz extracelular, EMMPRIN, aunque disminuye sus niveles plasmáticos tras la reperfusión.
2. Los extractos proteicos de corazones de los animales de experimentación revelan que tras la administración de Ivabradina se promueve la formación del complejo entre CyPA y las formas inactivas de EMMPRIN, bajamente glicosiladas (LG-EMMPRIN), reduciendo así su interacción con las formas activas de EMMPRIN, altamente glicosiladas (HG-EMMPRIN).
3. Como consecuencia del tratamiento con Ivabradina, se produce un descenso significativo de los niveles del enzima degradativo de la matriz, la metaloproteasa de matriz extracelular MMP-9, uno de los principales marcadores de necrosis miocárdica tras la reperfusión, acorde con la inhibición del complejo CyPA/HG-EMMPRIN en los corazones de los animales infartados.
4. Al igual que sucede en los animales infartados, en condiciones de hipoxia, la Ivabradina disminuye la secreción de CyPA en células cardíacas.
5. El efecto de la Ivabradina sobre la degradación lisosomal de CyPA requiere una investigación con mayor profundidad, ya que la presencia de Ivabradina incrementa la acumulación de vesículas lisosomales tempranas cargadas con CyPA, aunque no hayamos detectado una contribución significativa sobre su degradación proteolítica.

BLOQUE III. BASES GENERALES DE LA INFLAMACIÓN Y EL SÍNDROME CORONARIO.

1. En un modelo replicativo de senescencia de células endoteliales humanas de arteria aortica, HAEC, y arteria coronaria, CAEC, podemos correlacionar el fenómeno de la Senescencia Endotelial con el de la Disfunción Endotelial, al perder progresivamente la capacidad de producir NO y aumentar la generación de anión superóxido en el proceso.
2. En el modelo replicativo de Senescencia Endotelial, detectamos un incremento significativo y paulatino en la relación BH2/BH4, que contribuye a la incapacidad del

Conclusiones

enzima Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) para producir NO, al no disponer de su cofactor tetrahidrobiopterina, BH4.

3. En el modelo replicativo de Senescencia Endotelial, detectamos la inhibición significativa y paulatina del enzima Dihidrofolato Reductasa (DHFR), responsable de la reducción enzimática de dihidrobiopterina (BH2) en tetrahidrobiopterina (BH4), contribuyendo así con la reducción de los niveles de BH4, y por tanto, a la incapacidad de eNOS para producir NO.

4. En el modelo replicativo de Senescencia Endotelial, detectamos la inhibición significativa y paulatina del enzima GTP-Ciclohidrolasa, encargada de la síntesis “*de novo*” de BH4 y por tanto, a la incapacidad de eNOS para producir NO.

5. En el modelo replicativo de Senescencia Endotelial, dada la reducción significativa en los niveles de BH4, detectamos el desacoplamiento significativo y paulatino de la eNOS respecto las proteínas “proteína de choque térmico Hsp90” y la “proteína quinasa ligada a integrinas ILK”, lo que promueve la incapacidad de eNOS para producir NO, en contraposición para generar anión superóxido, contribuyendo así a la generación de estrés oxidativo.

6. En el modelo replicativo de Senescencia Endotelial, se genera un incremento significativo y paulatino de estrés oxidativo, a través tanto del desacoplamiento de eNOS, como del incremento de los niveles de NADPH-oxidasa, lo que además contribuye a la generación de un estrés nitrosativo a través de la formación del radical citotóxico peroxinitrito junto con la subyacente nitración de los residuos de Tirosina de las proteínas.

7. En el modelo replicativo de Senescencia Endotelial, y gracias al menos al estrés oxidativo generado, se produce un incremento significativo y paulatino de un entorno proinflamatorio, al detectar el incremento significativo de los niveles del factor proinflamatorio endotelial CyPA, su receptor degradativo de la matriz extracelular y activador de Metaloproteinasas EMMPRIN, junto con los niveles de las metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13, principales enzimas degradativas de la matriz en el contexto inflamatorio de diversas patologías con un origen inflamatorio como la aterosclerosis.

8. Proponemos la evaluación temprana de los niveles circulantes de BH4 y su relación con BH2, como marcador temprano a nivel subclínico de senescencia endotelial,

Conclusiones

predictor de disfunción endotelial, paso inicial de patologías inflamatorias como la aterosclerosis.

BLOQUE IV. NUEVAS DIANAS MOLECULARES ASOCIADAS A LA SENESCENCIA ENDOTELIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS.

1. La edad cronológica es un de los factores clave para el desarrollo de aterosclerosis, tal y como hemos podido constatar en un modelo de aterosclerosis murino en ratones jóvenes y añosos deficientes para el gen ApoE y sometidos a dieta hipercolesterolémica en el mismo momento temporal.
2. Durante el desarrollo de aterosclerosis se produce la liberación de Vesículas Extracelulares, cuya firma proteómica se correlaciona con la edad cronológica.
3. El análisis proteómico de las Vesículas Extracelulares indica la presencia de mas de 400 proteínas, implicadas en los fenómenos biológicos de envejecimiento, adhesión y señalización celular, metabolismo lipídico, agregación plaquetaria, y coagulación sanguínea.
4. Del total de proteínas presentes en las Vesículas Extracelulares, las procedentes de los ratones añosos ApoE^{-/-} presentan 22 diferencialmente expresadas, y especialmente podemos destacar la Proteína Asociada a la Ciclasa 1 (CAP1), recientemente asociada como componente fundamental para la acción de la proteína PCSK9 en la degradación del receptor de LDL, y por tanto clave en la generación de placa de ateroma.
5. El silenciamiento génico de la proteína CAP1 previene de manera específica la senescencia de las células endoteliales HAEC y CAEC, mientras que su sobreexpresión en las células silenciadas recupera el fenotipo senescente.
6. El efecto de CAP1 en la senescencia endotelial es independiente de PCSK9, ya que su inhibición farmacológica, no revierte el efecto de CAP1 sobre el proceso senescente, lo que refuerza la idea del uso de CAP1 como marcador independiente predictivo del proceso senescente endotelial, con las implicaciones que ello conlleva sobre la disfunción endotelial y posterior respuesta inflamatoria en patologías como la aterosclerosis.

Conclusiones

6. Las Vesículas Extracelulares aisladas de ratones añosos ApoE^{-/-} (que contienen CAP1), inyectadas en ratones de fenotipo salvaje y alimentados con una dieta hipercolesterolémica, inducen la formación de un fenotipo aterosclerótico, mientras que en ratones jóvenes ApoE^{-/-}, inducen la formación de un fenotipo aterosclerótico propio de animales añosos, incluyendo la generación de placas de ateroma con un grado extenso de calcificación.
7. En un estudio piloto con muestras de pacientes, los niveles de CAP1 en muestras de endarterectomías carótideas están directamente relacionados con la edad cronológica de los pacientes. No obstante, los resultados obtenidos han de ser validados en estudios ex profeso con el tamaño muestral y los criterios de inclusión-exclusión adecuados.
8. Proponemos a CAP1 como marcador clave de senescencia endotelial vs edad cronológica endotelial, para poder prevenir patologías cardiovasculares en las que esta proteína puede jugar un papel fundamental como es la aterosclerosis.

Bibliografia

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

Bibliografía

- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. In *Veterinary World* (Vol. 11, Issue 5, pp. 627–635). Veterinary World. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
- Akyildiz, A. C., Speelman, L., & Gijzen, F. J. H. (2014). Mechanical properties of human atherosclerotic intima tissue. *Journal of Biomechanics*, *47*(4), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.01.019>
- Alfaddagh, A., Martin, S. S., Leucker, T. M., Michos, E. D., Blaha, M. J., Lowenstein, C. J., Jones, S. R., & Toth, P. P. (2020). Inflammation and cardiovascular disease: From mechanisms to therapeutics. In *American Journal of Preventive Cardiology* (Vol. 4). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ajpc.2020.100130>
- Alp, N. J., & Channon, K. M. (2004). Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(3), 413–420. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000110785.96039.F6/FORMAT/EPUB>
- Alp, N. J., McAteer, M. A., Khoo, J., Choudhury, R. P., & Channon, K. M. (2004). Increased Endothelial Tetrahydrobiopterin Synthesis by Targeted Transgenic GTP-Cyclohydrolase I Overexpression Reduces Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis in ApoE-Knockout Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(3), 445–450. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000115637.48689.77>
- Antonov, A., Snead, C., Gorshkov, B., Antonova, G. N., Verin, A. D., & Catravas, J. D. (n.d.). *Heat Shock Protein 90 Inhibitors Protect and Restore Pulmonary Endothelial Barrier Function*. *1*(16). <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0324OC>
- Austermann, J., Roth, J., & Barczyk-Kahlert, K. (2022). The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. In *Cells* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11121979>
- Badimon, L., Padro, T., Arderiu, G., Vilahur, G., Borrell-Pages, M., & Suades, R. (2022). Extracellular vesicles in atherothrombosis: From biomarkers and precision medicine to therapeutic targets. In *Immunological Reviews* (Vol. 312, Issue 1, pp. 6–19). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/imr.13127>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Bayon, J., Alfonso, A., Gegunde, S., Alonso, E., Alvarino, R., Santas-Alvarez, M., Testa-Fernandez, A., Rios-Vazquez, R., Botana, L., & Gonzalez-Juanatey, C. (2020). Cyclophilins in Ischemic Heart Disease: Differences between Acute and Chronic Coronary Artery Disease Patients. *Cardiology Research*, *11*(5), 319–327. <https://doi.org/10.14740/cr1120>

Bibliografía

- Bebelmann, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2018.02.013>
- Benito, C., Gallego, F. J., Frade, J. M., Zaragoza, C., & Figueiras, A. M. (1990). Chromosomal location of adenylate kinase isozymes in Triticeae species. In *Theor Appl Genet*. Springer-Verlag.
- Berezin, A. E., & Berezin, A. A. (2020). Adverse Cardiac Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Old and New Biomarkers. *Disease Markers*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1215802>
- Bergqvist, M., Elebro, K., Elebro, K., Sandsveden, M., Borgquist, S., Borgquist, S., & Rosendahl, A. H. (2020). Effects of tumor-specific CAP1 expression and body constitution on clinical outcomes in patients with early breast cancer. *Breast Cancer Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01307-5>
- Bhattacharya, D., & Yusuf, N. (2012). Expression of Toll-Like Receptors on Breast Tumors: Taking a Toll on Tumor Microenvironment. *International Journal of Breast Cancer*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/716564>
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 168–175). <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000051384.43104.FC>
- Brown, P., Pratt, A. G., & Hyrich, K. L. (2024). Therapeutic advances in rheumatoid arthritis. In *BMJ*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-070856>
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 33, pp. 257–290). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Bucchi, A., Baruscotti, M., Nardini, M., Barbuti, A., Micheloni, S., Bolognesi, M., & DiFrancesco, D. (2013). Identification of the Molecular Site of Ivabradine Binding to HCN4 Channels. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053132>
- Campisi, J., & D'Adda Di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:9, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cao, M., Yuan, W., Peng, M., Mao, Z., Zhao, Q., Sun, X., & Yan, J. (2019). Role of CyPA in cardiac hypertrophy and remodeling. In *Bioscience Reports* (Vol. 39, Issue 12). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20193190>

Bibliografía

- Cavaillon, J. M. (2018). Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. In *Toxicon* (Vol. 149, pp. 45–53). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.016>
- Chen, J. yi, Ye, Z. xin, Wang, X. fen, Chang, J., Yang, M. wen, Zhong, H. hua, Hong, F. fang, & Yang, S. long. (2018). Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 97, 423–428. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.10.122>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Oncotarget 7204 www.impactjournals.com/oncotarget Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 6). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Chen, M. S., Lee, R. T., & Garbern, J. C. (2022). Senescence mechanisms and targets in the heart. In *Cardiovascular Research* (Vol. 118, Issue 5, pp. 1173–1187). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab161>
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11), 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(10), 718. <https://doi.org/10.1038/NRD.2017.116>
- Christopher Glass, A. K., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis: The Road Ahead Review. In *Cell* (Vol. 104). [https://doi.org/s0092-8674\(01\)00238-0](https://doi.org/s0092-8674(01)00238-0).
- Cohen, M., & Visveswaran, G. (2020). Defining and managing patients with non-ST-elevation myocardial infarction: Sorting through type 1 vs other types. In *Clinical Cardiology* (Vol. 43, Issue 3, pp. 242–250). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/clc.23308>
- Cohen, N. A., & Rubin, D. T. (2021). New targets in inflammatory bowel disease therapy: 2021. In *Current Opinion in Gastroenterology* (Vol. 37, Issue 4, pp. 357–363). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000740>
- Collet, J. P., Thiele, H., Barbato, E., Bauersachs, J., Dendale, P., Edvardsen, T., Gale, C. P., Jobs, A., Lambrinou, E., Mehilli, J., Merkely, B., Roffi, M., Sibbing, D., Kastrati, A., Mamas, M. A., Aboyans, V., Angiolillo, D. J., Bueno, H., Bugiardini, R., ... Siontis, G. C. M. (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. In *European Heart Journal* (Vol. 42, Issue 14, pp. 1289–1367). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>
- Crabtree, M. J., Hale, A. B., & Channon, K. M. (2011). Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin

Bibliografía

- deficiency. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(11), 1639–1646.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.010>
- Crabtree, M. J., Tatham, A. L., Hale, A. B., Alp, N. J., & Channon, K. M. (2009). Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: Relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), 28128–28136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041483>
- Cuadrado, I., Castejon, B., Martin, A. M., Saura, M., Reventun-Torralba, P., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2016). Nitric oxide induces cardiac protection by preventing extracellular matrix degradation through the complex caveolin-3/emmprin in cardiac myocytes. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162912>
- Cyr, A. R., Huckaby, L. v., Shiva, S. S., & Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. In *Critical Care Clinics* (Vol. 36, Issue 2, pp. 307–321). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>
- D’Oria, R., Schipani, R., Leonardini, A., Natalicchio, A., Perrini, S., Cignarelli, A., Laviola, L., & Giorgino, F. (2020). The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/5732956>
- Daneri-Becerra, C., Valeiras, B., Gallo, L. I., Lagadari, M., & Galigniana, M. D. (2021). Cyclophilin A is a mitochondrial factor that forms complexes with p23 - correlative evidence for an anti-apoptotic action. *Journal of Cell Science*, 134(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.253401>
- Das, D., Savarese, G., Dahlström, U., Fu, M., Howlett, J., Ezekowitz, J. A., & Lund, L. H. (2017). Ivabradine in heart failure: The representativeness of SHIFT (Systolic Heart Failure Treatment with the IF Inhibitor Ivabradine Trial) in a broad population of patients with chronic heart failure. *Circulation: Heart Failure*, 10(9). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004112>
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D’Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>
- Davies, D. M., van den Handel, K., Bharadwaj, S., & Lengefeld, J. (2022). Cellular enlargement - A new hallmark of aging? In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1036602>
- Dawar, F. U., Wu, J., Zhao, L., Khattak, M. N. K., Mei, J., & Lin, L. (2017). Updates in understanding the role of cyclophilin A in leukocyte chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(4), 823–826. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru1116-477r>

Bibliografía

- Devaraj, S., Kumaresan, P. R., & Jialal, I. (2011). C-reactive protein induces release of both endothelial microparticles and circulating endothelial cells in vitro and in vivo: Further evidence of endothelial dysfunction. *Clinical Chemistry*, *57*(12), 1757–1761. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.169839>
- Devon, H. A., Mirzaei, S., & Zègre-Hemsey, J. (2020). Typical and atypical symptoms of acute coronary syndrome: Time to retire the terms? *Journal of the American Heart Association*, *9*(7). <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.015539>
- Díaz de la Loza, M. del C., & Stramer, B. M. (2024). The extracellular matrix in tissue morphogenesis: No longer a backseat driver. *Cells and Development*, *177*. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2023.203883>
- Dichgans, M., Pulit, S. L., & Rosand, J. (2019). Stroke genetics: discovery, biology, and clinical applications. *The Lancet Neurology*, *18*(6), 587–599. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30043-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30043-2)
- Dixon, D. L., Trankle, C., Buckley, L., Parod, E., Carbone, S., van Tassell, B. W., & Abbate, A. (2016). A review of PCSK9 inhibition and its effects beyond LDL receptors. In *Journal of Clinical Lipidology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 1073–1080). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.07.004>
- Dron, J. S., & Hegele, R. A. (2020). A tip of the CAP1 to cholesterol metabolism. In *European Heart Journal* (Vol. 41, Issue 2, pp. 253–254). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz771>
- Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: Which NOX to target in vascular disease? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *25*(9), 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.012>
- Egido, J., Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., & Ortiz, A. (2011). Animal models of cardiovascular diseases. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/497841>
- Erden-nal, M., Sunal, E., & Kanbak, G. (2002). Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochemistry and Function*, *20*(1), 61–66. <https://doi.org/10.1002/cbf.937>
- Eren, E., Hunt, J. F. V., Shardell, M., Chawla, S., Tran, J., Gu, J., Vogt, N. M., Johnson, S. C., Bendlin, B. B., & Kapogiannis, D. (2020). Extracellular vesicle biomarkers of Alzheimer's disease associated with sub-clinical cognitive decline in late middle age. *Alzheimer's and Dementia*, *16*(9), 1293–1304. <https://doi.org/10.1002/alz.12130>
- ESC Cardiovascular Realities 2022. <https://www.escardio.org/Research/ESC-Atlas-of-cardiology>. (2022).

Bibliografía

- Feng, C. (2012). Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(3–4), 393–411. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.011>
- Fernández-Friera, L., Fuster, V., López-Melgar, B., Oliva, B., Sánchez-González, J., Macías, A., Pérez-Asenjo, B., Zamudio, D., Alonso-Farto, J. C., España, S., Mendiguren, J., Bueno, H., García-Ruiz, J. M., Ibañez, B., Fernández-Ortiz, A., & Sanz, J. (2019). Vascular Inflammation in Subclinical Atherosclerosis Detected by Hybrid PET/MRI. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(12), 1371–1382. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.075>
- Feuer, D. S., Handberg, E. M., Mehrad, B., Wei, J., Bairey Merz, C. N., Pepine, C. J., & Keeley, E. C. (2022). Microvascular Dysfunction as a Systemic Disease: A Review of the Evidence. In *American Journal of Medicine* (Vol. 135, Issue 9, pp. 1059–1068). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2022.04.006>
- Fioranelli, M., Rocchia, M. G., Flavin, D., & Cota, L. (2021). Regulation of inflammatory reaction in health and disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22105277>
- Flora, G. D., & Nayak, M. K. (2019). A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Current Pharmaceutical Design*, 25(38), 4063–4084. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190925163827>
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. In *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* (Vol. 69, pp. S4–S9). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
- Francis, S. H., Busch, J. L., & Corbin, J. D. (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 525–563. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002907>
- Francisco, J., & del Re, D. P. (2023). Inflammation in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Underlying Mechanisms and Therapeutic Potential. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antiox12111944>
- Frangogiannis, N. G. (2006). Targeting the Inflammatory Response in Healing Myocardial Infarcts. *Current Medicinal Chemistry*, 13(16), 1877–1893. <https://doi.org/10.2174/092986706777585086>
- Freire, M. O., & van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontology 2000*, 63(1), 149–164. <https://doi.org/10.1111/prd.12034>
- Furchgott, R. F. (1983). BRIEF REVIEWS Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle. In *An Official Journal of the American Heart Association* (Vol. 53, Issue 5). <http://ahajournals.org>

Bibliografía

- Fuster, J., Castillo, A., Zaragoza, C., Ibáñez, B & Andres, V. (2012). Animal Models of Atherosclerosis. *Progress in molecular biology and translational science*. 105. 1-23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00001-9>.
- Gaillard, F. C., Ouadda, A. B. D., Ciccone, L., Girard, E., Mikaeeli, S., Evagelidis, A., le Dévéhat, M., Susan-Resiga, D., Lajeunesse, E. C., Nozach, H., Ramos, O. H. P., Thureau, A., Legrand, P., Prat, A., Dive, V., & Seidah, N. G. (2023). Molecular interactions of PCSK9 with an inhibitory nanobody, CAP1 and HLA-C: Functional regulation of LDLR levels. *Molecular Metabolism*, 67. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101662>
- Gambini, J., & Stromsnes, K. (2022). Oxidative Stress and Inflammation: From Mechanisms to Therapeutic Approaches. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040753>
- García-Blas, S., González D'Gregorio, J., Bonanad, C., Fernández-Cisnal, A., Valero, E., Miñana, G., Mollar, A., Núñez, J., & Sanchis, J. (2021). Long-term outcome of patients with NSTEMI and nonobstructive coronary arteries by different angiographic subtypes. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 74(11), 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.10.008>
- Garcia-Contreras, M., & Thakor, A. S. (2023). Extracellular vesicles in Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 18, Issue 1, pp. 18–22). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.343882>
- Genís, L., Gonzalo, P., Tutor, A. S., Gálvez, B. G., Martínez-Ruiz, A., Zaragoza, C., Lamas, S., Tryggvason, K., Apte, S. S., & Arroyo, A. G. (2007). Functional interplay between endothelial nitric oxide synthase and membrane type 1-matrix metalloproteinase in migrating endothelial cells. *Blood*, 110(8), 2916–2923. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-068080>
- Georgakarakos, E., Papadopoulou, M., Karangelis, D., & Fiska, A. (2023). Teaching vascular anatomy: the anatomy we know, the anatomy we see or the anatomy we need? *Surgical and Radiologic Anatomy*, 45(9), 1155–1164. <https://doi.org/10.1007/S00276-023-03203-X/METRICS>
- Geppert, A., Steiner, A., Zorn, G., Delle-Karth, G., Koreny, M., Haumer, M., Siostrzonek, P., Huber, K., & Gottfried Heinz, ; (2002). Multiple organ failure in patients with cardiogenic shock is associated with high plasma levels of interleukin-6. *Crit Care Med*, 30(9). <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000026730.19872.33>
- Ghimire, K., Altmann, H. M., Straub, A. C., & Isenberg, J. S. (2017). Nitric oxide: What's new to NO? *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(3), C254–C262. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2016>
- Gimbrone, M. A., & García-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 620–636. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>

Bibliografía

- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 95–112). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>
- Gourdy, P., Calippe, B., Laurell, H., Trémollières, F., Douin-Echinard, V., Lenfant, F., Bayard, F., Guery, J. C., & Arnal, J. F. (2008). Role of inflammatory cytokines in the effect of estradiol on atheroma. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(4), 396–401. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04885.x>
- Guijarro-Muñoz, I., Compte, M., Álvarez-Cienfuegos, A., Álvarez-Vallina, L., & Sanz, L. (2014). Lipopolysaccharide activates toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- κ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 2457–2468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.521161>
- Guo, Y., Yan, B., Gui, Y., Tang, Z., Tai, S., Zhou, S., & Zheng, X. L. (2021). Physiology and role of PCSK9 in vascular disease: Potential impact of localized PCSK9 in vascular wall. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 236, Issue 4, pp. 2333–2351). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.30025>
- Gürsoy-O'Zdemir, Y., Bolay, H., Okay, S., Saribas, S., & Dalkara, T. (2000). Role of Endothelial Nitric Oxide Generation and Peroxynitrite Formation in Reperfusion Injury After Focal Cerebral Ischemia. <http://ahajournals.org>
- Han, Y., & Kim, S. Y. (2023). Endothelial senescence in vascular diseases: current understanding and future opportunities in senotherapeutics. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 55, Issue 1, pp. 1–12). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00906-w>
- Hauser, P., Wang, S., & Didenko, V. v. (2017). Apoptotic bodies: Selective detection in extracellular vesicles. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1554, pp. 193–200). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9_12
- Heinze, A., & Rust, M. B. (2023). Loss of the actin regulator cyclase-associated protein 1 (CAP1) modestly affects dendritic spine remodeling during synaptic plasticity. *European Journal of Cell Biology*, 102(4). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151357>
- Hernández-Jiménez, M., Abad-Santos, F., Cotgreave, I., Gallego, J., Jilma, B., Flores, A., Jovin, T. G., Vivancos, J., Hernández-Pérez, M., Molina, C. A., Montaner, J., Casariego, J., Dalsgaard, M., Liebeskind, D. S., Cobo, E., Castellanos, M., Portela, P. C., Masjuán, J., Moniche, F., et al. (2023). Safety and Efficacy of ApTOLL in Patients with Ischemic Stroke Undergoing Endovascular Treatment: A Phase 1/2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 80(8), 779–788. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2023.1660>
- Hernandez, I., Tesoro, L., Ramirez-Carracedo, R., Diez-mata, J., Sanchez, S., Saura, M., Zamorano, J. L., Zaragoza, C., & Botana, L. (2021). Ivabradine Induces Cardiac Protection against Myocardial Infarction by Preventing Cyclophilin-A Secretion in Pigs under Coronary Ischemia/Reperfusion. *International Journal of Molecular*

Bibliografía

- Sciences 2021, Vol. 22, Page 2902, 22(6), 2902.
<https://doi.org/10.3390/IJMS22062902>
- Herranz, B., Marquez, S., Guijarro, B., Aracil, E., Aicart-Ramos, C., Rodríguez-Crespo, I., Rodríguez-Puyol, M., Zaragoza, C., & Saura, M. (2012). Integrin-linked kinase regulates vasomotor function by preventing endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Role in atherosclerosis. *Circulation Research*, 110(3), 439–449.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.253948>
- Herwald, H., & Egesten, A. (2016). On PAMPs and DAMPs. In *Journal of Innate Immunity* (Vol. 8, Issue 5, pp. 427–428). S. Karger AG.
<https://doi.org/10.1159/000448437>
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Nudelman, R., & Stamler, J. S. (2001). S-nitrosylation: spectrum and specificity. In *NATURE CELL BIOLOGY* (Vol. 3).
<http://cellbio.nature.com>
- Hill, N. J., Hultcrantz, M., Sarvetnick, N., & Flodström-Tullberg, M. (2007). The target tissue in autoimmunity - An influential niche. In *European Journal of Immunology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 589–597). <https://doi.org/10.1002/eji.200636368>
- Huang, C. H., Chang, C. C., Kuo, C. L., Huang, C. S., Lin, C. S., & Liu, C. S. (2015). Decrease in plasma cyclophilin a concentration at 1 month after myocardial infarction predicts better left ventricular performance and synchronicity at 6 months: A pilot study in patients with ST elevation myocardial infarction. *International Journal of Biological Sciences*, 11(1), 38–47.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.10271>
- Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A. L. P., Crea, F., Goudevenos, J. A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M. J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimský, P., ... Gale, C. P. (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. In *European Heart Journal* (Vol. 39, Issue 2, pp. 119–177). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide (endothelium-dependent relaxation/vascular smooth muscle/cyclic GMP) (Vol. 84).
- Incalza, M. A., D’Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., & Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. In *Vascular Pharmacology* (Vol. 100, pp. 1–19). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
- Jang, H. D., Lee, S. E., Yang, J., Lee, H. C., Shin, D., Lee, H., Lee, J., Jin, S., Kim, S., Lee, S. J., You, J., Park, H. W., Nam, K. Y., Lee, S. H., Park, S. W., Kim, J. S., Kim, S. Y., Kwon, Y. W., Kwak, S. H., ... Kim, H. S. (2020). Cyclase-associated protein 1 is a binding partner of proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 and

Bibliografía

- is required for the degradation of low-density lipoprotein receptors by proprotein convertase subtilisin/kexin type-9. *European Heart Journal*, 41(2), 239.
<https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHZ566>
- Jenča, D., Melenovský, V., Stehlik, J., Staněk, V., Kettner, J., Kautzner, J., Adámková, V., & Wohlfahrt, P. (2021). Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. In *ESC Heart Failure* (Vol. 8, Issue 1, pp. 222–237). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13144>
- Jimenez Trinidad, F. R., Ruiz, M. A., Batlló, N. S., Badenes, À. V., Gibert, J. B., Cañellas, A. V., Moreno, M. R., Rofastes, X. F., Tenas, M. S., Dantas, A. P., Turacide, O., & Muxart, M. R. (2021). Linking in vitro models of endothelial dysfunction with cell senescence. *Life*, 11(12).
<https://doi.org/10.3390/life11121323>
- Jin, D., Li, X., Cong, H., You, B., Ma, Y., Hu, Y., & Zhang, J. (2023). Role of serum CAP1 protein in the diagnosis of patients with first-time acute myocardial infarction. *Medicine (United States)*, 102(39), E34700.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000034700>
- Jung, H. S., Park, K. H., Cho, Y. M., Chung, S. S., Cho, H. J., Cho, S. Y., Kim, S. J., Kim, S. Y., Lee, H. K., & Park, K. S. (2006). Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 69(1), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.09.015>
- Jung, R. G., di Santo, P., Mathew, R., Abdel-Razek, O., Parlow, S., Simard, T., Marbach, J. A., Gillmore, T., Mao, B., Bernick, J., Theriault-Lauzier, P., Fu, A., Lau, L., Motazedian, P., Russo, J. J., Labinaz, M., & Hibbert, B. (2021). Implications of myocardial infarction on management and outcome in cardiogenic shock. *Journal of the American Heart Association*, 10(21).
<https://doi.org/10.1161/JAHA.121.021570>
- Kakurina, G. v., Kolegova, E. S., & Kondakova, I. v. (2018). Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1: Structure, Regulation, and Participation in Cellular Processes. *Biochemistry. Biokhimiia*, 83(1), 45–53.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918010066>
- Karpman, D., Ståhl, A. L., & Arvidsson, I. (2017). Extracellular vesicles in renal disease. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 13, Issue 9, pp. 545–562). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.98>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue SEP). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Knowles, J. W., Reddick, R. L., Jennette, J. C., Shesely, E. G., Smithies, O., & Maeda, N. (2000). Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *Journal of Clinical Investigation*, 105(4), 451–458. <https://doi.org/10.1172/JCI8376>

Bibliografia

- Korniluk, A., Koper, O., Kemon, H., & Dymicka-Piekarska, V. (2017). From inflammation to cancer. In *Irish Journal of Medical Science* (Vol. 186, Issue 1, pp. 57–62). Springer London. <https://doi.org/10.1007/s11845-016-1464-0>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Krittanawong, C., Khawaja, M., Tamis-Holland, J. E., Girotra, S., & Rao, S. v. (2023). Acute Myocardial Infarction: Etiologies and Mimickers in Young Patients. In *Journal of the American Heart Association* (Vol. 12, Issue 18). American Heart Association Inc. <https://doi.org/10.1161/JAHA.123.029971>
- Krötz, F., Schiele, T. M., Klauss, V., & Sohn, H. Y. (2005). Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. In *Journal of Vascular Research* (Vol. 42, Issue 4, pp. 312–324). <https://doi.org/10.1159/000086459>
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular endothelial cell biology: An update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>
- Kumar, M. A., Baba, S. K., Sadida, H. Q., Marzooqi, S. al, Jerobin, J., Altemani, F. H., Algehainy, N., Alanazi, M. A., Abou-Samra, A. B., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, A. S., Macha, M. A., Mir, R., & Bhat, A. A. (2024). Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Kuravi, S. J., Harrison, P., Rainger, G. E., & Nash, G. B. (2019). Ability of Platelet-Derived Extracellular Vesicles to Promote Neutrophil-Endothelial Cell Interactions. *Inflammation*, 42(1), 290–305. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0893-5>
- Lagace, T. A. (2014). PCSK9 and LDLR degradation: Regulatory mechanisms in circulation and in cells. In *Current Opinion in Lipidology* (Vol. 25, Issue 5, pp. 387–393). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000114>
- Lamas, S., Lowenstein, C. J., & Michel, T. (2007). Nitric oxide signaling comes of age: 20 years and thriving. *Cardiovascular Research*, 75(2), 207–209. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.05.023>

Bibliografía

- Lananna, B. v., & Imai, S. ichiro. (2021). Friends and foes: Extracellular vesicles in aging and rejuvenation. In *FASEB BioAdvances* (Vol. 3, Issue 10, pp. 787–801). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00077>
- Li, M., Qian, M., Kyler, K., & Xu, J. (2018). Endothelial–Vascular Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00151>
- Li, Y., & Yang, L. (2022). Cyclophilin a represses reactive oxygen species generation and death of hypoxic non-small-cell lung cancer cells by degrading thioredoxin-interacting protein. *Cell Cycle*, 21(18), 1996–2007. <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2078615>
- Libby, P. (2007). *Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease*. 140–146. <https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.S140>
- Liberale, L., Badimon, L., Montecucco, F., Lüscher, T. F., Libby, P., & Camici, G. G. (2022). Inflammation, Aging, and Cardiovascular Disease: JACC Review Topic of the Week. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 79, Issue 8, pp. 837–847). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.12.017>
- Liberale, L., Ministrini, S., Carbone, F., Camici, G. G., & Montecucco, F. (2021). Cytokines as therapeutic targets for cardio- and cerebrovascular diseases. In *Basic Research in Cardiology* (Vol. 116, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00395-021-00863-x>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 2). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Lizarbe, T. R., Tarín, C., Gómez, M., Lavin, B., Aracil, E., Orte, L. M., & Zaragoza, C. (2009). Nitric oxide induces the progression of abdominal aortic aneurysms through the matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN. *American Journal of Pathology*, 175(4), 1421–1430. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080845>
- Lockhart, M., Wirrig, E., Phelps, A., & Wessels, A. (2011). Extracellular matrix and heart development. In *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* (Vol. 91, Issue 6, pp. 535–550). <https://doi.org/10.1002/bdra.20810>
- Lopez-Rivera, E., Lizarbe, T. R., Martínez-Moreno, M., Miguel Lopez-Novoa, J., Rodríguez-Barbero, A., Rodrigo, J., Patricia Fernandez, A., Alvarez-Barrientos, A., Lamas, S., & Zaragoza, C. (2005). Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. In *CELL BIOLOGY* (Vol. 8, Issue 10). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408217102
- Ma, Z., Zhang, W., Wu, Y., Zhang, M., Wang, L., Wang, Y., Wang, Y., & Liu, W. (2021). Cyclophilin A inhibits A549 cell oxidative stress and apoptosis by modulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Bioscience Reports*, 41(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20203219>

Bibliografia

- Mahfooz, K., Rana, A., Palagati, K., Suvarna, A. K., Perryman, C., Gaddipati, S. P., Adhnon, A., Andani, R., & Vasavada, A. (2022). Anakinra in Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medical Sciences*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.3390/medsci11010004>
- Margină, D., Ungurianu, A., Purdel, C., Tsoukalas, D., Sarandi, E., Thanasoula, M., Tekos, F., Mesnage, R., Kouretas, D., & Tsatsakis, A. (2020). Chronic inflammation in the context of everyday life: Dietary changes as mitigating factors. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 11, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114135>
- Marshall, S. E. (2004). Behçet's disease. In *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 291–311). <https://doi.org/10.1016/j.berh.2004.02.008>
- Martínez, M. J., Rueda, F., Labata, C., Oliveras, T., Montero, S., Ferrer, M., Ouaddi, N. el, Serra, J., Lupón, J., Bayés-Genís, A., & García-García, C. (2022). Non-STEMI vs. STEMI Cardiogenic Shock: Clinical Profile and Long-Term Outcomes. *Journal of Clinical Medicine*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/jcm11123558>
- Medvegy, M., Simonyi, G., Medvegy, N., & Pécsvárady, Z. (2011). Non-ST elevation myocardial infarction: A new pathophysiological concept could solve the contradiction between accepted cause and clinical observations. In *Acta Physiologica Hungarica* (Vol. 98, Issue 3, pp. 252–261). <https://doi.org/10.1556/APhysiol.98.2011.3.2>
- Mendieta, G., Pocock, S., Mass, V., Moreno, A., Owen, R., García-Lunar, I., López-Melgar, B., Fuster, J. J., Andres, V., Pérez-Herreras, C., Bueno, H., Fernández-Ortiz, A., Sanchez-Gonzalez, J., García-Alvarez, A., Ibáñez, B., & Fuster, V. (2023). Determinants of Progression and Regression of Subclinical Atherosclerosis Over 6 Years. *Journal of the American College of Cardiology*, 82(22), 2069–2083. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.09.814>
- Milutinović, A., Šuput, D., & Zorc-Pleskovič, R. (2020). Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(1), 21–30. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2019.4320>
- Minami, T., Muramatsu, M., & Kume, T. (2019). Organ/Tissue-Specific Vascular Endothelial Cell Heterogeneity in Health and Disease. In *Biol. Pharm. Bull* (Vol. 42, Issue 10).
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., & Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*, 105(13), 1541–1544. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000013836.85741.17>
- Minciacchi, V. R., Freeman, M. R., & di Vizio, D. (2015). Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes.

Bibliografía

- Seminars in Cell & Developmental Biology, 40, 41.
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2015.02.010>
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., & Higgs, E. A. (1989). *Discovery of Nitric Oxide as the Endogenous Nitrovasodilator*. <http://ahajournals.org>
- Moris, D., Spartalis, M., Spartalis, E., Karachaliou, G. S., Karaolani, G. I., Tsurouflis, G., Tsilimigras, D. I., Tzatzaki, E., & Theocharis, S. (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. In *Annals of Translational Medicine* (Vol. 5, Issue 16). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.27>
- Munjas, J., Sopić, M., Spasojević-Kalimanovska, V., Kalimanovska-Oštrić, D., Anđelković, K., & Jelić-Ivanović, Z. (2017). Association of adenylate cyclase-associated protein 1 with coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 47(9), 659–666. <https://doi.org/10.1111/eci.12787>
- Nakamaru, R., Shiraishi, Y., Sandhu, A. T., Heidenreich, P. A., Shoji, S., Kohno, T., Takei, M., Nagatomo, Y., Nakano, S., Kohsaka, S., & Yoshikawa, T. (2023). Cardiovascular vs. non-cardiovascular deaths after heart failure hospitalization in young, older, and very old patients. *ESC Heart Failure*, 10(1), 673–684. <https://doi.org/10.1002/ehf2.14245>
- Nigro, P., Pompilio, G., & Capogrossi, M. C. (2013). Cyclophilin A: A key player for human disease. In *Cell Death and Disease* (Vol. 4, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.410>
- Nigro, P., Pompilio, G., & Capogrossi, M. C. (2013). Cyclophilin A: A key player for human disease. In *Cell Death and Disease* (Vol. 4, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.410>
- Nohria, R., & Viera, A. J. (2024). Acute Coronary Syndrome: Diagnosis and Initial Management. *American Family Physician*, 109(1), 34–42. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2024/0100/acute-coronary-syndrome.html>
- North, B. J., & Sinclair, D. A. (2012). The intersection between aging and cardiovascular disease. In *Circulation Research* (Vol. 110, Issue 8, pp. 1097–1108). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246876>
- Ohtsuki, T., Satoh, K., Omura, J., Kikuchi, N., Satoh, T., Kurosawa, R., Nogi, M., Sunamura, S., Yaoita, N., Aoki, T., Tatebe, S., Sugimura, K., Takahashi, J., Miyata, S., & Shimokawa, H. (2017). Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin a in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(4), 685–693. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308986>
- Ong, S. B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X. Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel

Bibliografía

- therapeutic opportunities. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 186, pp. 73–87). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.001>
- Oronsky, B., Caroen, S., & Reid, T. (2022). What Exactly Is Inflammation (and What Is It Not?). In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232314905>
- Pablo-Moreno, J. A. D., Serrano, L. J., Revuelta, L., Sánchez, M. J., & Liras, A. (2022). The Vascular Endothelium and Coagulation: Homeostasis, Disease, and Treatment, with a Focus on the Von Willebrand Factor and Factors VIII and V. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23158283>
- Pahk, K., Joung, C., Song, H. Y., Kim, S., & Kim, W. K. (2020). SP-8356, a novel inhibitor of CD147-cyclophilin a interactions, reduces plaque progression and stabilizes vulnerable plaques in apoE-deficient mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010095>
- Park, C., Cha, H. J., Lee, H., Kim, G. Y., & Choi, Y. H. (2021). The regulation of the TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways is involved in the inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative reactions by morroniside in RAW 264.7 macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 706. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108926>
- Pascual Izco, M., Castejón, B., Piedras, M. J., Zamorano, J. L., Sanmartín, M., & Zaragoza, C. (2017). Effects of Ivabradine on Heart Rate and Hemodynamic Parameters in a Swine Model of Cardiogenic Shock. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 70(12), 1139–1141. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.03.009>
- Paul, S., Lancaster, G. I., & Meikle, P. J. (2019). Plasmalogens: A potential therapeutic target for neurodegenerative and cardiometabolic disease. *Progress in Lipid Research*, 74(January), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.04.003>
- Qing, J. N., Lei, Y., Bao, M. H., & Fu, Q. M. (2021). A Relationship between vascular endothelial cell senescence and cardiovascular disease. *E3S Web of Conferences*, 271, 1–4. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127103062>
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. J., & Moncada, S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 92(3), 639–646. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1987.tb11367.x>
- Rafikov, R., Fonseca, F. V., Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., Fulton, D., & Black, S. M. (2011). eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *Journal of Endocrinology*, 210(3), 271–284. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0083>

Bibliografía

- Ramírez-Carracedo, R., Hernández, I., Moreno-Gómez-Toledano, R., Díez-Mata, J., Tesoro, L., González-Cucharero, C., Jiménez-Guirado, B., Alcharani, N., Botana, L., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2024). NOS3 prevents MMP-9, and MMP-13 induced extracellular matrix proteolytic degradation through specific microRNA-targeted expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in hypertension-related atherosclerosis. *Journal of Hypertension*, 42(4), 685–693. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003679>
- Ramirez-Carracedo, R., Sanmartin, M., Ten, A., Hernandez, I., Tesoro, L., Diez-Mata, J., Botana, L., Ovejero-Paredes, K., Filice, M., Alberich-Bayarri, A., Martí-Bonmatí, L., Largo-Aramburu, C., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2022). Theranostic Contribution of Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer-Paramagnetic Nanoparticles Against Acute Myocardial Infarction in a Pig Model of Coronary Ischemia-Reperfusion. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 15(6), E013379. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.121.013379>
- Ramírez-Carracedo, R., Tesoro, L., Hernandez, I., Diez-Mata, J., Piñeiro, D., Hernandez-Jimenez, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2020). Targeting tlr4 with aptoll improves heart function in response to coronary ischemia reperfusion in pigs undergoing acute myocardial infarction. *Biomolecules*, 10(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biom10081167>
- Ramírez, R., Ceprian, N., Figuer, A., Valera, G., Bodega, G., Alique, M., & Carracedo, J. (2022). Endothelial Senescence and the Chronic Vascular Diseases: Challenges and Therapeutic Opportunities in Atherosclerosis. *Journal of Personalized Medicine*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/jpm12020215>
- Ramírez, R., Díez, J., Sanmartín, M., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2019). Nanotechnology Applied to Preserve Extracellular Matrix as Teranostic Tool in Acute Myocardial Infarction. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 72(2), 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.12.023>
- Rath, D., von Ungern-Sternberg, S., Heinzmann, D., Sigle, M., Monzien, M., Horstmann, K., Schaeffeler, E., Winter, S., Müller, K., Grogga-Bada, P., Zdanyte, M., Borst, O., Zerneck, A., Gawaz, M., Martus, P., Schwab, M., Geisler, T., & Seizer, P. (2020). Platelet surface expression of cyclophilin A is associated with increased mortality in patients with symptomatic coronary artery disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18(1), 234–242. <https://doi.org/10.1111/jth.14635>
- Rautou, P. E., Leroyer, A. S., Ramkhalawon, B., Devue, C., Duflaut, D., Vion, A. C., Nalbone, G., Castier, Y., Leseche, G., Lehoux, S., Tedgui, A., & Boulanger, C. M. (2011). Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circulation Research*, 108(3), 335–343. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.237420>
- Reddy, K. (2015). Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction. *World Journal of Cardiology*, 7(5), 243. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i5.243>

Bibliografía

- Regina, C., Panatta, E., Candi, E., Melino, G., Amelio, I., Balistreri, C. R., Annicchiarico-Petruzzelli, M., di Daniele, N., & Ruvolo, G. (2016). Vascular ageing and endothelial cell senescence: Molecular mechanisms of physiology and diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 159, 14–21. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2016.05.003>
- Reis, S. E., Holubkov, R., Smith, A. J. C., Kelsey, S. F., Sharaf, B. L., Reichek, N., Rogers, W. J., Merz, C. N. B., Sopko, G., & Pepine, C. J. (2001). Coronary microvascular dysfunction is highly prevalent in women with chest pain in the absence of coronary artery disease: Results from the NHLBI WISE study. *American Heart Journal*, 141(5), 735–741. <https://doi.org/10.1067/mhj.2001.114198>
- Reventun, P., Alique, M., Cuadrado, I., Márquez, S., Toro, R., Zaragoza, C., & Saura, M. (2017). INOS-Derived Nitric Oxide Induces Integrin-Linked Kinase Endocytic Lysosome-Mediated Degradation in the Vascular Endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(7), 1272–1281. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309560>
- Reventun, P., Sánchez-Esteban, S., Cook-Calvete, A., Delgado-Marín, M., Roza, C., Jorquera-Ortega, S., Hernandez, I., Tesoro, L., Botana, L., Zamorano, J. L., Zaragoza, C., & Saura, M. (2023). Endothelial ILK induces cardioprotection by preventing coronary microvascular dysfunction and endothelial-to-mesenchymal transition. *Basic Research in Cardiology*, 118(1). <https://doi.org/10.1007/s00395-023-00997-0>
- Roger, L., Tomas, F., & Gire, V. (2021). Mechanisms and regulation of cellular senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 1–42. <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>
- Rossello, X., Rodriguez-Sinovas, A., Vilahur, G., Crisóstomo, V., Jorge, I., Zaragoza, C., Zamorano, J. L., Bermejo, J., Ordoñez, A., Boscá, L., Vázquez, J., Badimón, L., Sánchez-Margallo, F. M., Fernández-Avilés, F., Garcia-Dorado, D., & Ibanez, B. (2019). CIBER-CLAP (CIBERCV Cardioprotection Large Animal Platform): A multicenter preclinical network for testing reproducibility in cardiovascular interventions. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56613-6>
- Rysz, J., Franczyk, B., Rysz-Górzyńska, M., & Gluba-Brzózka, A. (2021). Ageing, Age-Related Cardiovascular Risk and the Beneficial Role of Natural Components Intake. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 183, 23(1), 183. <https://doi.org/10.3390/IJMS23010183>
- Sager, R. (1991). Senescence As a Mode of Tumor Suppression. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 93).
- Samsky, M. D., Morrow, D. A., Proudfoot, A. G., Hochman, J. S., Thiele, H., & Rao, S. v. (2021). Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction: A Review. *JAMA*, 326(18), 1840–1850. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.18323>

Bibliografía

- Sandoo, A., Veldhuijzen Van Zanten, J. J. C. S., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. In *The Open Cardiovascular Medicine Journal* (Vol. 4).
- Satoh, K. (2014). Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases. In *Tohoku Journal of Experimental Medicine* (Vol. 235, Issue 1, pp. 1–15). Tohoku University Medical Press. <https://doi.org/10.1620/tjem.235.1>
- Satoh, K. (2017). Development of novel therapies for cardiovascular diseases by clinical application of basic research. In *Circulation Journal* (Vol. 81, Issue 11, pp. 1557–1563). Japanese Circulation Society. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-17-1029>
- Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2022). Preclinical models of congestive heart failure, advantages, and limitations for application in clinical practice. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.850301>
- Saura, M., Zaragoza, C., Cao, W., Bao, C., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., & Lowenstein, C. J. (2002). Smad2 mediates transforming growth factor- β induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circulation Research*, *91*(9), 806–813. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000040397.23817.E5>
- Saura, M., Zaragoza, C., Herranz, B., Griera, M., Diez-Marqués, L., Rodríguez-Puyol, D., & Rodríguez-Puyol, M. (2005). Nitric oxide regulates transforming growth factor- β signaling in endothelial cells. *Circulation Research*, *97*(11), 1115–1123. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000191538.76771.66>
- Saura, M., Zaragoza, C., Mcmillan, A., Quick, R. A., Hohenadl, C., Lowenstein, J. M., & Lowenstein, C. J. (1999). An Antiviral Mechanism of Nitric Oxide: Inhibition of a Viral Protease Exogenous NO inhibits replication of Cocksackievirus and poliovirus in vitro, reducing viral RNA and protein synthesis. Thus, iNOS and NO are important compo. In *Immunity* (Vol. 10).
- Schiffrin, E. L. (2008). Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: A matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation. *Hypertension*, *51*(1), 31–32. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103226/FORMAT/EPUB>
- Seizer, P., Fuchs, C., Ungern-Sternberg, S. N. I. V., Heinzmann, D., Langer, H., Gawaz, M., May, A. E., & Geisler, T. (2016). Platelet-bound cyclophilin A in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Platelets*, *27*(2), 155–158. <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1051466>
- Seizer, P., Gawaz, M., & May, A. E. (2014). Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases. Oxford University Press. In *Cardiovascular Research* (Vol. 102, Issue 1, pp. 17–23).. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu035>

Bibliografia

- Shafi, S., Ansari, H. R., Bahitham, W., & Aouabdi, S. (2019). The Impact of Natural Antioxidants on the Regenerative Potential of Vascular Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(March). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00028>
- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H.-S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., & Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase (gene disruption heart rate renin concentration lipopolysaccharide). In *Medical Sciences* (Vol. 93). <https://www.pnas.org>
- Sierra, F. (2016). The emergence of geroscience as an interdisciplinary approach to the enhancement of health span and life span. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025163>
- Simeone, P., Bologna, G., Lanuti, P., Pierdomenico, L., Guagnano, M. T., Pieragostino, D., del Boccio, P., Vergara, D., Marchisio, M., Miscia, S., & Mariani-Costantini, R. (2020). Extracellular vesicles as signaling mediators and disease biomarkers across biological barriers. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21072514>
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 575–581. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.03.007>
- Sobati, S., Shakouri, A., Edalati, M., Mohammadnejad, D., Parvan, R., Masoumi, J., & Abdolalizadeh, J. (2020). PCSK9: A Key Target for the Treatment of Cardiovascular Disease (CVD). In *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (Vol. 10, Issue 4, pp. 502–511). Tabriz University of Medical Sciences. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.062>
- Sorriento, D., & Iaccarino, G. (2019). Inflammation and cardiovascular diseases: The most recent findings. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20163879>
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., JARAKIt, O., Michel, T., Singel, D. J., Loscalzo, J., & Roxbury, W. (1992). *S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds* (Vol. 89). <https://www.pnas.org>
- Stanca Melincovici, C., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I.-M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, 59(2), 455–467. <http://www.rjme.ro/>
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., el Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. v., Li, M., Riddle, S. R., & Frid, M. G. (2013). The adventitia: Essential regulator of vascular wall structure and function. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 75, pp. 23–47). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>

Bibliografía

- Sucato, V., Madaudo, C., & Galassi, A. R. (2022). Classification, Diagnosis, and Treatment of Coronary Microvascular Dysfunction. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 11, Issue 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm11154610>
- Suzuki, J., Jin, Z. G., Meoli, D. F., Matoba, T., & Berk, B. C. (2006). Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 98(6), 811–817. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000216405.85080.a6>
- Tarín, C., Gomez, M., Calvo, E., López, J. A., & Zaragoza, C. (2009). Endothelial nitric oxide deficiency reduces MMP-13-mediated cleavage of ICAM-1 in vascular endothelium a role in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(1), 27–32. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.169623>
- Tarin, C., Lavin, B., Gomez, M., Saura, M., Diez-Juan, A., & Zaragoza, C. (2011). The extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN is a target of nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.021>
- Tesoro, L., Hernández, I., Ramírez-Carracedo, R., Díez-Mata, J., Alcharani, N., Jiménez-Guirado, B., Ovejero-Paredes, K., Filice, M., Zamorano, J. L., Saura, M., Zaragoza, C., & Botana, L. (2022). NIL10: A New IL10-Receptor Binding Nanoparticle That Induces Cardiac Protection in Mice and Pigs Subjected to Acute Myocardial Infarction through STAT3/NF- κ B Activation. *Pharmaceutics*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102044>
- Tesoro, L., Hernandez, I., Saura, M., Badimón, L., & Zaragoza, C. (2024). Novel cutting edge nano-strategies to address old long-standing complications in cardiovascular diseases. A comprehensive review. *European Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1111/ECI.14208>
- Tesoro, L., Ramirez-Carracedo, R., Hernandez, I., Diez-Mata, J., Pascual, M., Saura, M., Sanmartin, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2021). Ivabradine induces cardiac protection by preventing cardiogenic shock-induced extracellular matrix degradation. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 74(12), 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.09.012>
- Tewelde, S. Z., Liu, S. S., & Winters, M. E. (2018). Cardiogenic Shock. *Cardiology Clinics*, 36(1), 53–61. <https://doi.org/10.1016/J.CCL.2017.08.009>
- Thiene, G., Frescura, C., Padalino, M., Basso, C., & Rizzo, S. (2021). Coronary Arteries: Normal Anatomy With Historical Notes and Embryology of Main Stems. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.649855>
- Thöne, K., Kollhorst, B., & Schink, T. (2017). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use and the Risk of Acute Myocardial Infarction in the General German Population: A Nested Case–Control Study. *Drugs - Real World Outcomes*, 4(3), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s40801-017-0113-x>

Bibliografía

- Tian-tian, Z. M., Jun-feng, Z. M., & Heng, G. (2013). Functions of cyclophilin A in atherosclerosis. In *Exp Clin Cardiol* (Vol. 18). e118–e124.
- Vats, S., & Galli, T. (2022). Role of SNAREs in Unconventional Secretion—Focus on the VAMP7-Dependent Secretion. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 884020. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.884020/BIBTEX>
- Vilahur, G., Juan-Babot, O., Peña, E., Oñate, B., Casaní, L., & Badimon, L. (2011). Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(3), 522–533. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.12.021>
- von Ungern-Sternberg, S. N. I., Zerneck, A., & Seizer, P. (2018). Extracellular matrix metalloproteinase inducer emmprin (Cd147) in cardiovascular disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19020507>
- Wang, J. C., & Bennett, M. (2012). Aging and atherosclerosis: Mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circulation Research*, 111(2), 245–259. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261388>
- Whitsett, J., Filho, A. R., Sethumadhavan, S., Celinska, J., Widlansky, M., & Vasquez-Vivar, J. (2013). Human endothelial dihydrofolate reductase low activity limits vascular tetrahydrobiopterin recycling. *Free Radical Biology & Medicine*, 63, 143–150. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.04.035>
- Xie, H. H., Zhou, S., Chen, D. D., Channon, K. M., Su, D. F., & Chen, A. F. (2010). GTP cyclohydrolase I/BH4 pathway protects EPCs via suppressing oxidative stress and thrombospondin-1 in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 56(6), 1137–1144. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.160622>
- Xu, H., Fang, B., Du, S., Wang, S., Li, Q., Jia, X., Bao, C., Ye, L., Sui, X., Qian, L., Luan, Z., Yang, G., Zheng, F., Wang, N., Chen, L., Zhang, X., & Guan, Y. (2020). Endothelial cell prostaglandin E2 receptor EP4 is essential for blood pressure homeostasis. *JCI Insight*, 5(13). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138505>
- Xu, H., Shi, Y., Wang, J., Jones, D., Weilrauch, D., Ying, R., Wakim, B., & Pritchard, K. A. (2007). A Heat Shock Protein 90 Binding Domain in Endothelial Nitric-oxide Synthase Influences Enzyme Function. 282(52), 37567–37574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706464200>
- Xu, J., Lu, Y., Qiu, S., Chen, Z. N., & Fan, Z. (2013). A novel role of EMMPRIN/CD147 in transformation of quiescent fibroblasts to cancer-associated fibroblasts by breast cancer cells. *Cancer Letters*, 335(2), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.054>
- Xue, L., Su, L., Xie, J., Du, Y., & Yu, X. (2018). EMMPRIN-CypA contributes to the inflammatory processes in human periodontitis through infiltrating CD68 + inflammatory cells. In *Int J Clin Exp Pathol* (Vol. 11, Issue 8). www.ijcep.com/

Bibliografía

- Xue, Z., Yuan, W., Li, J., Zhou, H., Xu, L., Weng, J., Li, X., Zhang, X., Wang, Z., & Yan, J. (2017). Cyclophilin A mediates the ox-LDL-induced activation and apoptosis of macrophages via autophagy. *International Journal of Cardiology*, 230, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.042>
- Yamada, K. M., Collins, J. W., Cruz Walma, D. A., Doyle, A. D., Morales, S. G., Lu, J., Matsumoto, K., Nazari, S. S., Sekiguchi, R., Shinsato, Y., & Wang, S. (2019). Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. In *International Journal of Experimental Pathology* (Vol. 100, Issue 3, pp. 144–152). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/iep.12329>
- Yoneyama, T., Wilson, L. M., & Hatakeyama, K. (2001). GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein-dependent and -independent inhibitors of GTP cyclohydrolase I. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388(1), 67–73. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2288>
- Yuan, W., Ge, H., & He, B. (2010). Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRN interaction in monocytes. *Atherosclerosis*, 213(2), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.033>
- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., & Lai, C. P. (2015). Editor's Choice: Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, 65(8), 783. <https://doi.org/10.1093/BIOSCI/BIV084>
- Zaragoza, C., Ocampo, C. J., Saura, M., McMillan, A., & Lowenstein, C. J. (1997). Nitric oxide inhibition of coxsackievirus replication in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(7), 1760–1767. <https://doi.org/10.1172/JCI119702>
- Zaragoza, C., Ocampo, C., Saura, M., Leppo, M., Wei, X.-Q., Quick, R., Moncada, S., Liew, F. Y., & Lowenstein, C. J. (1998). The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Cocksackievirus myocarditis (nitric oxide). In *Immunology* (Vol. 95). www.pnas.org.
- Zaragoza, C., Saura, M., Padalko, E.Y., Lopez-Rivera, E, Lizarbe, T., Lamas, S & Lowenstein, C. (2006). Viral protease cleavage of inhibitor of B triggers host cell apoptosis. *PNAS*. 103 (50). <https://doi.org/10.1073/pnas.0606019103>
- Zaragoza, C., Soria, E., Opez, E. L., Browning, D., Balbin, M., Balbin, B., Opez-Otin, C. L. , Otin, O., & Lamas, S. (2002). *Activation of the Mitogen Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 by the Nitric Oxide-cGMP-cGMP-Dependent Protein Kinase Axis Regulates the Expression of Matrix Metalloproteinase 13 in Vascular Endothelial Cells*. <http://molpharm.aspetjournals.org>
- Zhang, H., Ghai, P., Wu, H., Wang, C., Field, J., & Zhou, G. L. (2013). Mammalian adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) regulates cofilin function, the actin cytoskeleton, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 20966–20977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484535>

Bibliografía

Zhang, X., Wu, Y., Cheng, Q., Bai, L., Huang, S., & Gao, J. (2022). Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Diagnosis and Therapy. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.875376>

Zhou, L., Li, J. Y., He, P. P., Yu, X. H., & Tang, C. K. (2021). Resistin: Potential biomarker and therapeutic target in atherosclerosis. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 512, pp. 84–91). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.11.010>

Anexos

ANEXOS



Article

Ivabradine Induces Cardiac Protection against Myocardial Infarction by Preventing Cyclophilin-A Secretion in Pigs under Coronary Ischemia/Reperfusion

Ignacio Hernandez ^{1,2}, Laura Tesoro ^{1,2}, Rafael Ramirez-Carracedo ^{1,2}, Javier Diez-Mata ¹, Sandra Sanchez ³, Marta Saura ^{2,3}, Jose Luis Zamorano ^{2,4}, Carlos Zaragoza ^{1,2,*} and Laura Botana ¹¹ Hospital Ramón y Cajal Research Unit (IRYCIS), Cardiology Department, Universidad Francisco de Vitoria, 28223 Madrid, Spain; naoete1992@gmail.com (I.H.); lauratesoro4@hotmail.com (L.T.); recarracedo@hotmail.com (R.R.-C.); jdiezmata@gmail.com (J.D.-M.); laura.botana@ufv.es (L.B.)² CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain; marta.saura@iuh.es (M.S.); zamorano@secardiologia.es (J.L.Z.)³ Systems Biology Department, Universidad de Alcalá, IRYCIS, 28772 Alcalá de Henares, Spain; sandrasanchez07@hotmail.com⁴ Cardiology Department, Hospital Ramón y Cajal, IRYCIS, 28034 Madrid, Spain

* Correspondence: c.zaragoza.prof@ufv.es



Citation: Hernandez, I.; Tesoro, L.; Ramirez-Carracedo, R.; Diez-Mata, J.; Sanchez, S.; Saura, M.; Zamorano, J.L.; Zaragoza, C.; Botana, L. Ivabradine Induces Cardiac Protection against Myocardial Infarction by Preventing Cyclophilin-A Secretion in Pigs under Coronary Ischemia/Reperfusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2902. <https://doi.org/10.3390/ijms22062902>

Academic Editors: Ioanna Andreadou and Derek Hasenloy

Received: 29 December 2020

Accepted: 1 March 2021

Published: 12 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In response to cardiac ischemia/reperfusion, proteolysis mediated by extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its secreted ligand cyclophilin-A (CyPA) significantly contributes to cardiac injury and necrosis. Here, we aimed to investigate if, in addition to the effect on the funny current (I_f), Ivabradine may also play a role against cardiac necrosis by reducing EMMPRIN/CyPA-mediated cardiac inflammation. In a porcine model of cardiac ischemia/reperfusion (IR), we found that administration of 0.3 mg/kg Ivabradine significantly improved cardiac function and reduced cardiac necrosis by day 7 after IR, detecting a significant increase in cardiac CyPA in the necrotic compared to the risk areas, which was inversely correlated with the levels of circulating CyPA detected in plasma samples from the same subjects. In testing whether Ivabradine may regulate the levels of CyPA, no changes in tissue CyPA were found in healthy pigs treated with 0.3 mg/kg Ivabradine, but interestingly, when analyzing the complex EMMPRIN/CyPA, rather high glycosylated EMMPRIN, which is required for EMMPRIN-mediated matrix metalloproteinase (MMP) activation and increased CyPA bonding to low-glycosylated forms of EMMPRIN were detected by day 7 after IR in pigs treated with Ivabradine. To study the mechanism by which Ivabradine may prevent secretion of CyPA, we first found that Ivabradine was time-dependent in inhibiting co-localization of CyPA with the granule exocytosis marker vesicle-associated membrane protein 1 (VAMP1). However, Ivabradine had no effect on mRNA expression nor in the proteasome and lysosome degradation of CyPA. In conclusion, our results point toward CyPA, its ligand EMMPRIN, and the complex CyPA/EMMPRIN as important targets of Ivabradine in cardiac protection against IR.

Keywords: acute myocardial infarction; ischemia/reperfusion; Ivabradine; EMMPRIN; cyclophilin A

1. Introduction

Cardiac remodeling is the result of an orchestrated series of genomic, biochemical, and morphological changes which determine the heart's fate in terms of restoring adequate heart contractility. Adverse cardiac remodeling may result in severe and chronic heart failure by still unknown molecular events, and hence, intense research on finding new diagnostic and forecast molecular targets is of a significant interest.

Ivabradine is designed to target cardiac funny current (I_f) by inhibiting the activity of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide (HCN)-gated potassium channels, reducing heart rate with no significant effect on blood pressure and cardiac output. Therefore,



Article

Replicative Endothelial Cell Senescence May Lead to Endothelial Dysfunction by Increasing the BH2/BH4 Ratio Induced by Oxidative Stress, Reducing BH4 Availability, and Decreasing the Expression of eNOS

Ignacio Hernandez-Navarro ^{1,2}, Laura Botana ^{1,3}, Javier Diez-Mata ¹, Laura Tesoro ^{1,4},
Beatriz Jimenez-Guirado ¹, Claudia Gonzalez-Cucharero ¹, Nunzio Alcharani ^{1,3}, Jose Luis Zamorano ^{2,5},
Marta Saura ^{2,6} and Carlos Zaragoza ^{1,2,4,*}

- ¹ Unidad Mixta de Investigación Cardiovascular Universidad Francisco de Vitoria, Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain; nasete1992@gmail.com (L.H.-N.); laura.botana@ufv.es (L.B.); jdiezmata@gmail.com (J.D.-M.); laura.tesoro@ufv.es (L.T.); b.jimenezguirado@gmail.com (B.J.-G.); claudia311099@gmail.com (C.G.-C.); nunzio.alcharani@ufv.es (N.A.)
- ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCIV), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain; zamorano@secardiologia.es (J.L.Z.); marta.saura@uah.es (M.S.)
- ³ Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Francisco de Vitoria, 28223 Madrid, Spain
- ⁴ Facultad de Medicina, Universidad Francisco de Vitoria, 28223 Madrid, Spain
- ⁵ Departamento de Cardiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain
- ⁶ Unidad de Fisiología, Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá (IRYCIS), 28871 Alcalá de Henares, Spain
- * Correspondence: c.zaragoza.prof@ufv.es



Citation: Hernandez-Navarro, I.; Botana, L.; Diez-Mata, J.; Tesoro, L.; Jimenez-Guirado, B.; Gonzalez-Cucharero, C.; Alcharani, N.; Zamorano, J.L.; Saura, M.; Zaragoza, C. Replicative Endothelial Cell Senescence May Lead to Endothelial Dysfunction by Increasing the BH2/BH4 Ratio Induced by Oxidative Stress, Reducing BH4 Availability, and Decreasing the Expression of eNOS. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9890. <https://doi.org/10.3390/ijms25189890>

Academic Editor: Jeffrey L. Platt

Received: 2 August 2024

Revised: 9 September 2024

Accepted: 11 September 2024

Published: 13 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Vascular aging is associated with the development of cardiovascular complications, in which endothelial cell senescence (ES) may play a critical role. Nitric oxide (NO) prevents human ES through inhibition of oxidative stress, and inflammatory signaling by mechanisms yet to be elucidated. Endothelial cells undergo an irreversible growth arrest and alter their functional state after a finite number of divisions, a phenomenon called replicative senescence. We assessed the contribution of NO during replicative senescence of human aortic (HAEC) and coronary (CAEC) endothelial cells, in which accumulation of the senescence marker SA- β -Gal was quantified by β -galactosidase staining on cultured cells. We found a negative correlation in passaged cell cultures from P0 to P12, between a reduction in NO production with increased ES and the formation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (ONOO⁻) species, indicative of oxidative and nitrosative stress. The effect of ES was evidenced by reduced expression of endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), Interleukin Linked Kinase (ILK), and Heat shock protein 90 (Hsp90), alongside a significant increase in the BH2/BH4 ratio, inducing the uncoupling of eNOS, favoring the production of superoxide and peroxynitrite species, and fostering an inflammatory environment, as confirmed by the levels of Cyclophilin A (CypA) and its receptor Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer (EMMPRIN). NO prevents ES by preventing the uncoupling of eNOS, in which oxidation of BH4, which plays a key role in eNOS producing NO, may play a critical role in launching the release of free radical species, triggering an aging-related inflammatory response.

Keywords: endothelial senescence (ES); nitric oxide (NO); endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling; tetrahydrobiopterin (BH4); oxidative stress; inflammation; Cyclophilin A (CypA); extracellular matrix metalloprotease inducer (EMMPRIN)

1. Introduction

Endothelial dysfunction (ED) is an early indicator of vascular disease and can precede the development of several cardiovascular complications, including hypertension,

Producción científica durante el desarrollo de la presente tesis doctoral:

Ramirez-Carracedo, R., Sanmartin, M., Ten, A., **Hernandez, I.**, Tesoro, L., Diez-Mata, J., Botana, L., Ovejero-Paredes, K., Filice, M., Alberich-Bayarri, A., Martí-Bonmatí, L., Largo-Aramburu, C., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2022). Theranostic Contribution of Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer-Paramagnetic Nanoparticles Against Acute Myocardial Infarction in a Pig Model of Coronary Ischemia-Reperfusion. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 15(6), E013379. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.121.013379>

Ramirez-Carracedo, R., Tesoro, L., **Hernandez, I.**, Diez-Mata, J., Piñeiro, D., Hernandez-Jimenez, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2020). Targeting tlr4 with aptoll improves heart function in response to coronary ischemia reperfusion in pigs undergoing acute myocardial infarction. *Biomolecules*, 10(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biom10081167>

Reventun, P., Sánchez-Esteban, S., Cook-Calvete, A., Delgado-Marín, M., Roza, C., Jorquera-Ortega, S., **Hernandez, I.**, Tesoro, L., Botana, L., Zamorano, J. L., Zaragoza, C., & Saura, M. (2023). Endothelial ILK induces cardioprotection by preventing coronary microvascular dysfunction and endothelial-to-mesenchymal transition. *Basic Research in Cardiology*, 118(1). <https://doi.org/10.1007/s00395-023-00997-0>

Tesoro, L., **Hernandez, I.**, Saura, M., Bedimon L., & Zaragoza, C. (2024). Novel cutting edge nano-strategies to address old long-standing complications in cardiovascular diseases. A comprehensive review. *European Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1111/ECI.14208>

Tesoro, L., Ramirez-Carracedo, R., **Hernandez, I.**, Diez-Mata, J., Pascual, M., Saura, M., Sanmartin, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2021). Ivabradine induces cardiac protection by preventing cardiogenic shock-induced extracellular matrix degradation. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 74(12), 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2020.09.012>

Ramírez-Carracedo, R., **Hernández, I.**, Moreno-Gómez-Toledano, R., Díez-Mata, J., Tesoro, L., González-Cucharero, C., Jiménez-Guirado, B., Alcharani, N., Botana, L., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2024). NOS3 prevents MMP-9, and MMP-13 induced extracellular matrix proteolytic degradation through specific microRNA-targeted expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in hypertension-related atherosclerosis. *Journal of Hypertension*, 42(4), 685–693. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003679>

Tesoro, L., **Hernández, I.**, Ramírez-Carracedo, R., Díez-Mata, J., Alcharani, N., Jiménez-Guirado, B., Ovejero-Paredes, K., Filice, M., Zamorano, J. L., Saura, M., Zaragoza, C., & Botana, L. (2022). NIL10: A New IL10-Receptor Binding Nanoparticle That Induces Cardiac Protection in Mice and Pigs Subjected to Acute Myocardial Infarction through STAT3/NF- κ B Activation. *Pharmaceutics*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102044>

