



Papel del receptor *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) en la isquemia y fisiopatología cardiovascular

Roi Cal Pérez-Quevedo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia

-PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA-

**PAPEL DEL RECEPTOR *LOW DENSITY*
LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 1
(LRP1) EN LA ISQUEMIA Y
FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR**

ROI CAL PÉREZ-QUEVEDO

TESIS DOCTORAL
Barcelona, Enero 2013

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia

-PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA-

La presente tesis doctoral: “Papel del receptor *low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)* en la isquemia y fisiopatología cardiovascular”, ha sido realizada en el Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona por el licenciado en biología Roi Cal Pérez-Quevedo para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona bajo la dirección de la doctora Vicenta Llorente Cortés.

La directora: Vicenta Llorente Cortés

El doctorando: Roi Cal Pérez-Quevedo

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	19
1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	21
1.1 FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	22
2. ATEROSCLEROSIS Y TROMBOSIS	23
2.1 LA PARED VASCULAR	24
2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS	25
3. LIPOPROTEÍNAS	31
3.1 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS	32
3.2 HIPERLIPIDEMIA	37
4. RECEPTORES LIPOPROTEICOS	41
4.1 RECEPTORES <i>SCAVENGER</i>	41
5. EL MIOCARDIO Y SU CONTRACCIÓN	50
5.1 ORGANIZACIÓN DEL MÚSCULO CARDIACO	50
5.2 LA CONTRACCIÓN CARDIACA	51
6. METABOLISMO LIPÍDICO DE LOS CARDIOMIOCITOS	55
6.1 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS.....	55
6.2 METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	56
6.3 ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN EL CORAZÓN.....	57
7. ATEROSCLEROSIS E ISQUEMIA CARDIACA.....	60
7.1 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR LA HIPOXIA (HIF).....	61
7.2 HIPÓXIA MIOCÁRDICA.....	62
7.3 ALTERACIONES EN EL MANEJO DEL CALCIO Y LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL EN EL MIOCARDIO ISQUÉMICO.....	63
7.4 ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN EL MIOCARDIO ISQUÉMICO	64

MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. CULTIVOS CELULARES	69
1.1 CARDIOMIOCITOS HL-1	69
1.2 CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DE RATA NEONATA (NRVM)	70
1.3 TRATAMIENTOS.....	71
2. MODELO PORCINO IN VIVO DE ISQUEMIA MIOCÁRDICA	72
3. TEJIDO MIOCÁRDICO HUMANO	73
4. LÍPOPROTEÍNAS.....	74
4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS HUMANAS	74
4.2 MODIFICACIÓN DE LAS LDL POR AGREGACIÓN	77
4.3 ACUMULACIÓN LIPÍDICA INTRACELULAR.....	77
4.4 MARCAJE RADIOACTIVO DE VLDL HUMANAS	79
4.5 MARCAJE DE VLDL HUMANAS CON DII.....	80
5. BIOLOGÍA CELULAR.....	80
5.1 GENERACIÓN DE CARDIOMIOCITOS DEFICIENTES EN LRP1	80
5.2 ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE GLUTAMINA EN HL-1	82
5.3 DETECCIÓN DE CÉLULAS HL-1 APOPTÓTICAS	83
5.4 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS	83
5.5 ESTUDIO DEL MANEJO INTRACELULAR DEL CALCIO	84
6. BIOLOGÍA MOLECULAR	86
6.1 SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA DE HIF-1 α EN CÉLULAS HL-1	86
6.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE SECUENCIAS HRE EN CONSTRUCCIONES DEL PROMOTOR DEL LRP1 PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA	87
6.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA	88

OBJETIVOS	95
ARTÍCULOS	101
ARTÍCULO 1	103
ARTÍCULO 2	129
ARTÍCULO 3	143
DISCUSIÓN GLOBAL	175
APÉNDICE	191
BIBLIOGRAFÍA	195

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABCA-1	Receptor <i>ATP-binding cassette</i> 1
ACAT	Acil CoA colesterol acil transferasa
AG	Ácido graso
Apo	Apolipoproteína
Apo ER2	Receptor 2 de la apolipoproteína E
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Accidente vascular cerebral
BCA	Ácido bicinconánico
BSA	Albúmina de suero bovino
CCF	Cromatografía en capa fina
CE	Éster de colesterol o colesterol esterificado
CEPT	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
CSPG	Proteoglicano condroitín sulfato
Ct	<i>Threshold cycle</i> (ciclo umbral)
Cx	Conexina
DHPR	Canal de calcio tipo L o receptor de dihidropiridina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSPG	Proteoglicano dermatán sulfato
ECG	Electrocardiograma
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPO	Eritropoyetina
FBS	Suero bovino fetal
FT	Factor tisular
h	Hora
HDL	Lipoproteína de alta densidad
Hg	Mercurio
HIF	Factor de transcripción inducible por la hipoxia

ABREVIATURAS

HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A
HRE	Elemento de respuesta a la hipoxia
HSPG	Proteoglicano heparán sulfato
ICM	Cardiomiopatía isquémica
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
LCAT	Lecitina colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLag	LDL agregadas
LDLn	LDL nativa
LDLR	Receptor de las LDL
LPL	Lipoproteína lipasa o lipasa lipoproteica
LPS	Lipopolisacarido
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDA	Malondialdehido
MEGF7	<i>Multiple epidermal growth factor-like domains 7</i>
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteasa de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
NCX	Sistema de intercambio Na^+ - Ca^{2+} del sarcolema
NF-κb	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico

ABREVIATURAS

NRVM	<i>Neonatal Rat Ventricular Myocyte</i> (Cardiomiocito ventricular de rata neonata)
O₂	Oxígeno
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Proteoglicano
PHD	Prolil hidrolasa dependiente de oxígeno
PKA	Proteína quinasa A
QM	Quilomicrón
Q-RT-PCR	PCR a tiempo real (cuantitativa)
QSPG	Proteoglicano queratán sulfato
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reverso transcripción-Reacción en cadena de la polimerasa
RyR	Receptor de rianodina
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SERCA	ATPasa del retículo sarcoplásmico que transfiere Ca ²⁺
siRNA	<i>Small interference</i> RNA (pequeño RNA de interferencia)
SR	Retículo sarcoplásmico
SREBP	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides
T.A.	Temperatura Ambiente
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicérido
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T- <i>helper</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Proteína de adhesión de células vasculares 1

ABREVIATURAS

VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VLDLR	Receptor de las VLDL
VSMC	Célula muscular lisa de pared vascular

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), es decir, del corazón y de los vasos sanguíneos, son hoy por hoy según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2008 murieron por esta causa 17,3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo, y se prevé que en 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías coronarias y accidentes cerebro vasculares (AVC).

En España, según el Instituto Nacional de Estadística (INE), las patologías cardiovasculares continúan siendo la principal causa de muerte a pesar de que su incidencia haya bajado respecto a datos de 2009 debido a una mayor conciencia social respecto a los factores de riesgo y a las mejoras médicas respecto a los tratamientos [1].

Los ataques al corazón y los accidentes cerebro vasculares (AVC) suelen ser fenómenos que se deben sobre todo a obstrucciones del flujo sanguíneo hacia el corazón o el cerebro, y la causa más frecuente es por la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos. Pero además de las cardiopatías coronarias y AVC existen otras ECV como son la arteriopatía periférica, la cardiopatía congénita, la cardiopatía reumática y la trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

1.1 FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Las ECV son enfermedades multifactoriales para las que se han descrito un gran número de factores de riesgo asociados con su prevalencia. Las causas más importantes de cardiopatía y AVC son una alimentación no saludable, la inactividad física, el consumo de tabaco y el consumo abusivo de alcohol [2]. Todos estos factores de riesgo son modificables y por tanto prevenibles, y además son responsables de aproximadamente un 80% de los casos de cardiopatía coronaria y enfermedad cerebrovascular. Existen otros factores de riesgo modificables importantes como son la elevada presión sanguínea, asociada con ictus, la obesidad y la diabetes. Factores sociales y de comportamiento como la depresión, el estrés e incluso el nivel socioeconómico bajo aumentan también el riesgo de sufrir ECV.

Los niveles plasmáticos elevados de colesterol procedente de LDL habitualmente se asocian con niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y constituyen el principal factor de riesgo cardiovascular [3-5]. A la vez, altos niveles de triglicéridos en plasma también se asocian con enfermedad arterial coronaria [6, 7]. Además patologías como la diabetes y la obesidad se asocian también con problemas de hiperlipidemias que aumentan el riesgo de ECV.

Existen otros factores de riesgo clasificados como no modificables que también juegan un rol importante en el desarrollo de una ECV como son la edad avanzada, la heredabilidad por parte de algún pariente directo con ECV, el sexo y la raza o etnia.

2. ATEROSCLEROSIS Y TROMBOSIS

Arteriosclerosis es el término general que se utiliza para abarcar diversas enfermedades caracterizadas por el remodelado y engrosamiento de las paredes arteriales que pierden así su elasticidad. La más prevalente de estas enfermedades es la aterosclerosis, donde especialmente en arterias de mediano y gran calibre se produce la disfunción del endotelio debido a una lesión inicial que altera su permeabilidad y que permite la difusión pasiva al espacio subendotelial de material lipídico, tejido fibroso, depósitos de calcio y otros productos sanguíneos [8]. Esto provoca la formación de la placa de ateroma mediante un engrosamiento de la capa íntima de las arterias y una disminución del diámetro del lumen arterial.

Las lesiones ateroscleróticas progresan de forma asintomática durante décadas haciendo que estos vasos se vuelvan menos flexibles y reduciendo aún más el lumen arterial con lo que disminuye el flujo sanguíneo pudiendo llegar a ocasionar episodios isquémicos locales ó distales de la zona de estrechamiento, ya sea en el corazón (arterias coronarias), en el cerebro (carótidas, cerebrales y vertebrales) o en las extremidades inferiores (aorta, iliaca y femorales). Los episodios donde se reduce la luz del vaso drásticamente por erosión de la placa o rotura y la formación de un trombo por efecto de la exposición a ciertos factores procoagulantes al torrente sanguíneo, tienen repercusiones clínicas tan importantes como el infarto de miocardio y cerebral o la claudicación y gangrena de las extremidades inferiores [9].

El concepto de aterotrombosis, engloba las dos manifestaciones, tanto el remodelado y engrosamiento de la pared arterial con formación de placas de ateroma, como la formación del trombo por rotura de la placa, mostrando los ligadas que se hayan en la enfermedad vascular.

INTRODUCCIÓN

En el corazón, la aterosclerosis en las arterias coronarias y los trombos según ocluyan de forma transitoria o de forma estable, pueden producir eventos isquémicos provocando anginas de pecho o infartos agudos de miocardio. Además, la reducción del suministro de oxígeno y nutrientes en la pared de las arterias coronarias y en el tejido cardíaco puede generar necrosis y alteraciones en el metabolismo celular.

2.1 LA PARED VASCULAR

La estructura de la pared arterial normal está compuesta por tres capas: íntima, media y adventicia (Figura 1.).

La capa más interna de la arteria es la capa íntima y está constituida por una monocapa de células endoteliales, que revisten la luz del vaso llamada endotelio, y una matriz subendotelial, compuesta principalmente por proteoglicanos y colágeno. Debajo, la capa íntima está rodeada por una lámina elástica interna. El endotelio funciona como una barrera selectiva al ser una capa semipermeable manteniendo la homeostasis vascular, regulando el intercambio de moléculas y el tono vascular [10].

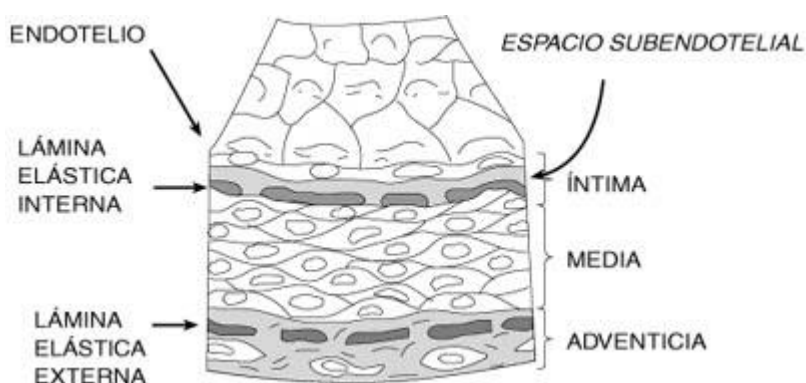


Figura 1. Esquema de la estructura de la pared vascular. [11].

Más externa que la íntima y separada de ella por la lámina elástica interna se encuentra la capa media, que está compuesta por células musculares lisas vasculares (VSMC). Esta capa también está formada por una matriz extracelular compuesta por colágeno, elastina y proteoglicanos que rodea las células. Las células VSMC se encargan de mantener el tono vascular y sostener la pared arterial. Esta capa está limitada exteriormente por la lámina elástica externa que permite el paso en ambas direcciones.

La adventicia es la capa más externa y está formada por fibroblastos, colágeno, proteoglicanos y algunas VSMC. A esta capa de tejido conjuntivo llegan los vasos sanguíneos para el aporte de nutrientes y el metabolismo de la pared.

2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

El origen y las causas de la enfermedad aterosclerótica han intentado ser explicados a lo largo del tiempo mediante diferentes teorías e hipótesis como la hipótesis trombogénica o la hipótesis lipídica. Actualmente la hipótesis de respuesta crónica al daño formulada por Ross y Glomset en 1976 es la más extendida. Ésta hipótesis explica la aparición de las lesiones ateroscleróticas como consecuencia a una lesión en el endotelio vascular [11, 12].

Hoy en día, los investigadores están de acuerdo en que los factores claves en el desarrollo y progresión de la enfermedad aterotrombótica son la inflamación crónica, la disfunción endotelial y la hiperlipidemia [13, 14].

2.2.1 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial está determinada por la aparición y exposición continuada a distintos factores que pueden alterar la homeostasis y la función normal del endotelio. La disfunción aparece a nivel local principalmente en zonas donde hay cambios de velocidad y turbulencia del torrente sanguíneo, así como estrés oxidativo, y se promueve por la presencia de factores de riesgo cardiovascular como el tabaco, la hipertensión o los altos niveles de colesterol en sangre [15].

La pérdida de la función del endotelio se caracteriza por un incremento en la permeabilidad del mismo, la producción de citoquinas, la disminución de la producción del vasodilatador óxido nítrico (NO) y el incremento en la síntesis de vasoconstrictores como la endotelina-1 o la angiotensina II. Debido a la disfunción también las lipoproteínas circulantes se infiltran en la íntima y pueden sufrir procesos de modificación. La reducción de la biosíntesis del vasodilatador NO además, impide la inhibición por parte de esta molécula de eventos clave en el desarrollo de la aterosclerosis como la adhesión y agregación de plaquetas, adhesión y migración de leucocitos y células musculares, originando procesos inflamatorios que si no se neutralizan continuarán indefinidamente [16-18].

2.2.2 INICIO DE LA LESIÓN

La lesión aterosclerótica comienza como una estría grasa o depósito inicial de lípidos y células blancas en la zona de la íntima arterial debido al aumento en la permeabilidad del endotelio (Figura 2.) [19]. Los lugares donde se interrumpe el flujo normal sanguíneo debido a una curvatura o ramificación arterial suelen presentar mayor predisposición a la disfunción endotelial y a la formación de lesiones ya que las modificaciones del flujo que presentan provocan un aumento de las moléculas de adhesión endotelial [20]. La disfunción del endotelio permite el

paso de las LDL circulantes al espacio subendotelial, donde retenidas por la acción de los proteoglicanos de la matriz extracelular [21], sufren modificaciones como la oxidación o agregación. Entre otras cosas, las LDL modificadas además estimulan la producción de citoquinas y quimioatrayentes por las células endoteliales, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) o la IL-8 [22-24], que median una respuesta inflamatoria que produce la migración de los leucocitos, como los monocitos o los linfocitos T, hacia el espacio subendotelial. Los linfocitos T migran tras un posible contacto con células dendríticas en los nódulos linfáticos locales que les presentan antígenos relacionados con la aterosclerosis [25]. En modelos animales también se observó que dietas ricas en colesterol y triglicéridos promueven la inflamación al inducir VCAM-1, importante molécula de adhesión para monocitos y linfocitos T en las placas de ateroma nacientes [26].

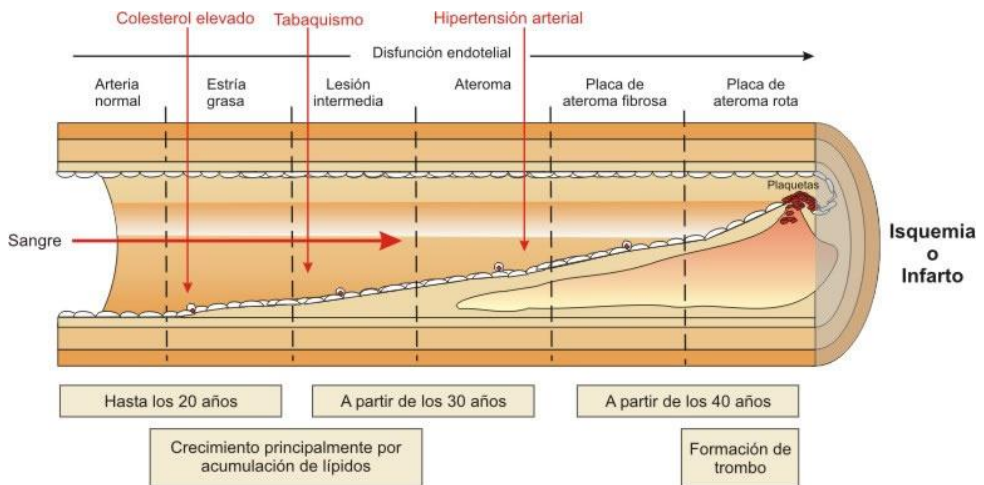


Figura 2. Inicio y progresión de la lesión aterosclerótica.

Los monocitos en la íntima se diferencian a macrófagos, por la presencia de moléculas como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) [27, 28], que internalizan y acumulan el colesterol esterificado (CE) de lipoproteínas modificadas a través de sus receptores *scavenger*, como *scavengerA* y CD36, que los convierten en células espumosas [29]. Además los macrófagos maduros

incrementan también la expresión de receptores *Toll-like* que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y estimulan respuestas inflamatorias [30]. Las células espumosas secretan citoquinas proinflamatorias (interleuquinas IL-1 β e IL-6, y el factor de necrosis tumoral (TNF)), mediadores vasoactivos (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) que perpetúan el proceso inflamatorio local [31].

Los linfocitos T en la íntima interaccionan con los macrófagos que les presentan antígenos. Pueden reconocer patrones derivados de lipoproteínas modificadas y asumir entonces dos tipos de activación, proinflamatoria o antiinflamatoria. La activación proinflamatoria es llevada a cabo por los linfocitos *T-helper* 1 (Th1) que suelen predominar en las lesiones ateroscleróticas [32] pues pueden migrar y activar macrófagos mediante la secreción de interferón γ (IFN- γ) para promover la inflamación. Por el contrario las citoquinas IL-4 e IL-13 propias de los linfocitos *T-helper* 2 (Th2) inducirían una activación alternativa de los macrófagos de carácter antiinflamatorio.

La progresión de la placa de ateroma vendrá controlada por el balance entre actividad proinflamatoria y antiinflamatoria pues a pesar de la importancia de las citoquinas proinflamatorias en la aterogénesis existen otras citoquinas como la IL-10 [33] o el TGF- β [34] que presentan actividad antiinflamatoria y son producidos por los linfocitos T-reguladores así como los anticuerpos con actividad antiaterosclerótica producidos por los linfocitos B [35].

2.2.3 PROGRESIÓN DE LA LESIÓN

La estría grasa evoluciona y progresa a placa de ateroma si los factores que promueven su formación persisten, principalmente la inflamación, la migración de las VSMC y la acumulación lipídica en macrófagos y VSMC.

La presencia de células espumosas y lipoproteínas en la pared vascular desencadena mecanismos inmunitarios como el reclutamiento de linfocitos T que perpetúan la respuesta inflamatoria gracias a la liberación de citoquinas, metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP) y factores procoagulantes como el factor tisular (FT) [36].

Las VSMC migran hacia la íntima, inducidas también por las citoquinas de las células proinflamatorias, y proliferan generando matriz extracelular (colágeno, glucoproteínas, proteoglicanos y elastina [37] en el subendotelio y formando una capa fibrosa [38]. La migración de las VSMC también está favorecida por las MMP que secretan los macrófagos que eliminan la barrera de la lámina basal [39]. La matriz extracelular generada favorece además la retención y modificación de las lipoproteínas, que las VSMC captan y acumulan en su interior convirtiéndose en células espumosas [40]. Además la sobreexpresión de ciertos receptores por parte de las VSMC las lleva a captar LDL agregadas (LDLag) a través del receptor de las LDL-1 (LRP1) [41] o las LDL oxidadas (LDLox) a través del receptor de las LDLox tipo lectinas-1 (LOX-1) [42]. Pese a contribuir a la formación del núcleo lipídico al internalizar el colesterol de las lipoproteínas, las VSMC también presentan un papel estabilizador de la placa importante al producir una cápsula fibrosa alrededor del núcleo lipídico que lo puede proteger de rotura [43]. Por otro lado la proliferación y síntesis de tejido conectivo disminuye la luz del vaso. Las VSMC producen MMP que degradan la matriz extracelular y permiten la migración y proliferación de las VSMC.

2.2.4 COMPLICACIÓN DE LA LESIÓN

El proceso aterosclerótico se complica con la posible rotura de la placa de ateroma dando lugar a la liberación del material del núcleo lipídico, que es altamente trombogénico, al torrente sanguíneo [8].

INTRODUCCIÓN

La estabilidad de la placa está comprometida a su composición. Las que presentan mayor contenido en lípido son las que presentan más complicaciones clínicas al resultar menos estables pues cuanto mayor es el componente lipídico de la placa, menor es el grosor de la cubierta fibrosa, aumentando así su vulnerabilidad [44]. Sin embargo las que presentan menor contenido lipídico suelen ser más fibrosas y por tanto de mayor resistencia a rotura.

Si la rotura de la placa ocurre, se activa la vía extrínseca de la coagulación que rápidamente inicia la adhesión y activación plaquetar sobre la lesión, desencadenando un trombo. El trombo es una estructura heterogénea compuesta entre otras cosas por fibrina, eritrocitos, plaquetas, leucocitos e incluso restos de células apoptóticas procoagulantes. La rotura puede ser oclusiva y tener consecuencias clínicas al producir procesos isquémicos en diferentes órganos, o ser no oclusiva y asintomática pudiendo llegar a reabsorberse el trombo mediante un trombolisis endógena donde las VSMC proliferan y generan matriz extracelular dando a la lesión un carácter más fibroso y haciéndola más estable [36].

3. LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares compuestos por una parte lipídica y una parte proteica (apolipoproteína) que se encargan de transportar lípidos en la sangre por el organismo. Son estructuras esféricas formadas por un núcleo interno hidrófobo de colesterol esterificado (CE) y triglicéridos (TG), y una cubierta externa compuesta por fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas. Las diferentes apoproteínas tienen un papel muy importante en el metabolismo lipídico, pues aparte de estabilizar los lípidos en un entorno acuoso como es la sangre, sirven para que los diferentes receptores lipoproteicos reconozcan e identifiquen las lipoproteínas (Figura 3.).

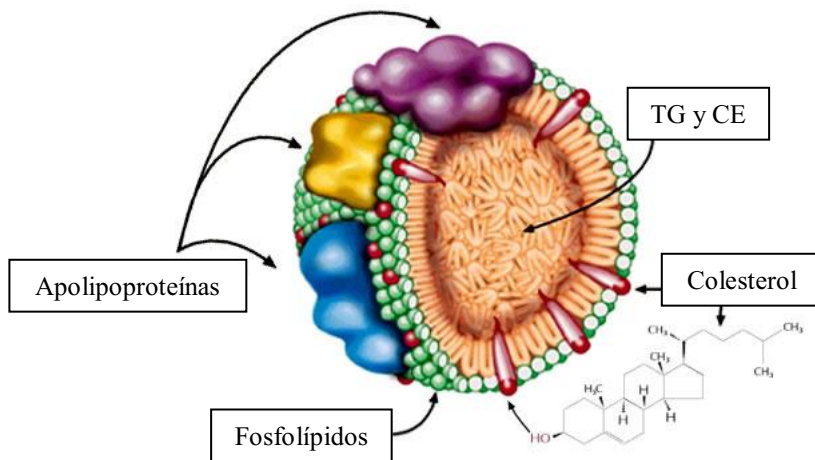


Figura 3. Composición y estructura de una lipoproteína. Los fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas se localizan en el exterior de la partícula. En el interior se encuentran los triglicéridos y ésteres de colesterol.

Existen cuatro tipos principales diferentes de lipoproteínas según su composición lipídica y proteica, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones (QM). Aunque existe un quinto tipo de lipoproteína con densidad intermedia (IDL), habitualmente se engloba dentro de las VLDL. Los dos tipos de

INTRODUCCIÓN

lipoproteínas más abundantes en el plasma son las LDL y las HDL, que se encargan de la mayor parte del transporte de colesterol. Los QM y las VLDL son las principales lipoproteínas transportadoras de TG (Tabla 1.).

FRACCIÓN	QM	VLDL	LDL	HDL
APOLIPOPROTEINAS	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E
%	2	7	21	46
TRIGLICÉRIDOS %	81	52	9	8
COLESTEROL %	9	22	47	19
FOSFOLÍPIDOS %	8	19	23	27
DIÁMETRO (mm)	Hasta 500	25-70	20-25	8-11
DENSIDAD (g/mL)	<0,96	0,96-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
ORIGEN	Lípidos de la dieta	Lípidos hepáticos	A partir de las VLDL	Lípidos de los tejidos
FUNCIÓN	Transporta los TG de la dieta	Transporta los TG sintetizados por el hígado	Transporta el colesterol a tejidos periféricos	Transporte reverso del colesterol al hígado

Tabla 1. Clasificación, composición y función de las lipoproteínas.

3.1 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

El metabolismo de las lipoproteínas puede ser a través de dos vías diferentes: exógena y endógena. La vía exógena se encarga de la captación de los lípidos procedentes de la dieta y de su distribución a los diferentes tejidos del organismo. La vía endógena, por su parte, es la responsable del transporte de los lípidos sintetizados por el propio organismo en estado de ayuno.

3.1.1 QUILOMICRONES

Los lípidos procedentes de la dieta, tras ser hidrolizados parcialmente por enzimas lipolíticas en la luz del intestino, son absorbidos por las células intestinales o enterocitos y empaquetados en QM. Estas partículas de gran tamaño, principalmente formadas por triglicéridos de origen exógeno, se secretan en un

primer momento al sistema linfático y posteriormente entran en la circulación sanguínea [45, 46]. Los QM secretados presentan apo B-48 y apo A, y en circulación adquieren apo C y apo E de las HDL.

En los tejidos, la enzima lipoproteína lipasa (LPL) endotelial hidroliza los TG, procedentes de los QM, liberando los ácidos grasos (AG) [47] que atraviesan el endotelio y son captados por las células como fuente de energía (corazón y músculo esquelético) o para su almacenamiento (tejido adiposo) (Figura 4.) [45]. La internalización celular de AG puede ocurrir a través de receptores, como el CD36 [48], o mediante difusión [45, 49, 50].

Como consecuencia de la hidrólisis de los TG, los QM se transforman en remanentes de QM, que presentan un tamaño menor y ceden apo A y C a las HDL. Además, los QM remanentes, a diferencia de los QM, están enriquecidos en CE, apo B48 y apo E. Los remanentes de quilomicrones finalizan su catabolismo en el hígado gracias a la lipasa hepática y la LPL que media la interacción entre los remanentes y sus receptores, entre los que están los proteoglicanos heparán sulfato (HSPG), el receptor de las LDL (LDLR, receptor de apo B-100 y apo E) y el *LDL receptor-related protein-1* (LRP1, receptor de apo E) [45, 51-54]. La apo E es esencial para el aclaramiento de remanentes por parte del hígado ya que en estudios con ratones apo E^{-/-} se observó una acumulación masiva de remanentes [55] y sus residuos con carga positiva facilitan su captación por los receptores hepáticos [45] [51, 56]. El receptor *scavenger-B1* participa también en el reconocimiento inicial de los remanentes de QM y facilita su captación e internalización por receptores como el LDLR (Figura 5.) [57, 58].

3.1.2 LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD (VLDL)

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se generan en el hígado [59] y son las responsables del transporte de lípidos de síntesis endógena en el hígado. Las VLDL se caracterizan por la apolipoproteína principal que las forma, la apo B-100 y su componente lipídico fundamental, los TG. Las VLDL secretadas a la circulación desde el hígado adquieren apo C y apo E de las HDL, al igual que los QM, y transportan sus TG hacia los tejidos extrahepáticos donde serán hidrolizados a AG por la LPL endotelial [47] e internalizados en las células a través del receptor CD36 [48].

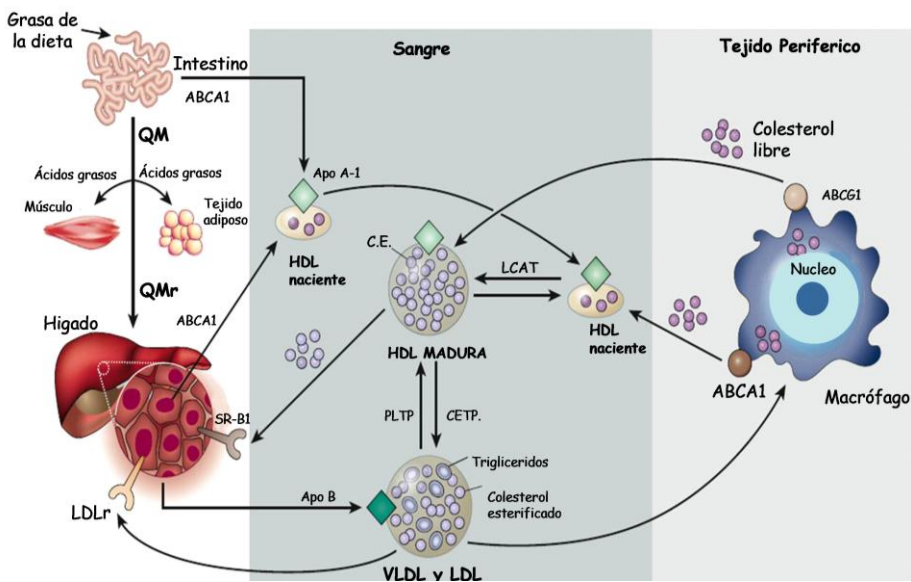


Figura 4. Esquema del metabolismo de las lipoproteínas. El intestino absorbe las grasas de la dieta y las empaqueta en forma de QM, que son transportados a los tejidos periféricos a través de la sangre. En el músculo y tejido adiposo la LPL hidroliza los QM a ácidos grasos para su captación. Los remanentes de QM son finalmente metabolizados en el hígado. Las VLDL son producidas en el hígado y transportan colesterol de síntesis endógena. Las VLDL se transformarán en LDL por medio de la LPL en tejidos extrahepáticos. Las LDL serán captadas por el hígado vía el LDLR. Las HDL generadas en el hígado captan colesterol en tejidos periféricos a través del transportador ABCA-1. El colesterol de las partículas HDL naciendo se esterifica por la acción de la LCAT, originando la HDL madura. Las HDL también transfieren colesterol a las VLDL y LDL con el enzima CETP. Finalmente las HDL son recaptadas por el hígado a través del receptor SR-BI [60].

Las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol (CEPT) median el intercambio de TG de las VLDL por CE de las HDL (Figura 4.). Además, las VLDL también ceden apo C a las HDL. La acción combinada de la LPL y de las CEPT transforma las VLDL en VLDL remanentes o lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Las IDL se encuentran enriquecidas en CE, y conservan la apo B-100, la apo C y la apo E. Una parte de estos remanentes atravesarán la barrera endotelial gracias a su pequeño tamaño y serán captados en el hígado, gracias a la apo E, mediante los receptores LDLR, LRP1, o los HSPG (Figura 5.) [56, 61], tal y como ocurría con los remanentes de los QM, y otra parte seguirán en circulación, perderán la apo E y C y se harán más densas transformándose en LDL.

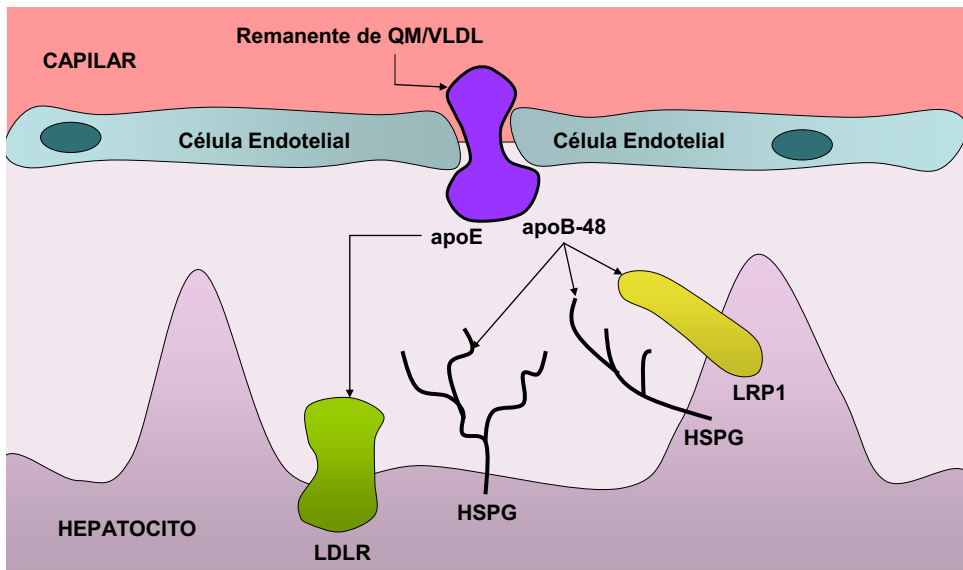


Figura 5. Esquema de la eliminación hepática de lipoproteínas remanentes. El ligando apo E permite que las lipoproteínas remanentes se una rápidamente al LDLR, al HSPG o a la colaboración HSPG-LRP1.

3.1.3 LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contienen sólo la apo B-100 como única apolipoproteína y son ricas en colesterol libre y colesterol esterificado. La mayoría de las células pueden sintetizar el colesterol, pero su producción se da a nivel hepático normalmente, desde donde es distribuido por las LDL al resto del organismo. Estas lipoproteínas, en condiciones normales, son captadas por las células a través del receptor de las LDL gracias a la apo B-100. La acumulación intracelular de colesterol está regulada en función de las necesidades de la célula. La captación de LDL por el LDLR, liberando el colesterol dentro de la célula, inhibe la síntesis endógena de colesterol mediante la inhibición de la HMG-CoA reductasa, y regulando a la baja la transcripción del LDLR para la autorregulación del contenido de colesterol celular. Dentro de la célula el colesterol libre promueve la actividad de la enzima acil-CoA colesterol acil transferasa (ACAT) que lo esterifica para su almacenamiento. Las LDL son finalmente eliminadas de la circulación al ser captadas, a través del LDLR, por el hígado [62, 63].

Existe una porción del colesterol LDL que sufre procesos de modificación que transforma las lipoproteínas. Estas modificaciones hacen que estas LDL modificadas sean captadas por receptores diferentes al LDLR y que no están regulados negativamente por el colesterol intracelular, jugando un papel crucial de patologías como la aterosclerosis.

3.1.4 LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son sintetizadas y secretadas en el hígado y en el intestino, y participan en el transporte reverso de colesterol desde los tejidos hasta el hígado [64]. En su forma naciente o inicial están constituidas por apo A-I, lecitinas y en menor proporción por colesterol y triglicéridos. Las HDL

nacientes se dirigen hacia los tejidos extrahepáticos para captar colesterol libre mediante el receptor ABCA-1 (*ATP-binding cassette-1*) e incrementar su tamaño. El colesterol recogido se esterifica por la acción de la enzima lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) y se acumula originando la HDL madura. El colesterol de las partículas HDL maduras puede regresar al hígado a través de su transferencia hacia las VLDL y LDL gracias a la CEPT, o mediante su captación selectiva por el receptor *scavenger*-B1 [65]. Una vez las HDL están libres de CE pueden comenzar el ciclo de nuevo.

3.2 HIPERLIPIDEMIA

Hoy en día, los investigadores están de acuerdo en que uno de los factores de riesgo en el desarrollo y progresión de la enfermedad aterotrombótica es la alteración de la homeostasis lipídica y la hiperlipidemia [13].

3.2.1 HIPERCOLESTEROLEMIA

La hipercolesterolemia es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular relacionado con la aterosclerosis. El organismo obtiene colesterol a través de dos vías: la vía exógena y la vía endógena. En la endógena, aunque la mayoría de las células pueden sintetizar colesterol, éste suele ser de origen hepático principalmente, y en la exógena proviene de los alimentos presentes en la dieta.

Las lipoproteínas LDL son las principales transportadoras de colesterol en el organismo y su concentración en plasma se correlaciona positivamente con la incidencia y riesgo de enfermedad cardiovascular [3-5]. De hecho, en modelos animales, la hipercolesterolemia es suficiente para inducir aterosclerosis sin necesidad de otros factores de riesgo adicionales [66, 67]. En condiciones de

hipercolesterolemia, las LDL se acumulan en la circulación sanguínea al estar cubiertas las necesidades celulares de colesterol.

Los niveles de colesterol intracelular se regulan negativamente por los factores de transcripción SREBP (*sterol regulatory element binding proteína*) [68]. Cuando el colesterol se acumula en las células, se inhibe la actividad de los SREBP y la transcripción de sus genes diana [69, 70]. El LDLR está regulado positivamente por los SREBP de tal forma que la acumulación de colesterol por las células inhibe la expresión del LDLR [71]. Por otro lado los SREBP regulan negativamente al receptor LRP1 [72], que es capaz de captar el CE de las lipoproteínas y acumularlo en el interior celular [73]. Debido a esto, en situaciones de hipercolesterolemia, la inhibición de los SREBP induce la sobreexpresión de receptores como el LRP1 que conlleva a una sobreacumulación de colesterol.

En el caso de las HDL, existe una relación inversa entre sus niveles plasmáticos y la incidencia de enfermedad arterial coronaria que podría deberse a su función de transporte reverso del colesterol, eliminándolo de los tejidos periféricos y transportándolo hacia el hígado [64].

3.2.2 HIPERTRIGLICERIDEMIA

El término hipertrigliceridemia se emplea para denominar el exceso de triglicéridos en sangre. La hipertrigliceridemia incrementa la acumulación en plasma de remanentes derivados del procesamiento lipolítico de las VLDL y los QM. Los remanentes son partículas ricas en colesterol extremadamente aterogénicas [55], cuya eliminación de la circulación depende del reconocimiento por receptores como los HSPG, el LDLR, o el LRP1 [46, 61]. Modelos animales deficientes en apo E presentan una acumulación de remanentes en plasma que induce la aterosclerosis

[66]. Además, la acumulación de los remanentes de QM y VLDL en la circulación [46] se asocia con el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular [47].

3.2.3 LDL MODIFICADAS

Existen un gran número de moléculas y enzimas capaces de llevar a cabo diferentes modificaciones de las partículas lipoproteicas. Las dos principales modificaciones identificadas en la pared arterial son la oxidación y la agregación de las LDL.

Las lipoproteínas LDL circulantes en la sangre pueden infiltrarse en la pared arterial y ser retenidas en la capa íntima por componentes de la matriz extracelular como los proteoglicanos (PG) [74]. Este nuevo ambiente promueve la modificación química de las lipoproteínas que principalmente se agregan u oxidan [75]. La agregación debe su existencia al efecto que ejercen los diferentes tipos de proteoglicanos (PG) de la matriz extracelular al interactuar electrostáticamente con las LDL. Los PG están formados por cadenas de glicosaminoglicanos y en función de éstas se clasifican en condroitín sulfato (CSPG), dermatán sulfato (DSPG), heparán sulfato (HSPG) y queratán sulfato (QSPG). Los glicosaminoglicanos de los PG presentes en la matriz extracelular poseen una elevada carga negativa que les permite interactuar con la apo B-100 de las lipoproteínas cargada positivamente, aumentando su tiempo de retención en la íntima arterial y fomentando la formación de agregados, con estructura y tamaño diferente a las formas nativas. Las enzimas de la íntima junto con los proteoglicanos, modifican el núcleo lipídico y proteico [75-77], facilitando no sólo la formación de los agregados, sino también la de los radicales libres, y la retención y oxidación de las LDL [78].

INTRODUCCIÓN

Las LDL modificadas son captadas por receptores *scavenger* que son capaces de internalizarlas en los macrófagos y las VSMC [75] en las placas en formación, originando células espumosas con un alto contenido lipídico intracelular que promueven el desarrollo de la lesión. Las VSMC procedentes de la capa media producen la mayor parte de los PG, colágeno y elastina de la matriz extracelular en la íntima durante la progresión de la placa. Nuestro grupo demostró que la interacción de las LDL con el versicán, uno de los principales CSPG de matriz, inducía a la fusión de las LDL [79] con características semejantes a las LDL agregadas (LDLag) obtenidas a través de agitación intensa (Figura 6.) [80]. También demostró que la exposición a LDLag en VSMC incrementa la expresión del receptor LRP1 [81] que capta el colesterol esterificado derivado de estas lipoproteínas modificadas [80] potenciando la sobreacumulación de lípido y originando la formación de células espumosas derivadas de las VSMC.

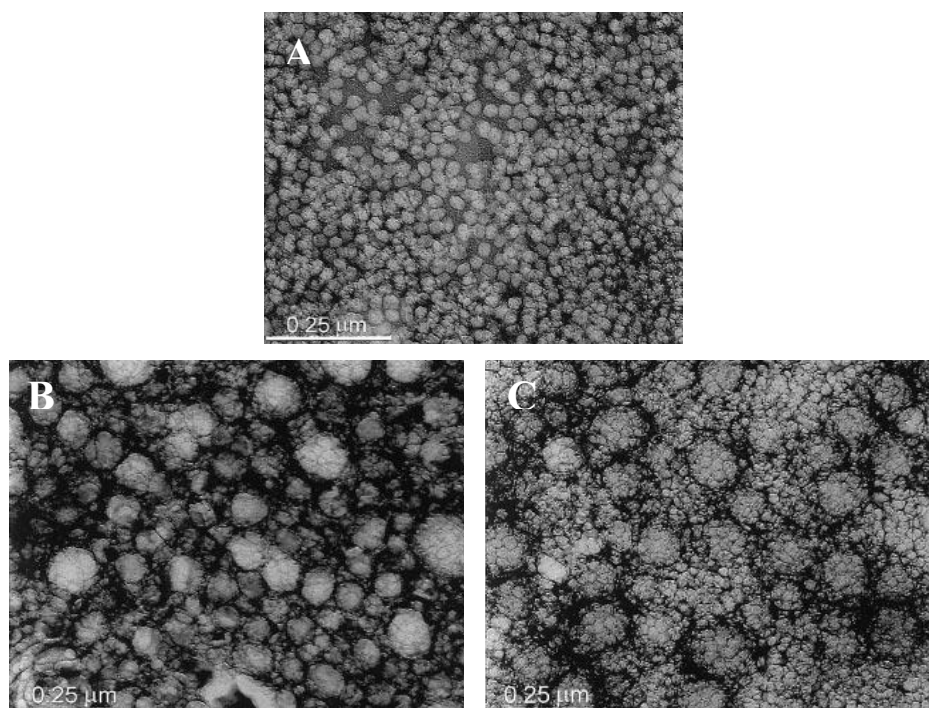


Figura 4. Modificaciones estructurales de las LDL. Diferencias estructurales entre LDL nativas (LDL_n) [A], LDLag (modificadas por agitación) [B] y LDLag (modificadas por contacto con versicán) [C] [80].

4. RECEPTORES LIPOPROTEICOS

La captación de lípido arterial se produce a través de al menos cuatro tipos de receptores: los receptores scavenger (ScR), el LRP1, el LDLr y el receptor de las VLDL. Todos salvo el receptor de LDL están sobrexpresados en la aterosclerosis. Mientras los ScR están principalmente sobrexpresados en macrófagos, el LRP1 está más implicado en la captación de lípido en VSMC [41, 82, 83].

4.1 RECEPTORES *SCAVENGER*

La familia de receptores *scavenger* consta de diferentes clases (A, B, C, D, E y F) y son capaces de reconocer una gran variedad de ligandos entre los que destacan LDL oxidadas, células apoptóticas y distintos patógenos. Las clases A, B y E se expresan de forma elevada en placas ateroscleróticas. El receptor CD36, receptor *scavenger* de clase B, destaca por su importante papel en la aterosclerosis y trombosis [84].

4.1.1 CD36

El CD36 es un receptor *scavenger* de tipo B que se encuentra como una proteína glicosilada en la membrana de distintos tipos celulares como las células endoteliales, las plaquetas, los adipocitos, los miocitos cardíacos y esqueléticos, los monocitos, los fagocitos, las células epiteliales intestinales, etc.

El CD36 tiene un papel muy importante en la captación de AG libres hacia el interior de las células. Ésta función tiene especial relevancia en el caso de los miocitos, donde sirve para aportar una fuente de energía vital para la β -oxidación, mientras que en los adipocitos sirve para la acumulación y reserva de lípidos [85].

Estudios llevados a cabo por Bharadwaj et al mostraron la participación de CD36 en la captación de TG procedentes de VLDL en el miocardio [86]. Además el CD36 también se sobreexpresa en hipoxia [87] y contribuye a la captación de ácidos grasos (AG) y acumulación de TG en situaciones de isquemia. Sin embargo Perman et al [88] afirmaron que el CD36 no juega ningún papel en la captación incrementada de TG en condiciones de hipoxia y señalaron al VLDLR como el receptor esencial para la acumulación de TG en cardiomiocitos hipóxicos.

En el sistema inmune innato median la captación y degradación de moléculas derivadas de patógenos, de lipoproteínas modificadas, y de componentes de superficie de células apoptóticas entre otras cosas.

En la aterosclerosis, el CD36 media la captación y degradación de lipoproteínas proaterogénicas como las LDL oxidadas [89] y está implicado en la formación de células espumosas al retroalimentarse positivamente su expresión en presencia de LDLn y modificadas [90]. Las LDL oxidadas además inducen la hiperactividad de las plaquetas en una vía de señalización dependiente del CD36, que promueve la trombosis [91]. Este receptor también está implicado en la retención de los macrófagos en la placa, al modular la dinámica del citoesqueleto [92]. Además, distintos estudios en modelos animales han demostrado que el CD36 se sobreexpresa a medida que la lesión aterosclerótica progresa [93].

4.1.2 RECEPTOR DE LAS LDL (LDLR)

En los años 70, Joseph L. Goldstein y Michael S. Brown identificaron el primer receptor lipoproteico, el receptor de las LDL (LDLR), por lo que recibieron el premio Nobel en 1985 [94]. El LDLR es un proteína de membrana con cinco dominios diferenciados, tres extracelulares, uno citoplasmático y otro de anclaje a la membrana. Aunque presenta afinidad por la apo E, el ligando principal del LDLR es

la apolipoproteína apo B-100, presente en las lipoproteínas VLDL y sobretodo en las LDL.

Salvo alguna excepción, todas las células tienen este receptor que les permite abastecerse de colesterol. El hígado es el órgano más importante en la eliminación de las LDL en plasma a través de la actividad del LDLR. Defectos en este receptor originan la denominada hipercolesterolemia familiar. Las estatinas son el principal fármaco utilizado para controlar los altos niveles elevados de colesterol plasmático. Estos fármacos inhiben competitivamente la HMG-CoA reductasa y por tanto la síntesis endógena de colesterol, que en consecuencia induce al alza la expresión del LDLR a través de los factores de transcripción SREBP. Pues tal y como se ha mencionado anteriormente, la acumulación de colesterol intracelular regula a la baja al LDLR a través de los factores SREBP [68]. En concreto, el SREBP-2 regula positivamente la expresión del LDLR [68, 71], y por eso la captación de LDLag en VSMC humanas, que inducen una alta acumulación de colesterol intracelular, reducen la expresión de SREBP-2 y del LDLR [81].

Existe otra serie de proteínas de membrana análogas al LDLR que constituyen la familia del receptor de las LDL [95]. Esta familia de glicoproteínas está formada por los receptores de membrana LDLR, VLDLR, LRP1, LRP1B, LRP2/Megalina, LRP3, LRP4/MEGF7 (*multiple epidermal growth factor-like domains 7*), LRP5, LRP6, LRP8/ApoER2 (receptor 2 de la apo E) y LR11/sorLA-1 (Figura 7.). Los receptores de esta familia presentan una funcionalidad y estructura semejantes pero con ligandos muy diferentes [96]. Además, la parte citoplasmática de los receptores les sirve en procesos de señalización intracelular tras la endocitosis de los ligandos. Todos los receptores tienen en común los ligandos apo E y RAP (Proteína Asociada al Receptor) [96].

INTRODUCCIÓN

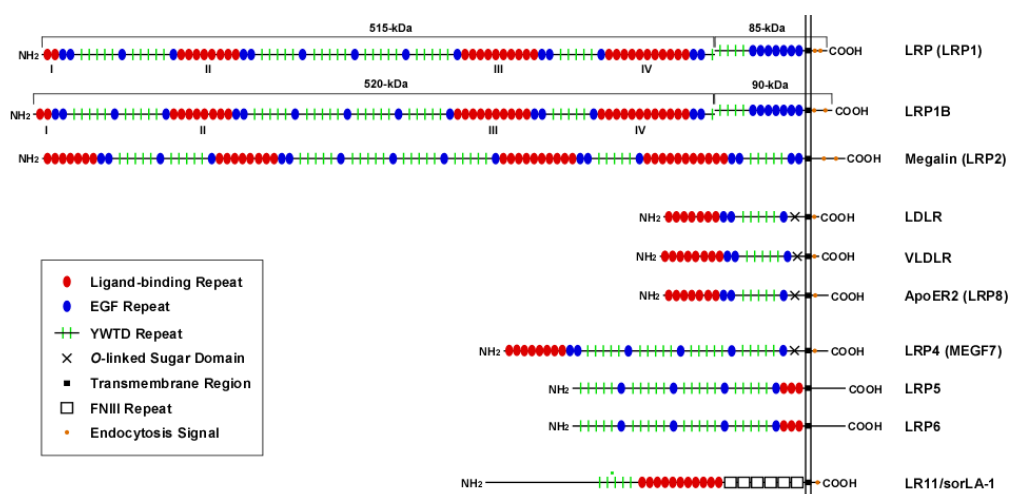


Figura 7. Familia de receptores de las LDL. [97].

4.1.3 RECEPTOR DE LAS VLDL (VLDLR)

El receptor de las VLDL (VLDLR) es una proteína de membrana que presenta una gran homología estructural con el LDLR. Se expresa de forma discreta en el hígado, pero lo hace principalmente en los tejidos extrahepáticos como el músculo, el corazón, el tejido adiposo o el cerebro.

Su ligando principal es la apo E y en menor medida también la apo B. Por ello, media la captación y eliminación de remanentes con apo B y apo E derivados de lipoproteínas ricas en TG. Estas lipoproteínas circulantes pierden TG por la acción de la LPL en los tejidos extrahepáticos, convirtiéndose en partículas remanentes más pequeñas que son endocitadas por el VLDLR a través de la apo E [98, 99]. La supresión del gen del VLDLR en animales conduce a un incremento en los TG plasmáticos

El VLDLR se expresa abundantemente en la pared vascular de células endoteliales, VSMC y macrófagos, tanto en vasos normales como en placas

ateroscleróticas [100]. También ha sido implicado en la acumulación de lípido y la formación de células espumosas derivadas de macrófagos [101, 102] y en el desarrollo de placa inducida por hipercolesterolemia [103]. Estos resultados junto al hecho de que su expresión no está regulada a la baja por los niveles de colesterol intracelular, sugieren su papel aterogénico facilitando la captación de lipoproteínas ricas en TG en la pared vascular [100].

4.1.4 LDL RECEPTOR-RELATED PROTEIN 1 (LRP1)

El *Low density lipoprotein receptor-related proteína 1* (LRP1) es un receptor transmembrana multiligando y multifuncional perteneciente a la familia del receptor de las LDL [104], que se identificó en 1988 por su gran expresión en el hígado y su estrecha similitud estructural y bioquímica con el LDLR [105].

El LRP1 se estructura en cuatro dominios extracelulares, un dominio transmembrana y otro dominio intracelular. Los dominios extracelulares están compuestos por repeticiones ricas en cisteínas y repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que se encuentran separados por regiones espaciadoras *β -propeller*. El LRP1 puede captar alrededor de 40 ligandos, principalmente a través de los dominios II y IV por las repeticiones de cisteínas (Figura 8.). Por ser multiligando, está implicado en numerosas funciones como el metabolismo lipídico, la homeostasis de proteasas y sus inhibidores, la activación de enzimas lisosomales o la transducción de señales a través de la unión de proteínas adaptadoras a la cola citoplasmática [106].

El LRP1 se sintetiza en el retículo endoplasmático (RE) como una proteína transmembrana glicosilada de unos 600 kDa. Una vez llega al aparato de Golgi sufre un corte proteolítico dando lugar a dos subunidades de 515 y 85 kDa que quedarán unidas por un enlace no covalente [107]. La proteína RAP, una chaperona del RE es

INTRODUCCIÓN

requerida para un correcto plegamiento y transporte del LRP1 a la membrana y para prevenir la unión prematura de determinados ligandos [108].

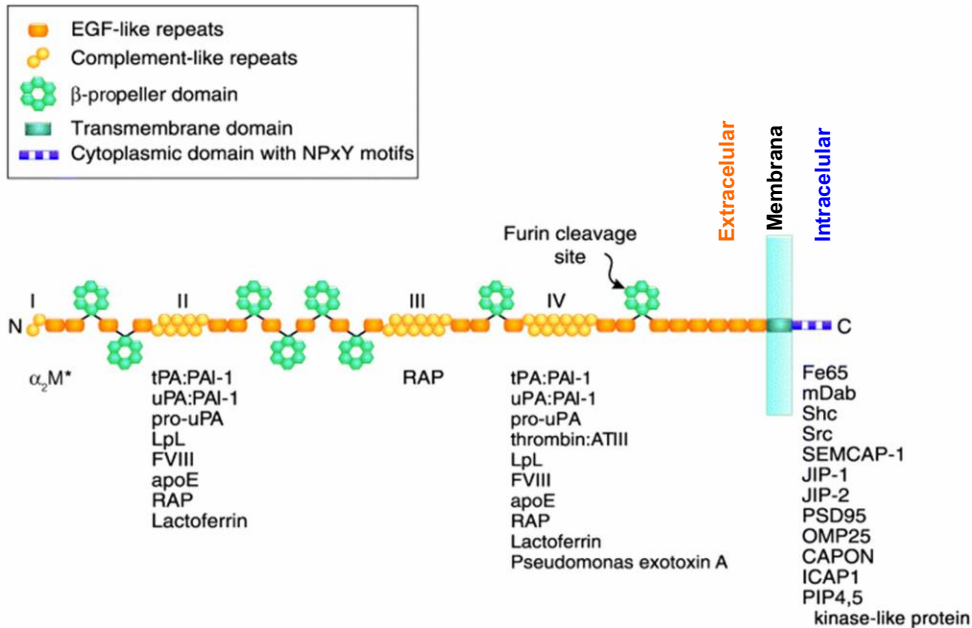


Figura 8. Estructura del receptor LRP1 en dominios. Los nombres de ligandos y proteínas adaptadoras aparecen debajo de cada dominio extracelular e intracelular.

Desde su hallazgo, el LRP1 es capaz de interactuar con una gran variedad de ligandos (Tabla 2.), involucrándolo en múltiples procesos biológicos [109]. Destaca el papel del LRP1 en la pared vascular, su implicación en la eliminación de lipoproteínas remanentes de la circulación hacia el hígado, así como sus contribuciones en diferentes aspectos de la función hepática, la respuesta inmune, la migración celular, la inflamación, la fagocitosis, la modulación de la barrera hematoencefálica, o la enfermedad de Alzheimer [104].

INTRODUCCIÓN

PROTEÍNAS DEL METABOLISMO PROTEICO	
Lipasa hepática	Lipoproteína lipasa
β -VLDL	Proteína activadora de esfingolípidos
Apolipoproteínas ricas en Apo-E (remanentes de QM y VLDL)	LDL agregadas
PROTEÍNAS INTRACELULARES	
RAP	Proteína Tat HIV
Calreticulina	
PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR	
Trombospondina-1, 2	Fibronectina
FACTORES DE CRECIMIENTO	
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)
Midkina	<i>Connective tissue growth factor</i> (CTGF)
PROTEASAS/COMPLEJO INHIBIDOR DE PROTEASAS	
APP- β	Proteasa/inhibidor de proteína C
MMP9, MMP13	Trombospondina 2 (TSP-2)/MMP2
α -2 Macroglobulina activada	TFPI
Aprotinina	fVIII/fVIIIa
<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i> (PAI-1)	<i>Tissue type plasminogen activator</i> (tPA), tPA/PAI-1
Pro-uPA (Urokinase plasminogen activator), uPA, uPA/PAI-1	Trombina/Heparina cofactor II
Trombina/PAI-1, Trombina/antitrombina III	Neuroserpina
Factor IXa	Elastasa/ α 1-antitripsina
Proteína precursora del β -amiloide	C1s/Inhibidor C1q
Factor IXa/proteasa nexin-1	Trombina/proteasa nexin-1
OTRAS	
Lactoferrina	Complemento C3
Gentamicina	Colectina (Vía calreticulina)
Polimixina B	Péptido β -amiloide
Ricina A	Proteína del Circunsporozoito
Exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>	Rinovirus
Saposina	

Tabla 2. Ligandos conocidos del LRP1 [104].

El LRP1, además de ser un receptor de membrana en la superficie celular, es un transductor de señales que se desplaza a las caveolas como respuesta a señales extracelulares [110] interactuando con proteínas adaptadoras citoplasmáticas que implican al LRP1 en distintas vías de señalización a través de su dominio citoplasmático [111].

Papel del LRP1 en la aterosclerosis

El LRP1 se encuentra altamente expresado en placas ateroscleróticas avanzadas de modelos animales [112] y humanos [113, 114], principalmente en VSMC y macrófagos. De acuerdo con estos trabajos nuestro grupo demostró que el LRP1 se sobreexpresaba en lesiones ateroscleróticas humanas en estado avanzado y ricas en lípido [115].

El papel proaterogénico del LRP1 está demostrado al ser las LDL modificadas por agregación (LDLag) uno de sus ligandos de captación selectiva en VSMC [80]. Este receptor es el responsable de la captación de colesterol esterificado, derivado de estas lipoproteínas modificadas [73]. Las LDLag *in vitro* [81] y la hipercolesterolemia *in vivo* [115] incrementan la expresión del LRP1 en las lesiones ateroscleróticas, y la internalización de las LDLag conduce a una importante acumulación lipídica intracelular que contribuye a la transformación de las VSMC en células espumosas [40].

En las VSMC humanas nuestro grupo también demostró que los factores de transcripción SREBP-1 y SREBP-2 (proteínas que se unen a los elementos regulados por esteroides) están involucrados en la regulación del LRP1. La captación de CE derivado de las LDLag *in vitro* y la hipercolesterolemia *in vivo* reducen los niveles del SREBP-2 y del LDLR, e incrementa la expresión del LRP1 [116]. Estos efectos se pueden prevenir manteniendo elevados los niveles de SREBP-2 [81].

Este receptor lipoproteico presenta también un papel importante en la aterotrombosis. Nuestro grupo demostró que el LRP1 al captar las LDLag en VSMC favorece la actividad procoagulante y la liberación del factor tisular en el núcleo lipídico de la placa, en forma de micropartículas [117, 118], el cual es altamente trombogénico [119].

También nuestro grupo demostró que la Angiotensina II (AngII), involucrada en el desarrollo de la aterosclerosis al ser un agente vasopresor que induce la infiltración lipídica en lesiones, incrementa la expresión del LRP1 en ausencia de LDL. El empleo de un antagonista del receptor de la angiotensina II o el silenciamiento del LRP1 consiguió prevenir la acumulación de colesterol intracelular [120].

A pesar de estos resultados que muestran al LRP1 con función proaterosclerótica, su inhibición podría ser letal puesto que se ha demostrado que este receptor juega un papel fundamental en la integridad de la pared vascular y en la proliferación y migración de las VSMC al inhibir la activación del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [104, 121]. La delección del LRP1 en macrófagos resultó en un incremento de las lesiones en diferentes modelos murinos de aterosclerosis sin llegar a alterar los perfiles lipídicos de los modelos [122, 123]. Este receptor también participa en la atenuación de la respuesta inflamatoria del TGF- β [124] y en la eliminación de la circulación del proaterogénico factor fVIII que daría explicación al papel ateroprotector del LRP1 en el hígado de modelos animales [125].

5. EL MIOCARDIO Y SU CONTRACCIÓN

5.1 ORGANIZACIÓN DEL MÚSCULO CARDIACO

Los cardiomiocitos en el miocardio contienen un gran número de miofilamentos que se organizan en una matriz regular de estrías cruzadas. Las estrías transversales del miocardio reflejan la organización de las proteínas contráctiles en filamentos gruesos rodeados de filamentos delgados. Los filamentos gruesos están formados por miosina (conforman la banda A) y los filamentos finos están compuestos de actina y las proteínas reguladoras tropomiosina y troponina (conforman la banda I). Una densa banda M se encuentra en el centro de cada banda A, mientras que las bandas I son atravesadas por líneas Z. La unidad fundamental morfológica es el sarcómero, que se define como la región entre dos líneas Z (Figura 9.) [276].

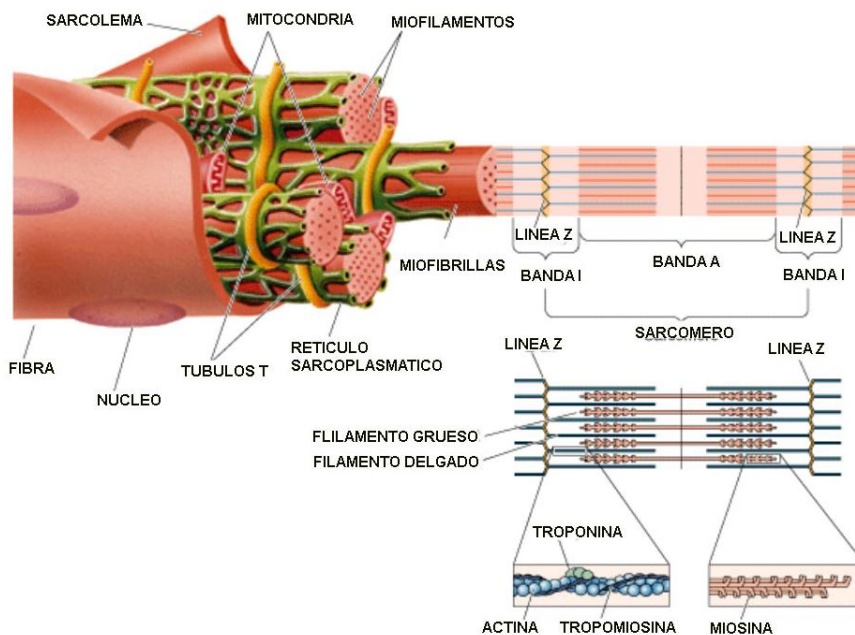


Figura 9. Organización de miofibrillas y miofilamentos en el cardiomiocito.

Los miocitos adyacentes se encuentran conectados por canales o poros en la membrana que conectan las células para la formación de las fibras musculares del miocardio [126]. Estos canales denominados uniones *gap* conforman uniones de baja resistencia eléctrica que permiten la rápida conducción de los potenciales de acción de una célula a otra para la sincronización de la actividad contráctil de las fibras musculares del tejido cardiaco [127]. Los canales *gap*, están formados por la unión de canales intercelulares llamados conexones que a su vez están formados por una familia de proteínas llamadas conexinas (Cx). Los conexones pueden estar formados por un mismo tipo de conexinas o por diferentes tipos [128]. En las aurículas humana se encuentran predominantemente la Cx40 y la Cx43, y en menor cantidad la Cx45 [129]. Pero en los ventrículos predomina sólo la Cx43 y en menor medida la Cx45 [128].

5.2 LA CONTRACCIÓN CARDIACA

La contracción cardíaca está impulsada por la interacción cíclica de la proteína miosina con el filamento de actina, que consume ATP como fuente de energía para producir tensión o acortamiento de la fibra muscular [276]. El proceso eléctrico de excitación-contracción de los cardiomiocitos consta de los procesos que involucran la activación por calcio (Ca^{2+}) de proteínas para la contracción y la subsecuente liberación del calcio que conlleva la relajación [130].

Durante el potencial de acción cardiaco, el Ca^{2+} entra en la célula a través de los canales de calcio tipo L (DHPR) y en menor cantidad por el sistema de intercambio Na^+ - Ca^{2+} del sarcolema (NCX) (Figura 10.) [130]. La entrada de calcio en la célula desencadena también la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SR) a través de los receptores de rianodina (RyR) [130]. El SR, equivalente del retículo endoplasmático, tiene como función principal almacenar calcio para la contracción de los miofilamentos.

INTRODUCCIÓN

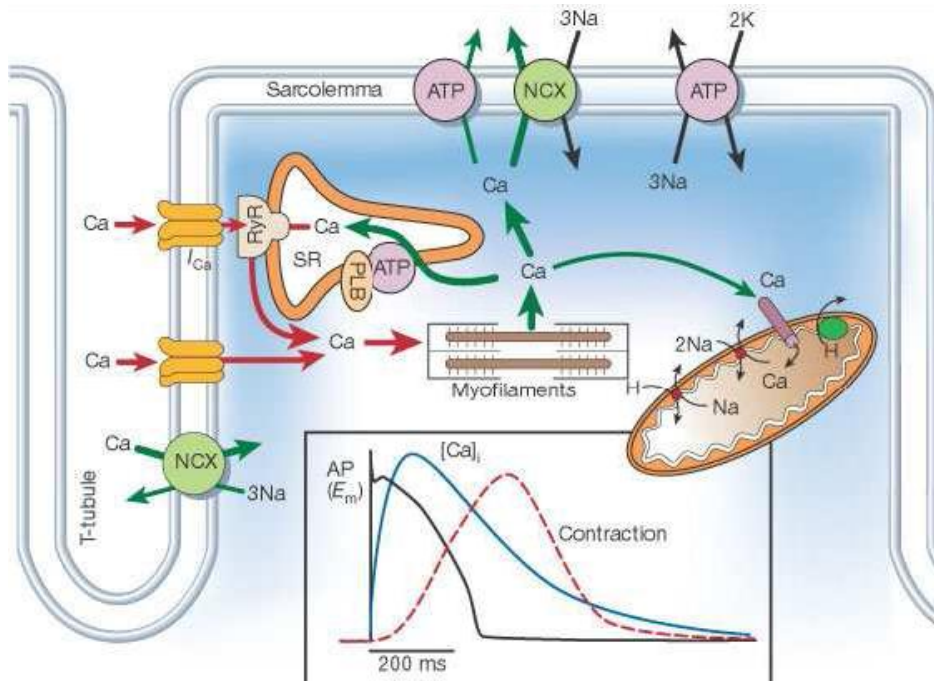


Figura 10. Esquema de la movilización del calcio durante el potencial de acción. [131].

El resultante incremento de la concentración intracelular del calcio provoca que el calcio liberado se una a la troponina de los filamentos finos, que modifica la posición de la tropomiosina, descubriendo la región de la actina en la que esta proteína se puede unir con la miosina. Los filamentos finos son atraídos hacia el centro del sarcómero por los movimientos de la miosina que se une con la actina, y establece puentes cruzados entre los filamentos finos y gruesos haciendo que estos se deslicen entre sí, lo que produce acortamiento de la fibra muscular y la contracción muscular o sístole [131] [276].

La disminución de la concentración intracelular de calcio mediante la recaptación del Ca²⁺ desde el sarcolemma hasta el SR a través de Ca²⁺-ATPasa del SR (SERCA2) y el sistema NCX, la Ca²⁺-ATPasa del sarcolemma y el uniporte de Ca²⁺

mitocondrial causa la disociación del Ca^{2+} de la troponina C resultando en la relajación cardíaca o diástole [130].

El calcio intracelular es el regulador central de la contractibilidad cardíaca [131, 132] y las alteraciones en su regulación causan disfunción contráctil y arritmias en condiciones patológicas. SERCA2 tiene un papel clave en la regulación del Ca^{2+} en el cardiomiocito [133]. En modelos experimentales y en corazones humanos con insuficiencia cardíaca hay una reducción en la expresión de SERCA2 [134-136] y un incremento en la expresión de NCX [137-140] que producen una disminución de la concentración del calcio intracelular. Estos cambios tienden a reducir el contenido de Ca^{2+} en el SR, limitando su liberación y dando lugar a un déficit contráctil sistólico en la insuficiencia cardíaca

La actividad de SERCA2 se inhibe por la proteína endógena Fosfolamban en estado defosforilado. Cuando Fosfolamban se fosforila por la proteína quinasa A (PKA), su acción inhibitoria disminuye y aumenta la actividad de SERCA2 [141]. En la insuficiencia cardíaca, aunque los niveles de Fosfolamban en los cardiomiocitos no varían, la proporción de esta proteína fosforilada es menor y esto resulta en un incremento de la inhibición de la actividad de SERCA2 [141].

La entrada de Ca^{2+} a través de los DHPR durante el potencial de acción se limita mediante una inactivación dependiente de Ca^{2+} . Es una inactivación de efecto local mediada por la unión de la calmodulina en el extremo carboxilo terminal de los canales [142, 143]. Los DHPR se localizan principalmente en las zonas de confluencia entre el sarcolema y el SR, donde están los RyR [144]. Durante el proceso de excitación y contracción, la liberación de Ca^{2+} por parte del SR mediante los RyR también contribuye a la inactivación de la entrada de calcio dependiente de calcio [145, 146].

INTRODUCCIÓN

En la contracción cardíaca, la velocidad de conducción de la activación eléctrica y la sincronización están determinadas en gran parte por las uniones *gap* [147, 148]. Las conexinas, responsables de la formación de los conexones que a su vez forman las uniones *gap*, son una familia de proteínas con un alto grado de homología pero con diferentes propiedades funcionales [149, 150] que según sus niveles relativos de expresión influyen en las propiedades de conducción en el miocardio y en la predisposición a las arritmias [148, 151]. De hecho, en diferentes modelos animales, se comprobó como la carencia de la Cx40 era determinante para una bajada en la velocidad de conducción de señales intercelulares y la predisposición a las arritmias atriales [152, 153].

6. METABOLISMO LIPÍDICO DE LOS CARDIOMIOCITOS

6.1 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS

El corazón, para mantener su función contráctil, requiere un suministro energético continuo y abundante que es aportado, en su mayoría, por la β -oxidación de ácidos grasos (AG) y, en menor medida, por la glucosa, el ácido láctico y los cuerpos católicos [154]. La energía química almacenada en estos componentes es transformada en energía mecánica, para su empleo en la interacción entre actina y miosina a nivel de las miofibrillas. Los AG circulantes metabolizados por los cardiomiocitos pueden ser AG libres (no esterificados), formando complejos con la albúmina derivados de la lipólisis del tejido adiposo, y AG esterificados como TG, contenidos en partículas lipoproteicas como VLDL o QM, y liberados por la acción de la LPL.

La LPL, situada principalmente en la superficie luminal del endotelio unida a proteoglicanos, media la lipólisis de lipoproteínas ricas en TG. También se ha observado su presencia activa en la superficie de los cardiomiocitos, importante para la posible captación de lípidos procedentes de lipoproteínas remanentes pequeñas capaces de atravesar la barrera endotelial [155].

La captación por las células de AG libres puede ser por difusión pasiva o a través de receptores como el CD36. Según los resultados obtenidos por Bharadwaj et al. [86] en un modelo *in vivo*, la LPL y el CD36 trabajan en conjunto para mediar la captación de AG procedentes de las VLDL. La lipólisis de los TG por la LPL genera concentraciones adecuadas de AG libres para su posible captación por el receptor CD36. Sin embargo para la internalización de los AG derivados de los QM sólo se requeriría a la LPL, pues la hidrólisis de los QM por la enzima genera

concentraciones más altas de AG que no son asimilables a través del CD36 y son captadas por difusión pasiva.

La deficiencia específica de LPL en el corazón murino conlleva disfunción cardíaca y su delección total resulta en hipertrigliceridemia severa y muerte en estado neonatal [156, 157].

6.2 METABOLISMO DEL COLESTEROL

Los mecanismos que participan en la transferencia de colesterol en el corazón son poco conocidos. El corazón necesita lípidos como el colesterol para su funcionamiento normal, aunque su síntesis y su captación, a partir de lipoproteínas ricas en CE como las LDL, son mínimas en este tejido [158]. Las VLDL y los QM pueden ser fuentes no sólo de TG, sino también de CE en el miocardio [86, 159, 160].

La captación de CE procedente de las VLDL en el corazón es mayor que la captación procedente de los QM [159]. La LPL, al igual que en el caso de los TG, también ayuda a la captación de CE derivado de las VLDL [86] gracias tanto a su actividad enzimática, como a su función de puente entre la lipoproteína y su receptor [161]. La deficiencia en el corazón de la LPL reduce la captación de CE de las VLDL. La internalización de CE podría ocurrir como la internalización de toda la partícula lipoproteica o a través de una captación lipídica selectiva. Algunos autores mostraron una vía independiente de los receptores de las LDL para el suministro de CE procedente de lipoproteínas ricas en TG al corazón [160].

6.3 ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN EL CORAZÓN

El tejido adiposo almacena lípidos como fuente de energía en condiciones normales. Sin embargo, en situaciones patológicas los lípidos neutros como CE y TG pueden sobreacumularse en tejidos no adiposos (esteatosis), como el miocardio, con consecuencias deletéreas debido a su vulnerabilidad a los productos tóxicos de la degradación de estos lípidos [162].

La esteatosis en el miocardio está asociada a la lipotoxicidad cardíaca (resistencia a la insulina en el corazón, apoptosis celular, cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca) y se ha observado en condiciones fisiopatológicas como la diabetes [163, 164], la obesidad [165], la cardiopatía genética [166] y la isquemia cardíaca [167, 168].

6.3.1 ACUMULACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

La obesidad y la enfermedad cardiovascular están asociadas con la esteatosis y deposición lipídica, principalmente de AG libres, en tejidos no adiposos. Aunque inicialmente los órganos pueden almacenar algunos de estos lípidos como los TG, el exceso en la deposición lipídica resulta en la hipertrofia e hiperplasia de las células de estos tejidos con el fin de acomodar la entrada en exceso de AG.

La acumulación promueve una ineficiente oxidación de los lípidos que resulta en la acumulación de especies lipídicas tóxicas que alteran la señalización celular [169], la disfunción mitocondrial [170] y la apoptosis [171].

La disfunción cardíaca inducida por la sobreacumulación lipídica ha sido relacionada con alteraciones en vías celulares como el estrés en el retículo endoplásmico [172] y la disfunción mitocondrial [173], ambas inductoras de

apoptosis. Se han propuesto múltiples mediadores de los efectos lipotóxicos, como ROS, NO, ceramida, fosfatidilinositol-3-quinasa, ligando de receptores nucleares PPAR, leptina y otras adipoquinas [174, 175].

Durante la sobreacumulación lipídica se produce una hiperactivación de la β -oxidación de los AG en la mitocondria que lleva a la formación excesiva de ROS, a la modulación de SERCA2 y al origen de fibrosis e hipertrofia miocárdica. Además, la modulación de la expresión de SERCA2 se relaciona directamente con la alteración de la función sistólica y diastólica del corazón, alterándose la contracción cardíaca. A medida que los AG se acumulan como TG se acaba la capacidad de almacenamiento, y los AG se oxidan ineficientemente generando especies lipídicas intermedias como la ceramida, que contribuyen a la fibrosis, a la hipertrofia y a la disfunción contráctil y metabólica [174-176].

De la misma forma que los TG derivados de AG libres circulantes, los lípidos derivados de lipoproteínas ricas en TG también pueden producir lipotoxicidad cuando se sobreacumulan. Yagyu et al. [155] en un modelo murino de cardiomiopatía inducida por lipotoxicidad observó que la exposición a partículas ricas en TG, como QM y VLDL, aumenta la captación de varias fracciones lipídicas (AG y CE) y produce anomalías metabólicas asociadas con la cardiomiopatía lipotóxica.

6.3.2 ACUMULACIÓN DE COLESTEROL

Aunque los altos niveles de colesterol en sangre son un factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria poco se sabe acerca de los efectos de la hipercolesterolemia en la función cardíaca. Diferentes estudios mostraron que altos niveles de colesterol en el miocardio dan lugar a fenómenos de lipotoxicidad cardíaca [155, 177]. En condiciones de hipercolesterolemia en modelos murinos, se

altera la contractibilidad miocárdica, incrementa el contenido de colesterol en las membranas, se reduce la expresión de SERCA2 y su capacidad de captación de Ca^{2+} [178]. También otros resultados de Luo et al. [179] en las mismas condiciones muestran además una reducción en la expresión de RyR y un aumento en los niveles de NCX en el cardiomiocito.

7. ATEROSCLEROSIS E ISQUEMIA CARDIACA

La aterosclerosis y trombosis pueden originar una reducción total o parcial del flujo sanguíneo de las arterias coronarias limitando la irrigación del miocardio y desencadenando el fenómeno de isquemia cardiaca (Figura 11.). Este proceso está caracterizado por no satisfacer la demanda de nutrientes y oxígeno ni de la pared arterial ni del tejido cardiaco. La isquemia cardiaca finaliza con el daño tisular por necrosis, las alteraciones en el metabolismo celular y una disfunción generalizada del corazón.

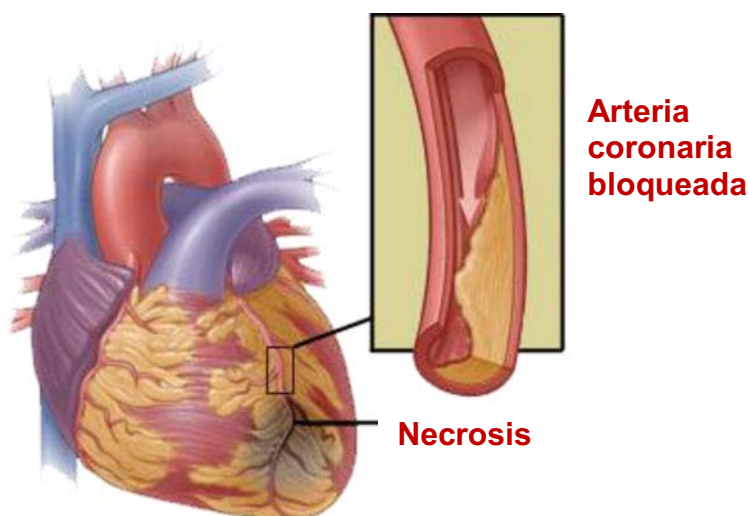


Figura 11. Isquemia cardiaca. Representación gráfica de un corazón con isquemia cardiaca y necrosis producida por el bloqueo aterosclerótico de una arteria coronaria (www.queensheart.org).

La disminución de la concentración de oxígeno o hipoxia es un evento clave para el inicio de rápidos procesos adaptativos por las células con el fin de asegurar su supervivencia y la del tejido. La concentración de oxígeno es importante en la regulación de procesos como el crecimiento, el desarrollo, el metabolismo, la homeostasis del pH y la angiogénesis. Además la hipoxia juega un papel en numerosas enfermedades humanas entre las que destacan las enfermedades

vasculares, las condiciones inflamatorias o el cáncer [180, 181]. La presión parcial de oxígeno en el cuerpo se sitúa entre los 150 mm Hg (21% O₂), en las vías aéreas superiores, y los 5 mm Hg (~1% O₂) en la retina [182]. Los niveles de oxígeno considerados como hipóxicos varían, pero en la mayoría de los tejidos se desencadena una respuesta hipóxica por debajo de los 40 mm Hg (~6% O₂) [183].

7.1 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR LA HIPOXIA (HIF)

Muchas de las respuestas celulares a la hipoxia están orquestadas por los factores de transcripción inducibles por la hipoxia (HIF), que regulan la expresión de un amplio grupo de genes en las células hipóxicas. Estos factores de transcripción son heterodímeros compuestos por dos subunidades que se expresan de forma constitutiva: HIF-1 α (120 kDa) y HIF-1 β (91–94 kDa). HIF-1 β no se altera en presencia de oxígeno, pero es necesario para la formación del complejo funcional HIF-1. El heterodímero HIF-1 α/β se une a las secuencias con elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) presentes en los promotores de sus genes diana [184] para su regulación transcripcional que media las respuestas de adaptación a la hipoxia. Los productos de estos genes median la restauración de la oxigenación y limitan el daño tisular. HIF activa de forma rápida genes que promueven la eritropoyesis y la angiogénesis como el de la eritropoyetina (EPO) y el del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [185] respectivamente. La angiogénesis es beneficiosa en casos con problemas de perfusión que llevan al daño tisular. Durante el infarto de miocardio, la isquemia induce el desarrollo de vasos colaterales con el fin de superar la estenosis y reducir el tamaño de la zona infartada con el menor deterioro funcional posible [186, 187]. Sin embargo, también puede facilitar vascularizaciones no beneficiosas como ocurre en el caso de los tumores.

7.2 HIPÓXIA MIOCÁRDICA

El corazón es un órgano muy sensible a la concentración de oxígeno debido a su alto consumo metabólico y energético, necesario para su correcto funcionamiento. La oclusión luminal en las arterias coronarias tras una estenosis progresiva, consecuencia de la aterosclerosis, origina una reducción del flujo sanguíneo que transporta nutrientes y oxígeno al miocardio [188]. Este hecho desencadena la isquemia cardiaca, la cual puede presentar diferentes síntomas y consecuencias como la actividad arrítmica del corazón, la angina de pecho, la insuficiencia cardiaca o el infarto agudo de miocardio [189]. Cuando la hipoxia es por tiempo prolongado se desencadenan respuestas celulares apoptóticas [190], alteraciones en los potenciales de membrana [191] o hipertrofia en los cardiomiocitos que resultan en una disfunción global del miocardio. La angiogénesis mediada por VEGF y HIF-1 α en respuesta a la hipoxia también contribuye al remodelado cardiaco. Estos cambios, aunque en principio son para paliar y adaptarse a la situación hipóxica, a largo plazo desencadenan hipertensión pulmonar, fibrosis miocárdica, hipertrofia ventricular, y finalmente insuficiencia cardiaca crónica [189].

La respuesta temprana inductora de la expresión de HIF-1 α frente a la isquemia se ha observado en pacientes y modelos animales [192]. El papel de rescate frente al daño isquémico de HIF-1 α se hace evidente al deleccionarlo selectivamente en los cardiomiocitos, ya que se reduce la vascularización y la función cardiaca. Los animales *knockout* homocigotos para HIF-1 α (HIF-1 α ^{-/-}) son letales en fase embrionaria, sin embargo los heterocigotos (HIF-1 α ^{+/-}) son viables y tienen una función cardiaca normal. En situaciones de isquemia cardiaca transitoria los heterocigotos están significativamente más predispuestos a sufrir alteraciones en la contractibilidad e insuficiencia cardiaca [193].

Durante la isquemia transitoria se puede producir una respuesta de preconditionamiento protectora del miocardio, potencialmente influenciada por HIF, donde se mejora la llegada del oxígeno mediante la angiogénesis, se consigue un metabolismo más eficiente y se preserva la funcionalidad mitocondrial. Además la producción elevada de enzimas antioxidantes previene el daño generado por ROS durante la reperfusión. Un estudio *in vivo* usando pequeños RNA de interferencia (siRNA) mostró que un siRNA anti HIF-1 α disminuye el efecto cardioprotector del preconditionamiento, mientras que un siRNA contra la PHD2, que media la degradación de HIF-1 α , incrementa los niveles de HIF-1 α y mejora la protección cardiaca [194].

Para la recuperación funcional y viabilidad a largo plazo de un órgano en condiciones de isquemia es muy importante la llegada de nueva sangre oxigenada en un proceso conocido como reperfusión. Sin embargo, la isquemia-reperfusión origina daño y lesiones serias al producir una gran respuesta inflamatoria, liberación de radicales libres, proteasas y apoptosis celular [195]. La reducción de la degradación de HIF-1 α en corazón debida a supresión transgénica de la PHD2, disminuye la sensibilidad al daño causado por la isquemia-reperfusión [196].

7.3 ALTERACIONES EN EL MANEJO DEL CALCIO Y LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL EN EL MIOCARDIO ISQUÉMICO

La hipoxia genera estrés dentro de la célula, en el retículo sarcoplásmico [197], como consecuencia de la carencia de oxígeno y rompiendo la homeostasis del calcio. Las bajas concentraciones de oxígeno provocan un incremento intracelular de Ca²⁺ [198] debido al incremento en su captación, a través del aumento de canales de Ca²⁺ tipo L o DHPR [199], y a la liberación de Ca²⁺ desde el SR. En conjunto, se producen múltiples efectos dañinos que incluyen la desorganización de miotúbulos,

la disfunción mitocondrial [200], el incremento en la formación de radicales libres [201], el daño en el sarcolema [202] y, finalmente, la necrosis o apoptosis [200].

En modelos *knockout* heterocigotos para HIF-1 α ^{+/-} con isquemia cardiaca transitoria hay mayor predisposición a sufrir alteraciones en la contractibilidad debidas a la disminución de la movilización y del almacenamiento de Ca²⁺ intracelular [193]. Las alteraciones en la contractibilidad cardiaca son causadas por la pérdida de proteínas del manejo del calcio como SERCA2, que puede ser regulada negativamente por HIF-1 α de forma directa [203] o indirecta a través de la producción de ROS [204], pero recientemente se ha descrito que la hipoxia puede suprimir la expresión de SERCA2 través de HIF-1 de una forma directa [203].

7.4 ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN EL MIOCARDIO ISQUÉMICO

Durante la isquemia se acumulan vacuolas lipídicas en el corazón. Esta acumulación de lípidos neutros, principalmente TG, se ha descrito en diferentes modelos animales de isquemia miocárdica [88, 167, 168, 205]. La acumulación lipídica en el miocardio ocurre en la periferia de las zonas infartadas [168, 206] y, en general, está asociada a los efectos nocivos de la lipotoxicidad, que eran observados en situaciones patológicas como la diabetes [163, 164], la obesidad [165] o la isquemia cardiaca. [167, 168].

En un estudio con pacientes de infarto de miocardio crónico se observó una prevalencia de acumulación lipídica del 68% en las zonas próximas al infarto (Figura 12.) [207]. Los pacientes con acumulación tenían unas zonas infartadas mayores y una disminución en la función regional. Además, la deposición lipídica se correlacionaba con el volumen del infarto, la fracción de expulsión, el volumen diastólico final y el volumen sistólico final del ventrículo izquierdo. Por otro lado,

en modelos animales, se ha demostrado que la dislipemia potencia las alteraciones cardiacas ya inducidas por la propia isquemia [208, 209].

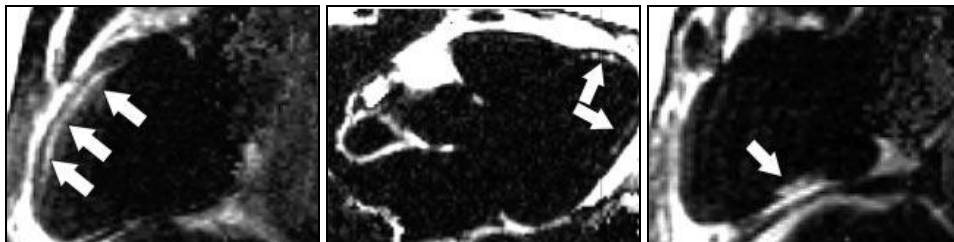


Figura 12. Acumulación lipídica en el miocardio humano. Deposición lipídica (flechas) en áreas próximas al infarto de miocardio en tres pacientes [207].

La acumulación de TG en el corazón isquémico puede explicarse, en parte, por el cambio metabólico desde la β -oxidación de AG hacia la glucólisis con el fin de generar energía en condiciones anaeróbicas [88, 210]. Sin embargo no está claro si únicamente es esta adaptación metabólica la responsable de esta acumulación, o si están implicados otros factores como el incremento de la síntesis endógena de AG o el aumento de la captación lipídica que puede inducir lipotoxicidad. En el caso de los TG, el mayor aporte de AG al corazón durante la isquemia puede ser facilitado por la actividad de la LPL cardiaca, que se ha observado incrementada en un modelo de isquemia-reperfusión *in vivo* [211], o por el receptor de AG CD36 [87], que también aumenta su expresión en condiciones de hipoxia, aunque no es claro su papel en la sobreacumulación lipídica durante la isquemia cardiaca. La expresión de los PG también se ve incrementada por la hipoxia en varios tipos celulares [212-214] y podría participar en la sobreacumulación de lípido colaborando con algún receptor lipoproteico. Por otro lado, en situación de isquemia se incrementa la expresión del receptor de las VLDL y la internalización de lipoproteínas, promoviendo la lipotoxicidad y sus consecuencias en el corazón isquémico [88].

La acumulación de TG podría ser contemplada como una estrategia defensiva que secuestra AG limitando la formación de especies lipídicas tóxicas, y

INTRODUCCIÓN

que finalmente desencadenan un daño funcional en el corazón [176]. La acumulación de vacuolas lipídicas formadas por la adición de AG libres, pueden llegar a proteger contra la apoptosis celular mediante la canalización de los AG libres hacia la creación de reservas de TG [215]. Las vacuolas lipídicas también podrían proporcionar protección contra la muerte celular ocasionada en procesos de isquemia-reperfusión secuestrando el exceso de AG libres y de Ca^{2+} libre [216].

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 CARDIOMIOCITOS HL-1

La línea celular murina de cardiomiocitos atriales auriculares HL-1 fue generada por el Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Centre, New Orleans, LA, USA) y proporcionada amablemente por el Dr. U Rauch (Charité-Universitätmedizin Berlin). Estas células mantienen características fenotípicas de cardiomiocitos adultos tales como la presencia de miofibrillas altamente ordenadas y uniones cardio-específicas en forma de discos intercalados así como la presencia de corrientes de potasio importantes en la despolarización cardíaca como el I_{Kr} y una ultraestructura similar a la de los cultivos primarios de cardiomiocitos atriales adultos [217, 218].

Las células HL-1 se cultivaron en Medio Claycomb (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), norepinefrina 100 μ M, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/mL y L-Glutamina 2 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) en placas de plástico recubiertas por 12,5 μ g/mL fibronectina y 0,02% gelatina. El medio de cultivo se renovó cada día hasta alcanzar las células la confluencia (Tabla 1.).

1.2 CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DE RATA NEONATA (NRVM)

1.2.1 AISLAMIENTO DE NRVM

El protocolo de estudio fue aprobado por un comité de investigación animal de nuestra institución (ICCC-020/DMAH4711) y se llevó a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (Publicación del NIH N° 85-23, revisada en 1996).

Los cultivos de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVM) fueron aislados a partir de ventrículos de corazón de ratas Wistar Han de 3-4 días de edad. Los neonatos fueron sacrificados por decapitación y a los corazones extraídos se les descartaron las aurículas. Las suspensiones celulares se obtuvieron mediante el kit Neonatal Cardiomyocyte Isolation System (Worthington Biochemical Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cardiomiocitos se separaron de los fibroblastos cardiacos realizando un preplaqueo en una placa de plástico durante 90 min, en un incubador con una atmósfera 5% CO₂ a 37°C, con el fin de recoger el sobrenadante con las células NRVM aisladas y descartar la placa con los fibroblastos adheridos.

1.2.2 CULTIVO DE NRVM

Los cardiomiocitos se sembraron en placas cubiertas con 1% gelatina a una densidad de $7,5 \times 10^4$ células/cm² en medio de cultivo 4:1 DMEM:M199 (Gibco) suplementado con 5% FBS, 10% suero equino fetal (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y Cytosine β-D-Arabinofuranoside 1 µg/mL para inhibir la proliferación de fibroblastos residuales

(Tabla 1.). El medio de cultivo se cambió cada dos días. Después de 48 h en cultivo los cardiomiocitos NRVM mostraban contracciones espontáneas regulares. Las células fueron usadas para los experimentos tras 3-6 días en cultivo.

CARDIOMIOCITOS HL-1	CARDIOMIOCITOS NRVM
MEDIO COMPLETO	MEDIO COMPLETO
Medio Claycomb 10% FBS Norepinefrina 100 µM Penicilina 100 U/mL Estreptomina 100 µg/mL L-Glutamina 2 µM	DMEM:Medio199 (4:1) 5% FBS 10% Suero equino Penicilina 100 U/mL Estreptomina 100 µg/mL
MEDIO DE QUIESCENCIA	MEDIO DE QUIESCENCIA
Medio Claycomb 0,2% FBS Norepinefrina 100 µM Penicilina 100 U/mL Estreptomina 100 µg/mL L-Glutamina 2 µM	DMEM:Medio199 (4:1) 0% FBS 0% Suero equino Penicilina 100 U/mL Estreptomina 100 µg/mL
MEDIO DE TRATAMIENTO	MEDIO DE TRATAMIENTO
Medio Claycomb 0% FBS Norepinefrina 100 µM Penicilina 100 U/mL Estreptomina 100 µg/mL L-Glutamina 2 µM	DMEM:Medio199 (4:1) 0% FBS 0% Suero equino Penicilina 100 U/mL Estreptomina 100 µg/mL

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.

1.3 TRATAMIENTOS

El día anterior a los tratamientos se llevaron las células, tanto HL-1 como NRVM, a quiescencia renovando el medio completo por un medio pobre en suero (0,2% FBS). Tras 24 h de arresto los tratamientos se llevaron a cabo en medio sin suero. (Tabla 1.) Los tratamientos en condiciones de normoxia (21% O₂) se realizaron en un incubador Nirco con una mezcla de gases consistente de 74% N₂ y 5% CO₂ a 37°C, y los de hipoxia (1% O₂) en la cabina-incubador Hypoxic/Anoxic Workstation H35 (Don Whitley Scientific Ltd.) con 94% N₂ y 5% CO₂ a 37°C. Las lipoproteínas fueron añadidas y mantenidas las últimas 12 h de exposición a

normoxia o hipoxia (24 h). Las células se recogieron en Tripure Isolation Reagent (Roche) para la posterior extracción de RNA y proteína, ó en NaOH 0,1 N para la extracción lipídica.

2. MODELO PORCINO IN VIVO DE ISQUEMIA MIOCÁRDICA

El protocolo de estudio fue aprobado por un comité de investigación animal de nuestra institución (ICCC-020/DMAH4711) y se llevó a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (Publicación del NIH N° 85-23, revisada en 1996).

El estudio se realizó con un grupo de cerdos macho (Crossbred commercial pigs Landrace-Largewhite) que formaban parte de un modelo experimental utilizado para analizar los mecanismos moleculares y celulares implicados en el remodelamiento cardíaco después de un infarto agudo de miocardio [219, 220]. Se utilizó un grupo de animales con una operación falsa como controles.

Doce horas antes de la inducción del infarto una dosis del antiplaquetario Clopidogrel 150 mg/kg fue administrada a todos los animales. Parámetros hemodinámicos, electrocardiograma (ECG) y temperatura corporal fueron monitoreados durante la operación para garantizar los efectos de la anestesia. La anestesia fue inducida mediante la inyección intramuscular de Zoletil (tiletamine and zolazepam) 7 mg/kg, Dormitory (medetomidin) 7 mg/kg, y atropina 0.03 mg/kg. Al comienzo del procedimiento se inició la administración continuada de amiodarone (300 mg, 75 mg/h) en todos los cerdos como medida preventiva de arritmias ventriculares. En la operación, los animales fueron sometidos a una oclusión de la arteria coronaria izquierda anterior descendente (LAD) mediante una angioplastia por balón durante 90 min y luego fueron sacrificados con una sobredosis de KCl. Se

tomaron muestras del miocardio isquémico en el límite necrótico, y muestras no isquémicas para los análisis moleculares.

3. TEJIDO MIOCÁRDICO HUMANO

Las muestras de tejido miocárdico humano se obtuvieron a partir de corazones explantados a pacientes durante transplantes cardiacos realizados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en Barcelona y el Hospital de la Fe en Valencia. Los pacientes fueron funcionalmente clasificados de acuerdo a los criterios de la New York Heart Association (NYHA) y recibían tratamiento médico de acuerdo a las guías de la Sociedad Europea de Cardiología [221].

Se emplearon corazones de pacientes fallecidos en accidente de tráfico con una funcionalidad ventricular normal y sin historial de enfermedad miocárdica o infección activa como muestras controles.

Las muestras de tejido miocárdico fueron obtenidas de la zona periinfártica e inmediatamente guardadas a -80°C . El proyecto fue aprobado por el Comité Ético local de los hospitales de La Fe y Sant Pau, y llevado a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

En el procesamiento de las muestras se molió el tejido ventricular en nitrógeno líquido con un mortero hasta quedar un polvo fino que después se homogenizó en NaOH 0,1 N para la extracción lipídica o en Tripure Isolation Reagent (Roche) para la posterior extracción de RNA y proteína.

4. LÍPOPROTEÍNAS

4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS HUMANAS

4.1.1 AISLAMIENTO

Las lipoproteínas humanas utilizadas en los tratamientos de los cultivos celulares fueron obtenidas de una mezcla de sueros normolipémicos de donantes voluntarios del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona. El aislamiento se basa en una serie de ultracentrifugaciones secuenciales con el fin de separar las fracciones de lipoproteínas sanguíneas existentes en función de la diferencia de densidad existente entre ellas (Tabla 2.) [222].

LIPOPROTEÍNAS	DENSIDAD (g/mL)
Quilomicrones	Menor de 0,96
VLDL	0,96-1,006
IDL	1,006-1,019
LDL	1,019-1,063
HDL	1,063-1,210

Tabla 2. Clasificación de lipoproteínas según su densidad.

Las lipoproteínas utilizadas en los tratamientos fueron las VLDL (densidad 0,96-1,006 g/mL) y las LDL (densidad 1,019-1,063 g/mL). Para su aislamiento se prepararon tres soluciones de densidad diferentes. La primera, que sirve de solución madre para la realización de las demás, es la de densidad 1,006 g/mL (Tabla 3.). Las soluciones de densidad 1,019 g/mL y 1,063 g/mL se prepararon añadiendo bromuro de potasio (KBr) a la solución madre de 1,006 g/mL.

SOLUCIÓN DENSIDAD 1,006 g/mL
Cloranfenicol 15,5 mM
NaCl 0,2 M
EDTA tetrasodio 1 mM
EDTA disodio 0,8 mM
Sulfato de Gentamicina 0,1 mM
Azida de sodio 8 mM
(solución en H ₂ O destilada, pH 7.4)

Tabla 3. Composición de la solución de densidad 1,006 g/mL

Aislamiento de VLDL e IDL: Inicialmente, el suero se centrifugó a 36000 rpm a 4°C durante 30 min para conseguir descartar la fase superior menos densa de color blanco con el fin eliminar los quilomicrones (QM). Una vez descartados los QM, se añadió KBr al suero para llevar su densidad de 1,006 g/mL a 1,019 g/mL y se repartió en tubos de ultracentrífuga. Encima del suero se añadió lentamente la solución de densidad 1,019 g/mL, preparada anteriormente, para formar dos fases, la superior con la solución de densidad y la inferior con el suero. Después se centrifugó todo a 36000 rpm, a 4°C durante 18 h para aislar del suero la resultante fase superior blanca formada por VLDL e IDL. La fase con las VLDL se guarda protegida de la luz a 4°C.

Aislamiento de LDL: Tras el aislamiento de las VLDL e IDL, se eliminó la solución de densidad de la parte superior de los tubos y se juntaron los sueros restantes. Se añadió KBr otra vez al suero para llevar su densidad de 1,019 g/mL a 1,063 g/mL y se repartió en tubos de ultracentrífuga. Se añadió encima del suero la solución de densidad 1,063 g/mL, preparada anteriormente, para formar dos fases, la superior con la solución de densidad y la inferior con el suero. Después se centrifugó todo a 36000 rpm, a 4°C durante 18 h para aislar del suero la resultante fase superior que se separó, esta vez con las LDL y se guardaron también protegidas de la luz a 4°C.

Una vez aisladas las fracciones lipoproteicas es necesario dializarlas 2 horas en tampón de diálisis 1X (Tabla 4.), 18 horas en tampón de diálisis 1X y 2 horas en una solución NaCl 0,15 M.

TAMPÓN DE DIÁLISIS 10X
NaCl 1,5 M
Trizma Base 0,2 M
EDTA disodio 10 mM
(solución en H ₂ O destilada)

Tabla 4. Composición del tampón de diálisis 10X

4.1.2 CARACTERIZACIÓN

Concentración proteica: Se utilizó un kit de Pierce (23225) de cuantificación de proteína que utiliza el ácido bicinconínico (BCA) y se basa en el método de Lowry [223]. Las muestras diluidas y una recta patrón de albúmina bovina (BSA) (Pierce) se incubaron durante 30 min a 60°C para romper la estructura lipoproteica y permitir que el BCA pueda reaccionar con determinados aminoácidos y producir un compuesto coloreado que absorbe a 562 nm.

Cuantificación del colesterol: La cuantificación del colesterol se realizó con un kit comercial (kit RefLab.Brand, 139-204) basado en el método de Allain [Allain et al, 1974]. Se utilizó un estándar de colesterol para cuantificar las muestras. El producto de la reacción se midió a 510 nm.

Análisis del grado de oxidación: Se analizó la oxidación de las lipoproteínas mediante el ensayo TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, Janssen Chimica), que analiza indirectamente la concentración de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA). El malondialdehído (MDA), producto secundario de autooxidación de los ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, sufre una reacción con el TBA y produce un cromóforo de color rosa que se detecta

a 532 nm. Utilizando una recta patrón de MDA (Janssen Chimica), se consideró que las muestras no están oxidadas cuando los valores de TBARS están por debajo de 1,2 nmol MDA/mg de proteína de LDL.

Movilidad electroforética: La movilidad electroforética se analizó utilizando un gel comercial 0,5% agarosa (Paragon Lipoprotein Electrophoresis kit, Beckman Coulter), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las lipoproteínas se separaron según su carga y masa comprobando así el correcto aislamiento de las VLDL y las LDL.

4.2 MODIFICACIÓN DE LAS LDL POR AGREGACIÓN

Las LDL nativas aisladas a partir de sueros normolipémicos se llevaron a una concentración de 1mg/mL diluyéndolas en tampón PBS (Tampón fosfato salino: KCl 2,7 mM; NaCl 0,137 M; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 20 mM; pH 7,4) y se agitaron en un agitador vortex intensamente durante 4 min a temperatura ambiente (T.A.). Después se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a T.A. para precipitar las LDLag y se descartó el sobrenadante. Las LDLag se resuspendieron en PBS hasta una concentración proteica de 1mg/mL [41, 73, 224]. Estas LDLag obtenidas de forma mecánica presentan similar ultraestructura y funcionalidad a las obtenidas por incubación con versicán [80].

4.3 ACUMULACIÓN LIPÍDICA INTRACELULAR

El estudio de la acumulación intracelular de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC) procedente de las lipoproteínas se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) a partir de los extractos lipídicos celulares.

4.3.1 EXTRACCIÓN LIPÍDICA

Las células, una vez tratadas, se lavaron exhaustivamente un par de veces de forma secuencial con: PBS, PBS-1%BSA , PBS-1%BSA-Heparina 100 U/mL, PBS-1%BSA y PBS para eliminar las lipoproteínas adheridas en el exterior de las membranas plasmáticas. A continuación, se adicionó 1 mL de NaOH 0,1N para lisar las células y se cuantificó el contenido proteico de los extractos para poder normalizar los valores de acumulación lipídica por cantidad de proteína. Para la extracción lipídica del tejido miocárdico, se pulverizaron las muestras en nitrógeno líquido con un mortero y se pesaron 5 mg de cada muestra para homogenizar también en 1 mL de NaOH 0,1N.

El protocolo de extracción lipídica utilizado es una modificación del método descrito por Bligh [225]. Se mezclaron 600 μ L de extracto con 400 μ L de H₂O y 3 mL de una solución de diclorometano-metanol (1:2). Tras una agitación intensa de 10 s en un agitador vortex, se añadió 1 mL más de diclorometano y se volvió a agitar otros 10 s. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min y se obtuvieron una fase superior acuosa y una fase inferior orgánica con el contenido lipídico intracelular que es la que se recogió aparte. Se repitió el proceso con la fase acuosa añadiéndole 1 mL más de diclorometano, agitando y centrifugando otros 15 min a 3500 rpm. La nueva fase orgánica inferior se juntó con la anterior. Finalmente, la muestra se concentró evaporando el solvente orgánico bajo una corriente de N₂ para evitar la oxidación de los lípidos.

4.3.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Las muestras concentradas se resuspendieron en 100 μ L de diclorometano, se agitaron en un vortex y se cargaron en una placa de sílica de cromatografía (DC-Fertigplatten SIL G-24 UV). En cada placa se cargaron además estándares con una

concentración conocida de FC, CE y TG para poder cuantificar las muestras. Se corrieron dos fases móviles diferentes. La primera fase, compuesta por una mezcla de heptano:dietil-éter:ácido acético (74:21:4, vol:vol:vol), separó los diferentes lípidos existentes en la muestra. La segunda fase, compuesta por heptano, arrastró los lípidos que no interesaban con el frente. Después de correr las fases móviles se secó la placa y se tiñó durante 1 min con una solución al 5% ácido fosfomolibdico y 5% ácido sulfúrico en etanol [226]. A continuación se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se calentaron a 100°C durante 7 min. La composición lipídica en CE, TG y FC se observó como bandas azules cuantificables con el programa Quantity One (Bio Rad) tras ser captadas las placas por densitometría con el Chemidoc XRC (Bio Rad).

4.4 MARCAJE RADIOACTIVO DE VLDL HUMANAS

El colesterol esterificado y los triglicéridos de partículas VLDL procedentes de plasma humano se marcaron radiactivamente siguiendo el protocolo de Merkel et al 2002 [227]. Se recubrió el fondo de un matraz de vidrio con cholesteryl-1,2,- ³H-(N) (125 μCi) y glycerol trioleate [¹⁴C] (25 μCi) (PerkinElmer Life Sciences) mediante la evaporación del solvente orgánico, en el que se encontraban resuspendidos los componentes radioactivos, en un baño de agua a 37°C en condiciones de rotación y vacío. A continuación se añadieron 50 mL de plasma humano al matraz con las moléculas radiactivas y se incubaron 20 h a 37°C con rotación y vacío. A partir de este plasma se aislaron por ultracentrifugación secuencial, diálisis y filtrado las VLDL doblemente marcadas (con tritio el colesterol esterificado y con ¹⁴C los triglicéridos).

Las células HL-1 del Artículo 1 de esta tesis fueron expuestas a las VLDL doblemente marcadas (1,8 mM) durante 18 h en normoxia o hipoxia. Al final de la incubación, las células fueron lavadas exhaustivamente y recogidas en NaOH 0,10 N

para su extracción lipídica. La radiactividad se determinó en 50 μ L de los homogenados celulares en un contador de centelleo LS6500 multipurpose (Beckman Coulter) y las cuentas se normalizaron por la cantidad total de proteína de las células.

4.5 MARCAJE DE VLDL HUMANAS CON DiI

Las VLDL obtenidas de los sueros normocolesterolémicos fueron marcadas con 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) al incubar VLDL 1 mg/mL en PBS-0,5% BSA con 100 μ L de DiI en DMSO (3 mg/mL) durante 8 h a 37°C. Después la densidad de la solución de VLDL fue ajustada a 1.019 mg/mL y las VLDL fueron reaisladas, dializadas y filtradas.

Las células HL-1 del Artículo 1 de esta tesis fueron expuestas a las VLDL-DiI (1,8 mM) durante 24 h en normoxia o hipoxia. Al final de la incubación, las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS, fijadas con 4% paraformaldehído en PBS, y visualizadas por microscopía confocal (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar, Germany).

5. BIOLOGÍA CELULAR

5.1 GENERACIÓN DE CARDIOMIOCITOS DEFICIENTES EN LRP1

5.1.1 DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVÍRICAS

Se diseñaron tres secuencias de RNA de interferencia (miR RNAi XM_1919; _8223 and _8531, número de acceso: XM_001056970), clonadas en el

plásmido pLenti 6.4-CMV-MSGW (Invitrogen), para silenciar la expresión del LRP1. Un plásmido control negativo (pcDNATM 6.2-GW/miR negative control, Invitrogen) también fue utilizado. Las secuencias de los miR RNAi se detallan en la Figura 1.

miR RNAi - XM_001056970_1919

Top oligo 5' TGCTGCATACACGAGGAACAGCTCATGTTTTGGCCACTGACTGACATGAGCTGCCTCGTGTATG 3'
 Bottom oligo 5' CCTGCATACACGAGGCAGCTCATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATGAGCTGTTCTCCTCGTGTATGC 3'

miR RNAi - XM_001056970_8223

Top oligo 5' TGCTGTCCTCACAATCCACAAACTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAGTTTGGATTGTGAGGA 3'
 Bottom oligo 5' CCTGTCCTCACAATCCAAACTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCAGTTTGTGGATTGTGAGGAC 3'

miR RNAi - XM_001056970_8531

Top oligo 5' TGCTGAGCAGAAGTTGTTGCAGTGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCCACTGCCAAGTTCTGCT 3'
 Bottom oligo 5' CCTGAGCAGAAGTTGGCAGTGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCCACTGCAACAAGTTCTGCTC 3'

pcDNATM6.2-GW/miR - control

Top Oligo 5'- TGCTGAAATGTA CTGCGGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGCTCCACGCAGTACATTT -3'
 Bottom Oligo 5'- CCTGAAATGTA CTGCGGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCTCCACGCCAGTACATTT -3'

Figura 1. Secuencias de los miR-RNAi empleados para silenciar la expresión del LRP1

La producción de los lentivirus se realizó en las células embrionarias humanas de riñón 293T. El día antes de la transfección, 3×10^6 células 293T fueron sembradas en placas de 10 cm². El vector de transferencia lentivírico (pLenti 6.4-CMV-MSGW/miR, 6 µg) junto a un plásmido con la envoltura vírica (pMD-G-VSV-G, 2 µg) y una construcción de empaquetamiento (pCMV-ΔR8,2; 4 µg) fueron mezclados con cloruro sódico 150 mM. La mezcla se añadió a 250 µL de PEI-NaCl solution (Polyplus transfection) y se incubó a T.A. durante 20 min. Esta solución de DNA fue añadida gota a gota a las placas de células 293T y se incubó durante 16 h a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂. Al día siguiente se eliminó la solución de transfección y se le añadió medio sin suero bovino fetal (FBS) durante 48 h. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante, se centrifugó y se filtró a través de un filtro

de unión de proteínas pequeñas de 0,45 μM (Corning, Bath, Reino Unido). El sobrenadante filtrado fue concentrado con un filtro Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.1.2 GENERACIÓN DE CARDIOMIOCITOS DEFICIENTES EN LRP1

Los stocks de lentivirus y los controles negativos generados a partir de las construcciones resultantes se seleccionaron con el antibiótico blasticidina ya que los plásmidos utilizados aportaban el gen de resistencia. Con el fin de crear un stock de células HL-1 deficientes en LRP1 que pudieran dividirse indefinidamente manteniendo el silenciamiento, los cardiomiocitos fueron transducidos establemente con lentivirus en una relación de 10 MOI (10 virus/célula, MOI: multiplicity of infection) y mantenidos en medio completo durante tres días. Tras esto, se cambió el medio de cultivo por medio completo suplementado con blasticidina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se renovó cada dos días hasta que sólo sobrevivieron las colonias más resistentes al antibiótico. Los cultivos con mayor silenciamiento del LRP1 fueron seleccionados, congelados y usados en posteriores experimentos. En el caso de NRVM se realizó incubando las células junto a los lentivirus con una relación de 10 MOI en medio completo durante 18 h. Después se cambió el medio por medio fresco completo con blasticidina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En estos cultivos primarios el silenciamiento fue puntual en cada experimento determinado debido a que en cada sacrificio de ratas se obtienen células nuevas que no se subcultivan.

5.2 ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE GLUTAMINA EN HL-1

En el Artículo 1 de la tesis se observó un incremento de la acumulación lipídica derivada de las VLDL en cardiomiocitos HL-1 sometidos a hipoxia. Para descartar que este efecto pudiese ser una respuesta inespecífica de las células

ocurrente bajo hipoxia, incubamos los cardiomiocitos con glutamina marcada radioactivamente (L-[3,4-³H(N)]-Glutamine, Perkin-Elmer) 2μM durante 18 h. Las células se recogieron en NaOH 0,10 N y la radiactividad se determinó en 50 μL de los homogenados celulares en un contador de centelleo LS6500 multipurpose (Beckman Coulter) y las cuentas se normalizaron por la cantidad total de proteína total en las células.

5.3 DETECCIÓN DE CÉLULAS HL-1 APOPTÓTICAS

Con el propósito de averiguar si los tratamientos de VLDL e hipoxia aplicados a células HL-1 inducen apoptosis, en el artículo 1 de la tesis, se utilizó el kit ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International). En este kit, el DNA fragmentado de las células apoptóticas es detectado al marcarse enzimáticamente el extremo 3'-OH de los fragmentos rotos con nucleótidos modificados. Los cultivos celulares fueron fijados con 1% paraformaldehído en PBS durante 10 min a T.A. y a continuación permeabilizados con una solución etanol:ácido acético (2:1) durante 15 min a -20°C. Tras esto, se añadió un buffer con los nucleótidos marcados al cultivo celular durante al menos 10 segundos (s) a T.A. y de seguido la enzima durante 1 h a 37°C. La reacción se paró con lavados de 10 min para incubar posteriormente las células con el anticuerpo conjugado durante 30 min a T.A.. Finalmente los cultivos se volvieron a lavar con PBS y se prepararon para visualizarlos por microscopía confocal (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar, Germany).

5.4 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Para el artículo 2 de la tesis, durante los trasplantes cardíacos se cortaron porciones de tejido miocárdico que fueron sumergidos en una solución fijadora (4% paraformaldehído), embebidos en parafina, cortados en secciones seriadas de 5μm

de grosor, y colocados en portaobjetos cubiertos con Poly-L-lysine. Los anticuerpos primarios empleados fueron monoclonales de conejo anti-LRP1 (Epitomics 2703, dilución 1:100), monoclonales de ratón anti-Troponina T (Thermo scientific MS-295, dilución 1:100) y monoclonales de ratón anti-HIF-1 α (Novus NB100-105, dilución 1:50). Aproximadamente 2 h antes de poner el anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas y la actividad peroxidada endógena suprimida con H₂O₂. Las uniones no específicas fueron bloqueadas con suero equino. Los anticuerpos primarios se detectaron usando la técnica de la inmunoperoxidasa gracias a la afinidad avidina-biotina. Las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados (Vector®, dilución 1:200). El cromógeno 3,3'-diaminobenzidine-haematoxylin fue usado para la tinción nuclear. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Nikon Eclipse 80i y digitalizadas con la cámara Retiga 1300i Fast (Aumento: 240X).

En otros experimentos, las secciones fueron incubadas posteriormente con un anticuerpo secundario Cy3-conjugado (Jackson Immuno Research Laboratories) a 37°C durante 1 h y los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 (Sigma) durante 10 min. Las imágenes fueron capturadas y analizadas con un microscopio confocal TCS SP5 (Leica).

5.5 ESTUDIO DEL MANEJO INTRACELULAR DEL CALCIO

En el artículo 1 y 3 de la tesis, los cardiomiocitos HL-1 fueron expuestos a lipoproteínas VLDL y LDL respectivamente, para un posterior estudio de la estabilidad y propagación del calcio en cultivos celulares sometidos a diferentes frecuencias de estimulación eléctrica. Para detectar cambios en el manejo intracelular del calcio, los cultivos de HL-1 se incubaron con el marcador fluorescente de calcio fluo-4. El marcaje se calculó en áreas de 1×1 mm² del cultivo

celular mediante la utilización del microscopio confocal de escaneo por resonancia (Leica SP5 AOBS) con un objetivo 10X.

Las células se cargaron con fluo-4AM 2,5 μ M durante 15 min a T.A. seguidos de 30 min de desesterificación. El Fluo-4 se excitó a 488 nm con un láser ajustado al 20% de intensidad. La fluorescencia emitida se detectó entre 505 y 650 nm, y los cambios en el calcio intracelular fueron estimados normalizando la fluorescencia emitida (F) con la emisión de fluorescencia basal (F_0). Las señales emitidas por el calcio fueron detectadas y caracterizadas mediante el software Leica LAS o un programa propio que analiza la fluorescencia basal y máxima, y la amplitud y duración de la curva de movilización del calcio intracelular.

En determinados experimentos se indujo una sobrecarga celular de calcio añadiéndolo directamente a la placa con el cultivo incrementando su concentración hasta 5 mM. Se añadió también 2,2% manitol para mantener la normo-osmolaridad.

Las curvas de movilización del calcio, a un intervalo de estimulación dado, se clasificaron como uniformes, alternantes o irregulares de acuerdo a las variaciones en la amplitud del patrón de respuesta beat-to-beat que presentaban. El patrón de propagación de la movilización del calcio desde una región proximal (donde se localizaba el electrodo de estimulación) hasta una región distal, en el campo de imagen considerado, fue también clasificado como uniforme, alternante o irregular.

6. BIOLOGÍA MOLECULAR

6.1 SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA DE HIF-1 α EN CÉLULAS HL-1

En el primer artículo, para silenciar la expresión de HIF-1 α en las células HL-1 se transfectaron pequeños RNA de interferencia (siRNA) de forma transitoria mediante la técnica de la nucleofección. Ésta permite introducir material genético externo mediante la electroporación, que permeabiliza la membrana plasmática y nuclear.

En la nucleofección se empleó un siRNA específico para HIF-1 α (siRNA ID 4390815, Applied Biosystems) y un siRNA random (Ambion AM 4636) como control negativo de la transfección. También se nucleofectaron células en ausencia de siRNA que fueron empleadas como controles de la técnica. La nucleofección se llevó a cabo con los reactivos incluidos en el AmaxaTM Cell Line NucleofectorTM Kit L (VCA-1005, Lonza) y la utilización del programa B-033 del Nucleofector II Device (Lonza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez nucleofectadas las células con el siRNA a una concentración de 600 nM, se mantuvieron 48 h en medio de cultivo completo. Tras este tiempo, las células se llevaron a quiescencia durante 24 h, después se expusieron a normoxia o hipoxia durante los tiempos de estudio, y finalmente se recogieron en el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche) para aislar el RNA y la proteína.

6.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE SECUENCIAS HRE EN CONSTRUCCIONES DEL PROMOTOR DEL LRP1 PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA

Previamente en nuestro grupo se obtuvieron unas construcciones con el clonaje de un fragmento del promotor humano del LRP1 (1191 pb, entre las posiciones -1305 y +341) en el plásmido comercial pGL3 (Promega) que codifica para el gen reportero firefly luciferase [228] que permite analizar la actividad transcripcional del promotor en respuesta a distintos estímulos. En el promotor se encontraron dos secuencias HRE implicadas en la modulación del LRP1 por la hipoxia, mediante deleciones y mutaciones dirigidas del promotor (prescindiendo de la secuencia HRE-1, HRE-2 o de ambas) con el kit Quickchange II (Stratagene).

Para estudiar la actividad transcripcional del promotor del LRP1 en las células HL-1 en condiciones de hipoxia, se cotransfectaron los cultivos, en placas de 12 pocillos, con DNA plasmídico 0,5 µg/pocillo (promotor *wildtype*, mutado y truncado), pRL-null 50 ng/pocillo como vector control (Promega) y 2 µL del reactivo Lipofectamina (Invitrogen) durante 3 h. Tras esto, se cambió el medio y se incubó durante 24 h. Al día siguiente se llevaron las células a quiescencia durante 24 h más y finalmente se expusieron a normoxia o hipoxia durante 18 h. La actividad luciferasa fue medida usando el kit Dual Luciferase Assay y el luminómetro de placas (Orion. I, Berthold detection Systems). La firefly luciferase es una enzima que oxida la luciferina a oxiluciferina produciendo luminiscencia. La técnica se basa en la cuantificación indirecta de la expresión de esta proteína a través de la producción de bioluminiscencia. Los valores de luciferasa fueron normalizados por la actividad Renilla-luciferasa del vector control.

6.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA

Para la extracción del RNA y proteína totales, las células y el tejido (25 mg/muestra) se recogieron o disolvieron en TriPure Isolation Reagent (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. El aislamiento se basa en las diferencias de solubilidad entre RNA, DNA y proteína en distintos solventes orgánicos.

6.3.1 EXPRESIÓN GÉNICA

Integridad del RNA: Una vez extraído el RNA total, se comprobó su integridad mediante una electroforesis horizontal en un gel 1% agarosa en TBE, teñido con bromuro de etidio 0,4 µg/mL. Se mezclaron 1 µL del RNA total, 9 µL de H₂O autoclavada y 2 µL de colorante azul de bromofenol, y se calentó todo a 65°C durante 10 min antes de cargar las muestras en el gel. Los ácidos nucleicos con carga negativa por los grupos fosfato migraron al aplicar una corriente eléctrica de 80V a través del gel en condiciones de pH neutro [Maniatis et al 1989]. La integridad del RNA se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 260 nm.

Concentración del RNA: La cuantificación del RNA total se realizó leyendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). La relación de absorbancias a 260/280 nm indicó la pureza del RNA, y se consideró que las relaciones cercanas a 2 son las óptimas.

Síntesis del cDNA: El cDNA o DNA complementario se sintetizó a partir del RNA total mediante la retrotranscripción (RT-PCR) con la enzima transcriptasa reversa utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). En el protocolo se utilizaron secuencias iniciadoras aleatorias como primers, dNTP y la enzima MultiscribeTM (incluida en el kit) como transcriptasa

reversa. Se mezcló por cada muestra: 1 µg de RNA total, 2 µL de RTbuffer (incluido en el kit), 0,8 µL de dNTP, 2 µL de primers aleatorios, 1 µL de enzima Multiscribe™ y H₂O DEPC (dietil-pirocarbonato) hasta completar un volumen de 20 µL. La reacción RT-PCR (consistente en 25°C/10 min, 37°C/ 2 h y 4°C) se llevó a cabo en un equipo Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

PCR a tiempo real (q-RT-PCR): El análisis de la expresión génica se realizó por PCR a tiempo real con los equipos PCR-7000 y PCR-7900 Sequence Detection System de ABIPRISM (Applied Biosystems). La cuantificación de la expresión se realizó utilizando 1 µL de los productos de la RT-PCR (1 µg de RNA total), 10 µL de la TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) con la sonda a 200 nM y los primers específicos para cada gen a 300 nM (Assays on Demand, Applied Biosystems) (Tabla 5.).

CARDIOMIOCITOS HL-1		CARDIOMIOCITOS NRVM	
GEN	REFERENCIA	GEN	REFERENCIA
LRP1	Mm00464601_m1	LRP1	Rn01503901
VLDLR	Mm00443281_m1	VLDLR	Rn01498166_m1
LDLR	Mm01151339-M1	LDLR	Rn00598440_m1
SREBP-1	Mm01138344_m1	<i>ARBP</i>	Rn00821065_g1
SREBP-2	Mm01306292_m1		
Bcl2	Rn99999125_m1		
BAX	Rn01480160_g1		
Conexina 40	Mn01264990_m1		
Conexina 43	Mn00439105_m1		
SERCA2	Rn01499537_m1		
<i>ARBP</i>	Rn00821065_g1		

MIOCARDIO HUMANO	
GEN	REFERENCIA
LRP1	Hs00233999_m1
VLDLR	Hs1045922_m1
LDLR	Hs00181192_m1
<i>18srRNA</i>	4319413E

Tabla 5. Sondas y oligos comerciales empleados (Assays on Demand, Applied Biosystems) .

En la realización de la q-RT-PCR inicialmente se calentaron las muestras a 95°C durante 10 min para activar la DNA polimerasa (AmpliTaq Gold incluida en la Taqman Universal Master Mix) y después se realizaron 40 ciclos a 95°C de 15 s y 60°C durante 1 min. Los valores Ct de los genes a estudio se normalizaron en función de los valores Ct de genes endógenos (*ARBP* en ratón y rata, y *18sr RNA* en humano).

6.3.2 EXPRESIÓN PROTEICA

La proteína total una vez asilada fue resuspendida en 1% dodecilsulfato sódico (SDS) y cuantificada con el método del ácido bicinónico (BCA).

La expresión proteica se analizó mediante la técnica del Western blot. La proteína se cargó en un gel de poliacrilamida con el agente desnaturizante SDS para obtener una separación en función del peso molecular y no de la carga. A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. A través de la tinción reversible 0,2% Ponceau (Fluka) en 1% ácido acético se comprobó la buena transferencia y la cantidad de proteína cargada de las muestras. La membrana se bloqueó con 5% leche en polvo o 5% BSA en TBS-Tween20 (TBS-Tween20: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris Base, pH 7,4; con un 0,05 % de Tween 20) durante 1 h a T.A. o toda la noche (O/N) a 4°C.

Una vez bloqueada la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico disuelto en la solución de bloqueo durante 2 h a T.A. o toda la noche (O/N) a 4°C (Tabla 6 y 7.). Después, se realizaron tres lavados con TBS-Tween20 de 5 min cada uno. A continuación, se incubó la membrana 1 h con el anticuerpo secundario disuelto también en la solución de bloqueo (Tabla 6 y 7.). Tras la incubación se realizaron dos lavados con TBS-Tween20 y dos lavados con TBS. Se reveló la membrana incubándola con el sustrato SuperSignal West Dura (Pierce), que reacciona con la peroxidasa de rábano conjugada al anticuerpo secundario dando lugar a un sustrato quimioluminiscente. Esta luminiscencia se captó con el equipo Chemidoc XRS (BioRad) y la densidad de las bandas se cuantificó con el programa Quantity One (BioRad).

Las membranas reveladas para los genes de estudio se reutilizaron para detectar los genes endógenos que sirven como control de la proteína total cargada. Primero se deshibridaron las membranas con Restore Western Blot Stripping Buffer,

MATERIAL Y MÉTODOS

Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante, se volvieron a bloquear y se incubaron con los nuevos anticuerpos.

CARDIOMIOCITOS HL-1 y NRVM	
LRP1 cadena β (85 kDa)	
<i>PROTEÍNA</i>	25 μ g
<i>GEL</i>	Condiciones reductoras
<i>ANTICUERPO PRIMARIO</i>	Epitomics 27031, Monoclonal conejo Dilución 1:7000 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
<i>ANTICUERPO SECUNDARIO</i>	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
LDLR (140-160 kDa)	
<i>PROTEÍNA</i>	25 μ g
<i>GEL</i>	Condiciones reductoras
<i>ANTICUERPO PRIMARIO</i>	Epitomics 1956-1, Monoclonal conejo Dilución 1:250 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
<i>ANTICUERPO SECUNDARIO</i>	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
VLDLR (161 kDa)	
<i>PROTEÍNA</i>	30 μ g
<i>GEL</i>	Condiciones reductoras
<i>ANTICUERPO PRIMARIO</i>	Santa Cruz Biotech. sc-18824 Monoclonal ratón Dilución 1:100 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
<i>ANTICUERPO SECUNDARIO</i>	Dako P0161, Conejo anti-ratón Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
HIF-1α (132 kDa)	
<i>PROTEÍNA</i>	40 μ g
<i>GEL</i>	Condiciones reductoras
<i>ANTICUERPO PRIMARIO</i>	Santa Cruz Biotech. sc-10790, Policlonal conejo Dilución 1:50 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
<i>ANTICUERPO SECUNDARIO</i>	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
Caspasa-3 (32 kDa)	
<i>PROTEÍNA</i>	25 μ g
<i>GEL</i>	Condiciones reductoras
<i>ANTICUERPO PRIMARIO</i>	Santa Cruz Biotech. sc-136219, Monoclonal ratón Dilución 1:200 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
<i>ANTICUERPO SECUNDARIO</i>	Dako P0161, Conejo anti-ratón Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
SERCA2 (110 kDa)	
<i>PROTEÍNA</i>	30 μ g
<i>GEL</i>	Condiciones reductoras
<i>ANTICUERPO PRIMARIO</i>	Novus Biologicals NB100-237, Policlonal conejo Dilución 1:1000 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
<i>ANTICUERPO SECUNDARIO</i>	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.

MATERIAL Y MÉTODOS

Conexina40 (40 kDa)	
PROTEÍNA	30 µg
GEL	Condiciones reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Invitrogen 36-4900, Policlonal conejo Dilución 1:1000 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
Conexina43 (43 kDa)	
PROTEÍNA	30 µg
GEL	Condiciones reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Sigma-Aldrich C6219, Policlonal conejo Dilución 1:8000 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
β-Tubulina (50 kDa) - ENDÓGENO HL-1	
PROTEÍNA	Según la membrana que se deshidride
GEL	Condiciones reductoras y no reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	ABCAM ab6046, Monoclonal conejo Dilución 1:500 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
GAPDH (37 kDa) - ENDÓGENO NRVM	
PROTEÍNA	Según la membrana que se deshidride
GEL	Condiciones reductoras y no reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Santa Cruz Biotech. sc-20357, Policlonal cabra Dilución 1:100 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0160, Conejo anti-cabra Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.

Tabla 6. Anticuerpos empleados en la técnica WB en HL-1 y NRVM.

MIOCARDIO	
LRP1 cadena β (85 kDa)	
PROTEÍNA	25 µg
GEL	Condiciones no reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Research Diagnostics 61067, Monoclonal ratón Dilución 1:40 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0161, Conejo anti-ratón Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
LDLR (160 kDa)	
PROTEÍNA	25 µg
GEL	Condiciones reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Epitomics 1956-1, Monoclonal conejo Dilución 1:250 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.

MATERIAL Y MÉTODOS

VLDLR (143 kDa)	
PROTEÍNA	30 µg
GEL	Condiciones reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Santa Cruz Biotech. sc-18824 Monoclonal ratón Dilución 1:100 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0161, Conejo anti-ratón Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
HIF-1α (92 kDa)	
PROTEÍNA	40 µg
GEL	Condiciones reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Santa Cruz Biotech. sc-10790, Policlonal conejo Dilución 1:50 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
VEGF (21 kDa)	
PROTEÍNA	30 µg
GEL	Condiciones reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Santa Cruz Biotech. sc-152, Policlonal conejo Dilución 1:200 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0448, Cabra anti-conejo Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
Troponina T (39 kDa)	
PROTEÍNA	30 µg
GEL	Condiciones reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Thermo Scientific MS-295, Monoclonal ratón Dilución 1:500 en 5% leche 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0161, Conejo anti-ratón Dilución 1:10000 en 5% leche 1 h a T.A.
β-actina (42 kDa)	
PROTEÍNA	Según la membrana que se deshidride
GEL	Condiciones reductoras y no reductoras
ANTICUERPO PRIMARIO	Abcam ab8226, Monoclonal ratón Dilución 1:5000 en 5% BSA 2 h a T.A. o O/N
ANTICUERPO SECUNDARIO	Dako P0161, Conejo anti-ratón Dilución 1:10000 en 5% BSA 1 h a T.A.

Tabla 7. Anticuerpos empleados en la técnica WB en tejido miocárdico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La progresión de la aterosclerosis a nivel de las arterias coronarias puede desencadenar eventos isquémicos al reducirse el flujo de oxígeno y nutrientes al miocardio. Durante el proceso patológico de la isquemia se produce una sobreacumulación intracelular de lípidos en las zonas periinfárticas del miocardio al cambiar el metabolismo cardíaco. La β -oxidación de ácidos grasos (AG) provee las necesidades energéticas normales del corazón, pero en situaciones de isquemia y para optimizar la producción de energía se emplea la glucólisis de carbohidratos. Esto provoca que los AG que entran en los cardiomiocitos se acumulen convertidos en triglicéridos (TG) y ocurran fenómenos de lipotoxicidad.

Las lipoproteínas VLDL, al igual que los quilomicrones, son una fuente importante de AG en forma de TG para el corazón, pero estas lipoproteínas también transportan ésteres de colesterol (CE) que se internalizan en los cardiomiocitos y contribuyen a la cardiomiopatía lipotóxica [155, 177], y la disfunción sistólica y diastólica [178]. De la misma forma las lipoproteínas LDL, en situaciones de hipercolesterolemia, transportan una importante carga de CE y estudios previos de otros grupos en conejos bajo dieta hipercolesterolémica mostraron una relación inversa entre los niveles miocárdicos de colesterol y la expresión de la ATPasa del retículo sarcoplásmico que transfiere Ca^{2+} (SERCA2), que es un importante regulador en el manejo del calcio intracelular [178]. A pesar de ser bien conocidos los efectos dañinos de los altos niveles de colesterol en plasma para el sistema cardiovascular, se sabe poco acerca de cómo entran en el cardiomiocito, si se acumulan en condiciones de isquemia y las consecuencias funcionales de su acúmulo.

Nos planteamos estudiar el papel del receptor lipoproteico de membrana LRP1 de los cardiomiocitos en la captación de colesterol y sus posibles

OBJETIVOS

consecuencias funcionales debido a que en nuestro grupo en estudio previos se identificó al LRP1 como el receptor de membrana selectivo de colesterol en las células musculares lisas vasculares de humanos (VSMC) [73]. Además el LRP1 está sobreexpresado por la hipoxia, a través del factor de transcripción HIF-1 α [228], y en condiciones de hipercolesterolemia, a través de la disminución del factor de transcripción SREBP-2.

Con estos antecedentes nos planteamos como hipótesis de trabajo de esta tesis que el receptor LRP1 debería estar sobreexpresado por la hipoxia y los lípidos siendo clave en la captación selectiva de colesterol procedente de lipoproteínas LDL y VLDL en cardiomiocitos isquémicos, lo que tendría serias repercusiones sobre la dinámica del calcio. Nuestros objetivos para confirmar la hipótesis fueron:

- 1) Analizar el efecto de la hipoxia en la expresión del LRP1 in vitro en cardiomiocitos ventriculares neonatales de rata (NRVM) y en la línea de células cardíaca HL-1 e in vivo en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio.
- 2) Observar el efecto de las lipoproteínas (LDL), a dosis hipercolesterolémicas, y las VLDL, a dosis hipertrigliceridémicas, en los niveles de expresión del LRP1 en el miocardio humano.
- 3) Estudiar el papel del LRP1 en la captación y acumulación lipídica intracelular derivada de VLDL y LDL en condiciones de normoxia e hipoxia en cardiomiocitos en cultivo y en tejido miocárdico humano estableciendo si es posible una correlación entre la expresión del receptor LRP1 y la acumulación lipídica.
- 4) Comprobar si la captación de lipoproteínas LDL, y su consecuente acumulación intracelular, modulan el manejo del calcio y la propagación de señales en los cardiomiocitos. Se comprobó la hipótesis de cómo afecta el colesterol de las

OBJETIVOS

lipoproteínas LDL sobre la dinámica del calcio, la expresión de SERCA2 y conexinas, y la propagación de señales en cultivos celulares de cardiomiocitos HL-1.

ARTÍCULOS

ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1

“Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates hypoxia-induced very low density lipoproteína-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes”

“El receptor Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) media la captación y acumulación, inducida por la hipoxia, de ésteres de colesterol derivados de VLDL en cardiomiocitos”

REVISTA: *Cardiovascular Research* 2012, 94, 469-479

Factor de impacto: 6.064

AUTORES: Roi Cal¹⁺, José Castellano¹⁺, Elena Revuelta-López¹, Rosa Aledo^{1,2}, Montse Barriga¹, Jordi Farré¹, Gemma Vilahur^{1,2}, Laura Nasarre¹, Leif Hove-Madsen¹, Lina Badimon^{1,2} and Vicenta Llorente-Cortés¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

²CIBER de Obesidad y Nutrición (CIBER-OBN), Instituto Carlos III, Madrid, España

⁺Coautores

RESUMEN:

Objetivos: En el miocardio se acumulan intracelularmente lípidos en condiciones de isquemia, y esta deposición grasa está asociada con la disfunción cardíaca. Nuestros objetivos fueron analizar el efecto de la hipoxia en la expresión del receptor *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) en cardiomiocitos

ventriculares neonatales de rata (NRVM) y en la línea de células cardíaca HL-1, así como los mecanismos involucrados; y estudiar el efecto de la hipoxia en los receptores lipoproteicos y en el perfil lipídico del miocardio en un modelo porcino *in vivo* de infarto agudo de miocardio.

Métodos y resultados: Resultados de cromatografía en capa fina (CCF) tras la extracción lipídica mostraron que la exposición a VLDL de las células HL-1 conlleva una acumulación de colesterol esterificado (CE) y triglicéridos (TG) de forma dosis dependiente, y ésta acumulación se ve incrementada en condiciones de hipoxia. El silenciamiento génico del receptor LRP1 mediante el uso de lentivirus previno la internalización de CE en células HL-1 y NRVM. La sobreexpresión del LRP1 inducida por lipopolisacárido (LPS) incrementó específicamente la acumulación de CE procedente de VLDL en células NRVM. Además mediante la aplicación de un doble marcaje radioactivo a colesterol y triglicéridos de VLDL, [³H]CE-[¹⁴C]TG-VLDL, encontramos que la deficiencia del LRP1 previno específicamente la captación inducida por hipoxia de VLDL-[³H]CE. Finalmente en un modelo porcino *in vivo* de infarto de miocardio, las áreas isquémicas exhibieron una regulación al alza del LRP1 y una sobreacumulación dentro del miocardio de CE.

Conclusión: Nuestros resultados demuestran que la hipoxia incrementa la expresión del LRP1 a través de HIF-1 α , y ésta sobreexpresión media la captación y acumulación de CE procedente de VLDL en los cardiomiocitos.

PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO: La directora de la tesis Vicenta Llorente Cortés da constancia de que el doctorando Roi Cal Pérez-Quevedo participó en la elaboración del diseño experimental, el aislamiento y cultivo tanto de cardiomiocitos neonatales de rata (NRVM) como de HL-1, la generación y cultivo de células HL-1 deficientes de LRP1, el aislamiento y doble marcaje radioactivo de

VLDL, el procesamiento de las muestras obtenidas de células HL-1 normales y radioactivas (PCR a tiempo real, Western Blot y CCF), los estudios de apoptosis, el análisis de resultados y la configuración y elaboración final del artículo. Mencionar que parte de este artículo fue incluido en la tesis doctoral de José A. Castellano que trabajó principalmente con el cultivo de NRVM, su tratamientos y procesamiento.

La directora: Vicenta Llorente Cortés



EUROPEAN
SOCIETY OF
CARDIOLOGY®

Cardiovascular Research
doi:10.1093/cvr/cvs136

Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes

Roi Cal^{1†}, José Castellano^{1†}, Elena Revuelta-López¹, Rosa Aledo^{1,2}, Montse Barriga¹, Jordi Farré¹, Gemma Vilahur^{1,2}, Laura Nasarre¹, Leif Hove-Madsen¹, Lina Badimon^{1,2}, and Vicenta Llorente-Cortés^{1*}

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni M^o Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain; and ²CIBER de Obesidad y Nutrición (CIBER-OBN), Instituto Carlos III, Madrid, Spain

Received 5 January 2012; revised 14 March 2012; accepted 23 March 2012

Aims

The myocardium accumulates intracellular lipids under ischaemic conditions, and myocardial fat deposition is closely associated with cardiac dysfunction. Our aims were to analyse the effect of hypoxia on low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) expression in neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) and cardiac-derived HL-1 cells and the molecular mechanisms involved in this effect, to determine the role of LRP1 in the very low density lipoprotein (VLDL) uptake by hypoxic cardiomyocytes, and to study the effect of hypoxia on lipoprotein receptor expression and myocardial lipid profile in an *in vivo* porcine experimental model of acute myocardial infarction.

Methods and results

Thin-layer chromatography after lipid extraction showed that VLDL exposure leads to cholesteryl ester (CE) and triglyceride (TG) accumulation in a dose-dependent manner and that hypoxic conditions further increased VLDL-derived intracellular lipid accumulation in HL-1 cells. Knockdown of LRP1 through lentiviral-mediated interfering RNA specifically prevented hypoxia-induced VLDL-CE internalization in HL-1 cells and NRVM. Lipopolysaccharide (LPS)-induced LRP1 overexpression specifically increased VLDL-CE accumulation in NRVM. In addition, using double-radiolabelled [³H]CE-[¹⁴C]TG-VLDL, we found that LRP1 deficiency specifically prevented hypoxia-induced VLDL-[³H]CE uptake. Finally, in an *in vivo* porcine model of infarcted myocardium, ischaemic areas exhibited LRP1 protein up-regulation and intramyocardial CE overaccumulation.

Conclusion

Our results demonstrate that hypoxia increases LRP1 expression through HIF-1 α and that LRP1 overexpression mediates hypoxia-induced VLDL-CE uptake and accumulation in cardiomyocytes.

Keywords

LRP1 • Cardiomyocytes • Cholesteryl esters • Hypoxia • HIF-1 α

1. Introduction

Cardiomyocytes accumulate intracellular lipids under pathological conditions such as diabetes,¹ obesity,² and ischaemia.^{3,4} Accumulation of fat in the heart has been associated with cardiac dysfunction and heart failure.⁵ Remarkably, a high prevalence of fat deposition has been found in areas of chronic myocardial infarction (MI) in humans.⁶ The patients with fat deposition had larger infarctions, decreased wall thickening, and impaired endocardial wall motion. In agreement, dyslipaemia has been shown to exacerbate the injury

in the ischaemic myocardium in different animal experimental models.⁷

Most of the energy requirements of a normal heart are supplied by fatty acid (FA) oxidation, a process closely coupled to FA uptake since cardiomyocytes have a limited capacity for triglyceride (TG) storage.⁸ In contrast to a normal heart, the ischaemic heart largely uses carbohydrate as an energetic source to optimize energy production.⁹ As a consequence, FAs that enter into the ischaemic cardiomyocytes are not used for energy production but are instead converted to TGs that accumulate intracellularly.¹⁰

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +34 935565888; fax: +34 935565559, E-mail: cllorente@csic-iccc.org

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2012. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

FAs are delivered to the heart by two sources, circulating non-esterified FAs bound to plasma albumin and circulating esterified FAs in the form of TG transported in TG-rich lipoproteins, such as very low density lipoproteins (VLDL) and chylomicrons (CM). VLDL and CM-derived TG may be taken up by the heart through at least two pathways: lipoprotein lipase (LpL)-mediated lipolysis^{11,12} and lipoprotein receptor-mediated endocytosis.¹³ In addition to acting as a TG source, VLDL is also a major source of cholesterol for the heart,¹⁴ an organ with a minimum capacity for cholesterol synthesis and LDL. However, it is still not clear whether cholesterol accumulates in the ischaemic heart and whether the lipoprotein receptors are involved in cholesterol uptake by the myocardium.

Myocardial cholesterol accumulation from TG-rich lipoproteins contributes to lipotoxic cardiomyopathy^{15,16} and causes systolic and diastolic dysfunction.¹⁷ Moreover, an inverse correlation has been shown between myocardial cholesterol levels and sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase-2 (SERCA-2) expression.¹⁷

We have previously identified low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) as a key receptor for selective cholesterol uptake by human vascular smooth muscle cells (VSMC).¹⁸ Interestingly, LRP1 is up-regulated by hypercholesterolaemia through sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) down-regulation and by hypoxia through HIF-1 α .¹⁹ The aims of this work were to analyse the effect of hypoxia on LRP1 expression in neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) and HL-1 cells and the molecular mechanisms involved in this effect, to determine the role of LRP1 in VLDL uptake by hypoxic cardiomyocytes, and to study the effect of hypoxia on lipoprotein receptor expression and myocardial lipid profile in an *in vivo* porcine experimental model of acute myocardial infarction (AMI).

2. Methods

An expanded Methods section is available in the Supplementary material online.

2.1 HL-1 cardiomyocyte cell culture

The murine HL-1 cell line was generated by Dr W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Centre, New Orleans, LA, USA) and kindly provided by Dr U. Rauch (Charité-Universitätmedizin Berlin). These cells show cardiac characteristics similar to those of adult cardiomyocytes.^{20,21}

2.2 NRVM isolation and culture

The study protocols were approved by the animal research committee of our institution (ICCC020/DMAH4711) and they were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. NRVM cultures were prepared from heart ventricles of 3–4-day old Wistar rats as previously described.²² Neonates were sacrificed by decapitation and the hearts were excised and both atria were removed. Cell suspensions were prepared using a neonatal cardiomyocyte isolation system (Worthington Biochemical Corporation) following the manufacturer's instructions.

2.3 Generation of LRP1-deficient cardiomyocytes

2.3.1 Design of LRP1 miRNA lentiviral vectors

Three different sequences of miR RNAi (XM_1919; _8223; and _8531) were designed to down-regulate LRP1 (accession number: XM_001056970) and cloned into pLent6.4-CMV-MSGW (Invitrogen). A universal insert-negative

control (Invitrogen, pcDNA™6.2-GW/miR-negative control) was also used (Supplementary material online, Figure S1A).

2.3.2 Lentiviral particle production

Lentiviral particle production was performed as previously described with some modifications.²³

2.3.3 LRP1-deficient cardiomyocytes generation

Lentivirus stocks and a negative control generated from the resulting constructs were titred by blastocidin selection.

2.4 *In vivo* experimental model of myocardial ischaemia

The pattern of myocardial lipoprotein receptor expression and myocardial neutral lipid accumulation was analysed in the myocardium of a group of male pigs (crossbred commercial pigs: Landrace–Largewhite). These animals are part of the experimental model used to analyse the molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodelling after AMI.²⁴ A sham-operated group of animals was used as control. The study protocol was approved by an institutional animal research committee and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No 85–23, revised 1996). Twelve hours prior to the experimental induction of acute MI (AMI), a loading dose of clopidogrel (150 mg/kg) was administered to all animals. Haemodynamic parameters, ECG, and body temperature were monitored throughout the experimental procedure to ensure a proper deep plane of anaesthesia. Anaesthesia was induced by the intramuscular injection of Zoletil® (tiletamine and zolazepam) (7 mg/kg), Dormitory® (medetomidin) (7 mg/kg), and atropine (0.03 mg/kg). Animals underwent endotracheal intubation, and anaesthesia was maintained by isoflurane inhalation (1.5–2%). A continuous infusion of amiodarone (300 mg, 75 mg/h) was initiated at the beginning of the procedure in all pigs as a prophylaxis for malignant ventricular arrhythmias. Angiographic images were used to guide the angioplasty balloon placement (below the first diagonal branch). The angioplasty balloon (2.5–3 mm) was inflated at nominal pressure (complete occlusion of the LAD was verified by fluoroscopy). Occlusion was maintained for 90 min, and oxygen levels and the ECG were monitored throughout the surgical procedure. The site of occlusion was immediately distal to the origin of the first diagonal branch. At the end of the ischaemic period, animals were sacrificed by an overdose of KCl while anaesthetized. Following sacrifice, heart samples from the necrotic border in the ischaemic septal zone vs. that from the left ventricle free-wall, non-ischaemic/remote myocardium, were used for molecular analysis.

2.5 VLDL preparation

Human VLDL ($d_{1.001} - d_{1.019}$ g/mL) were obtained from pooled sera of normocholesterolaemic volunteers.

2.6 Lipid extraction and determination of cholesteryl ester, free cholesterol, and TG content of cardiomyocytes and myocardium

Cells were exhaustively washed and harvested in NaOH 0.1 M following the VLDL incubation period. In the animal experimental model, one portion of myocardial tissue (5 mg) was also homogenized in NaOH 0.1 M. Lipids were extracted as previously described,^{18,25} and cholesteryl ester (CE), free cholesterol (FC), and TG content was analysed by thin-layer chromatography. See Supplementary material online, Methods for more details.

2.7 Preparation of double-radiolabelled VLDL particles and determination of VLDL uptake by cardiomyocytes

Double-radiolabelled [^3H]CE-[^{14}C]TG-VLDLs were obtained by a previously described method with small modifications.¹⁸

2.8 Small interference RNA-mediated gene silencing of HIF-1 α in HL-1 cells

To inhibit HIF-1 α expression, HL-1 cells were transiently transfected with HIF-1 α -specific small interference RNA (siRNA) acquired from Applied Biosystems (siRNA ID 4390815). An siRNA-random was used as a negative control (Ambion AM 4636) in cellular transfections.

2.9 Constructions for luciferase reporter gene assay and site-directed mutagenesis

The construction and mutation of LRP1 promoter in a luciferase reporter plasmid and the transient transfection assays were performed as previously described in HeLa cells.¹⁹

2.10 Real-time PCR

mRNA expression of LRP1, VLDL receptor (VLDLR), LDLR, SREBP-1, SREBP-2, Bcl-2, and BAX was assessed by real-time PCR.

2.11 Western blot

Proteins were analysed by western blot analysis. See Supplementary material online, Methods for more details.

2.12 Apoptosis detection

Apoptotic cells were visualized using the ApoptTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International, S7165) following the manufacturer's instructions.

2.13 Intracellular calcium handling

To detect changes in intracellular calcium handling, control and LRP1-deficient HL-1 cells previously exposed to VLDL (1.8 mM, 18 h) were loaded with fluo-4 as previously described.²² Calcium was assessed in a $1 \times 1 \text{ mm}^2$ of the cell culture, using a resonance scanning confocal microscope (Leica SP5 AOBS) with a $10\times$ objective. Cell cultures were loaded with $2.5 \mu\text{M}$ fluo-4AM for 15 min at RT followed by 30 min of de-esterification. Fluo-4 was excited at 488 nm, with the laser intensity set to 20%. To induce Ca^{2+} overload, Ca^{2+} was increased to 5 mM, and mannitol 2.2% (v/v) was added to maintain normo-osmolality (312 mOsm). Cells were subjected to electrical field stimulation using square pulses of 5 ms duration and with the voltage set at 1.5 times the stimulation threshold. The electrodes were at a distance of 100–200 μm from the imaging field. Calcium transient amplitude was evaluated at 0.5 Hz.

2.14 Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean \pm SEM.

3. Results

3.1 Effect of hypoxia on LRP1, VLDLR, and LDLR mRNA expression in NRVM and HL-1 cells

The effect of hypoxia on lipoprotein receptor expression was analysed at the mRNA level by real-time PCR and at the protein level by western blot analysis. As shown in Figure 1A, hypoxia increased LRP1 mRNA (from 1.6-fold at 4 h to 2.7-fold at 16 h) and VLDLR mRNA (from 2.8-fold at 4 h to 4-fold at 16 h) and decreased LDLR mRNA expression (from 10% at 4 h to 52% at 16 h) in a

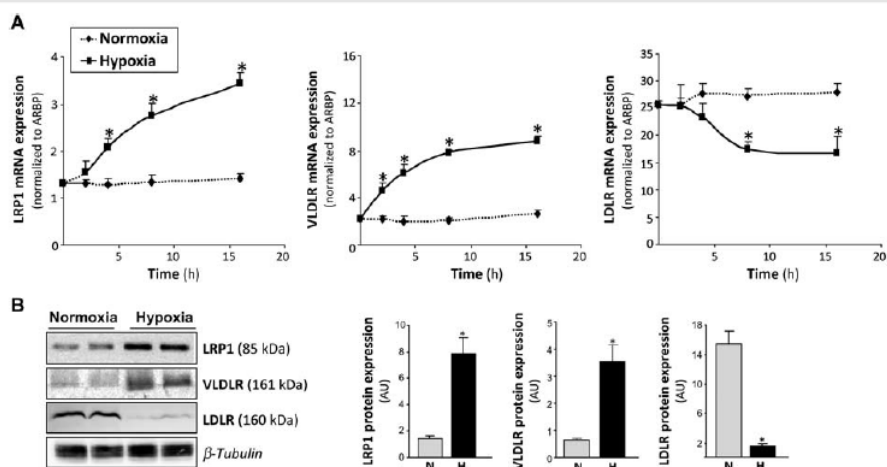


Figure 1 Effect of hypoxia on LRP1, VLDLR, and LDLR expression in HL-1 cardiomyocytes. (A) Real-time PCR quantification of LRP1, VLDLR, and LDLR mRNA levels in cells exposed to normoxia or hypoxia for increasing times. Data were processed with specially designed software based on threshold cycle (Ct) values, normalized to ARBP mRNA levels, and expressed as mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells. (B) Western blot analysis and bar graph quantification of LRP1, VLDLR, and LDLR bands in HL-1 cardiomyocytes exposed to normoxia or hypoxia for 24 h: unchanged levels of β -tubulin were used as a loading control. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells.

Table 1 Effect of hypoxia on SREBP-1 and SREBP-2 mRNA levels in HL-1 cells

	SREBP-1	SREBP-2
Normoxia	3.50 ± 0.22	2.93 ± 0.18
Hypoxia	1.30 ± 0.13*	1.02 ± 0.09*

HL-1 cells were exposed to normoxia or hypoxia for 24 h. SREBP-1 and SREBP-2 mRNA expression levels were analysed by real-time PCR. Data were processed with specially designed software based on threshold cycle (Ct) values, normalized to ARBP mRNA levels, and expressed as mean ± SEM of three experiments performed in duplicate.

*P < 0.05 vs. normoxic HL-1 cells.

time-dependent manner in HL-1 cells. As shown in Table 1, hypoxia significantly reduced SREBP-1 and SREBP-2 mRNA expression levels to ~60%. In agreement with real-time PCR results, western blot analysis showed that hypoxia (24 h) strongly up-regulated LRP1 and VLDLR protein expression in HL-1 (Figure 1B) and NRVM (Supplementary material online, Figure S1) cardiomyocytes. In contrast, hypoxia down-regulated LDLR protein expression in both HL-1 (Figure 1B) and NRVM cardiomyocytes (Supplementary material online, Figure S1).

3.2 Role of HIF-1 α on LRP1 up-regulation induced by hypoxia in HL-1 cells

In order to investigate the involvement of HIF-1 α in LRP1 up-regulation by hypoxia, we inhibited HIF-1 α expression by nucleofection with specific siRNA-HIF-1 α . siRNA-HIF-1 α but not siRNA-random completely prevented the 3.8-fold increase in HIF-1 α protein levels induced by hypoxia in HL-1 cells (Figure 2A, left panel). Hypoxia did not exert an effect on LRP1 protein expression (Figure 2A, right panel) in HIF-1 α -deficient cells but it significantly increased LRP1 expression in control and siRNA-random-treated HL-1 cells. As shown in Figure 2B, real-time PCR results showed that siRNA-HIF-1 α efficiently prevented LRP1 and VLDLR mRNA overexpression induced by hypoxia. In contrast, HIF-1 α inhibition did not show any significant effect on the down-regulatory effect of hypoxia on LDLR expression.

Previous studies from our group showed that human LRP1 promoter contains two HRE-binding sites (HRE-1 from -1072 to -1069 and HRE-2 from -695 to -692).¹⁹ In order to investigate the role of HRE-1 and HRE-2 sites in the hypoxic modulation of the LRP1 promoter, we performed transient transfection of HL-1 cells using LRP1 promoter constructions with the two HRE sites (from -1305 to +341), without the HRE-1 site, without the HRE-2 site, and without any HRE site. As shown in Figure 2C, hypoxia (24 h) increased the transcriptional activity of the wild LRP1 promoter by 2.4-fold and that of the HRE-1 or HRE-2 mutated LRP1 promoter by 1.7-fold and 1.6-fold, respectively. Hypoxia had no effect on the construction without HRE sequences. These results demonstrate that HIF-1 α mediates the induction of LRP1 transcription in hypoxic HL-1 cells.

3.3 Effect of VLDL on intracellular lipid accumulation in normoxic and hypoxic HL-1 cells

As previously reported in NRVM cardiomyocytes,²² VLDL increased both intracellular CE (from 6.7 ± 2.2 to 77.6 ± 8.8 $\mu\text{g CE/mg cell}$

protein) and TG (from 2.5 ± 0.2 to 69.2 ± 3.0 $\mu\text{g TG/mg cell protein}$) content of HL-1 cells (Figure 3A) in a dose-dependent manner. Hypoxic conditions further increased VLDL-derived intracellular CE (to 110.5 ± 1.6 $\mu\text{g CE/mg cell protein}$) and TG accumulation (to 80.5 ± 3.9 $\mu\text{g TG/mg cell protein}$). However, in contrast to the effect of hypoxia per se on the TG content of NRVM,²² hypoxia per se had no effect on the TG content of HL-1 cells. In agreement with these data, confocal microscopy (Figure 3B) showed higher Dil-VLDL uptake in hypoxic than in normoxic HL-1 cells. As shown in Figure 3C, apoptosis was undetectable in normoxic and hypoxic HL-1 cells unexposed or exposed to VLDL, although it was clearly detected in the positive control (HL-1 treated with H₂O₂).

3.4 Effect of LRP1 deficiency in VLDL-CE and VLDL-TG intracellular accumulation induced by hypoxia in HL-1 cells and NRVM cardiomyocytes

In order to know the involvement of LRP1 on VLDL uptake and VLDL-derived intracellular lipid accumulation, three miR RNAi (RNAi1919, RNAi8223, and RNAi8531) (Supplementary material online, Figure S2A) were tested to target LRP1. RNAi1919 and RNAi8531 showed similar ability to reduce LRP1 mRNA expression in hypoxic NRVM and HL-1 cardiomyocytes (Supplementary material online, Figure S2B). We selected RNAi8531 (RNAi-LRP1) to knock-down LRP1 expression.

RNAi-LRP1 treatment significantly prevented the hypoxia-induced LRP1 protein up-regulation in both HL-1 (Figure 4A) and NRVM cardiomyocytes (Supplementary material online, Figure S3A) (either unexposed or exposed to VLDL). In contrast, VLDLR or LDLR expression was unaltered in hypoxic cells subjected to RNAi-LRP1 treatment. This treatment did not alter the low levels of LRP1 protein expression in normoxic cells.

Both control and RNAi-LRP1-treated HL-1 cells showed undetectable levels of intracellular CE (Figure 4B, left panel) and TG (Figure 4B, right panel) in the absence of VLDL. However, NRVM cardiomyocytes (control or RNAi-LRP1 treated) showed basal levels of intracellular TG that were increased 1.3-fold by hypoxia (Supplementary material online, Figure S3B, right panel). In the presence of VLDL, the intracellular lipid profile in LRP1-deficient cells was different from that in control cells when exposed to hypoxia. LRP1 deficiency almost completely prevented hypoxia-induced VLDL-derived CE overaccumulation in HL-1 cells (Figure 4B, left panel) and NRVM cardiomyocytes (Supplementary material online, Figure S3B, left panel). Nevertheless, LRP1 deficiency did not show any effect on the hypoxia-induced VLDL-derived TG accumulation in HL-1 cells (Figure 4B, right panel) or NRVM cardiomyocytes (Supplementary material online, Figure S3B, right panel). These results suggest that LRP1 up-regulation is essential for intracellular VLDL-derived CE accumulation in hypoxic cardiomyocytes.

In order to explore the role of LRP1 in VLDL-CE accumulation through a different approach, we attempted to overexpress LRP1. Previous studies showed that LRP1 may be up-regulated by lipopolysaccharides (LPS) in neurons²⁶ and by angiotensin II in human VSMC.²⁷ Here, LPS that significantly induced LRP1 protein expression in NRVM cardiomyocytes (Supplementary material online, Figure S3C) specifically increased intracellular VLDL-derived CE accumulation by 1.6-fold (Supplementary material online, Figure S3D). However, LPS did not alter the intracellular VLDL-TG accumulation (Supplementary material online, Figure S3D) in these cells. Therefore, these results

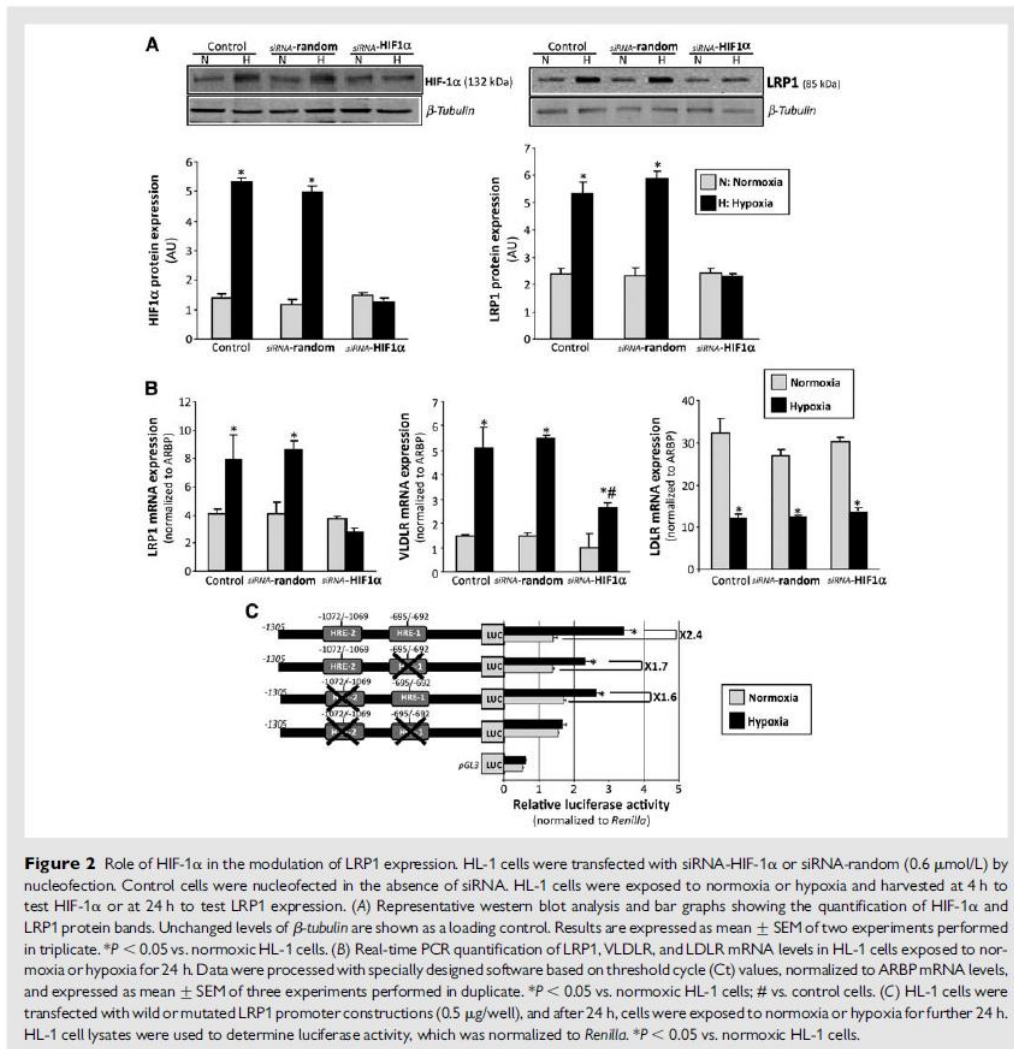


Figure 2 Role of HIF-1 α in the modulation of LRP1 expression. HL-1 cells were transfected with siRNA-HIF-1 α or siRNA-random (0.6 μ mol/L) by nucleofection. Control cells were nucleofected in the absence of siRNA. HL-1 cells were exposed to normoxia or hypoxia and harvested at 4 h to test HIF-1 α or at 24 h to test LRP1 expression. (A) Representative western blot analysis and bar graphs showing the quantification of HIF-1 α and LRP1 protein bands. Unchanged levels of β -tubulin are shown as a loading control. Results are expressed as mean \pm SEM of two experiments performed in triplicate. * P < 0.05 vs. normoxic HL-1 cells. (B) Real-time PCR quantification of LRP1, VLDLR, and LDLR mRNA levels in HL-1 cells exposed to normoxia or hypoxia for 24 h. Data were processed with specially designed software based on threshold cycle (Ct) values, normalized to ARBP mRNA levels, and expressed as mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate. * P < 0.05 vs. normoxic HL-1 cells; # vs. control cells. (C) HL-1 cells were transfected with wild or mutated LRP1 promoter constructions (0.5 μ g/well), and after 24 h, cells were exposed to normoxia or hypoxia for further 24 h. HL-1 cell lysates were used to determine luciferase activity, which was normalized to *Renilla*. * P < 0.05 vs. normoxic HL-1 cells.

confirm that LRP1 when overexpressed contributes to VLDL-CE uptake by cardiomyocytes.

3.5 Effect of LRP1 deficiency in [3 H]CE-[14 C]TG-VLDL uptake in hypoxic HL-1 cells

A more sensitive lipid uptake analysis was carried out with radiolabelled VLDL. The involvement of LRP1 in [3 H]-CE and [14 C]-TG uptake was analysed by determining [3 H] and [14 C] counts per minute (c.p.m.) associated with control and LRP1-deficient HL-1

cells. The specific activity of double-radiolabelled VLDL was 439 ± 53.5 c.p.m. [3 H]/ μ g VLDL prot and 87 ± 15 c.p.m. [14 C]/ μ g VLDL prot. As shown in Figure 5A, the increased [3 H]-CE uptake induced by hypoxia (2.3-fold) in control HL-1 cells was completely prevented in LRP1-deficient cells. In contrast, the increased [14 C]-TG uptake induced by hypoxia (1.3-fold) was similar in control and LRP1-deficient cells (Figure 5B). The [3 H]/[14 C] ratio in double-radiolabelled VLDL was 5 ± 0.8 . As shown in Figure 5C, the low CE/TG uptake (1.04 ± 0.19) in normoxic HL-1 was increased by 2-fold by hypoxia in control but not in LRP1-deficient cells. In order to know whether increased VLDL-CE uptake was an unspecific

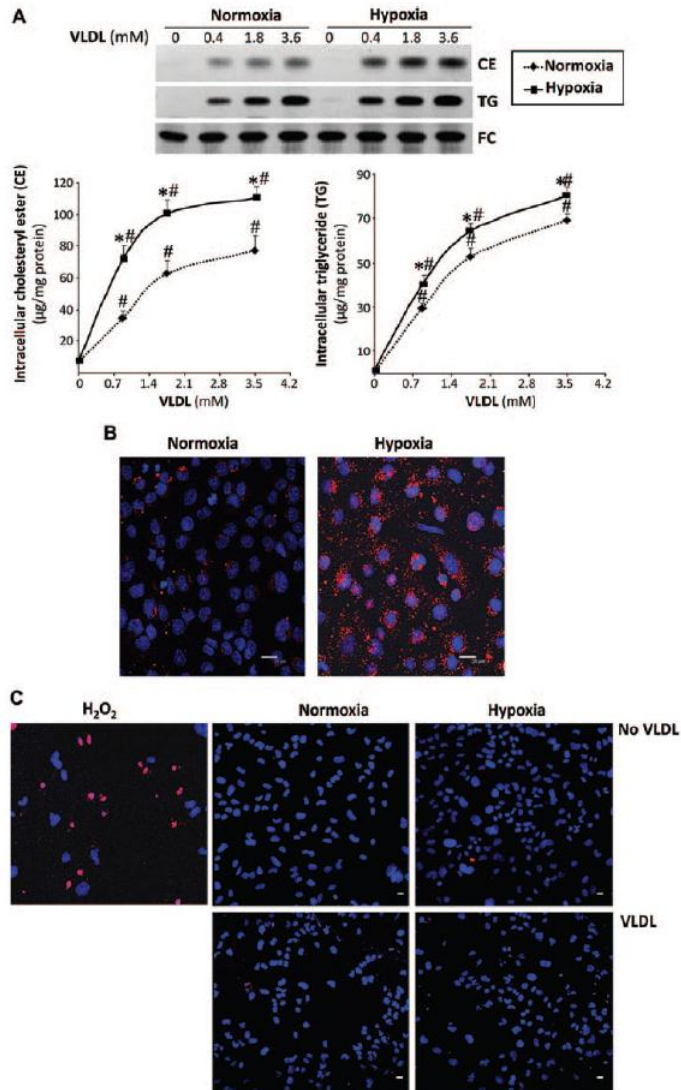


Figure 3 Effect of VLDL on intracellular lipid accumulation in normoxic and hypoxic HL-1 cells. (A) HL-1 cells were exposed to increasing VLDL concentrations under normoxic or hypoxic conditions as explained in Methods. Thin-layer chromatography showing intracellular CE, TG, and FC bands, and line graphs showing their quantification in normoxic (dotted line) and hypoxic (continuous line) HL-1 cardiomyocytes. Results were expressed as micrograms of cholesterol or TG per milligram of protein and shown as the mean of three experiments performed in duplicate (deviations < 5% from the mean do not appear in the computer-originated graphs). * $P < 0.05$ vs. normoxic HL-1; # $P < 0.05$ vs. VLDL-unexposed HL-1. (B) HL-1 cells were incubated with Dll-VLDL (1.8 mM) for 24 h. Cells were then exhaustively washed, fixed, and photographed using confocal microscopy. (C) Confocal microscopy detection of cell death in control or VLDL (1.8 mM)-exposed HL-1 cells, using the ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit. Scale bar 20 μ m.

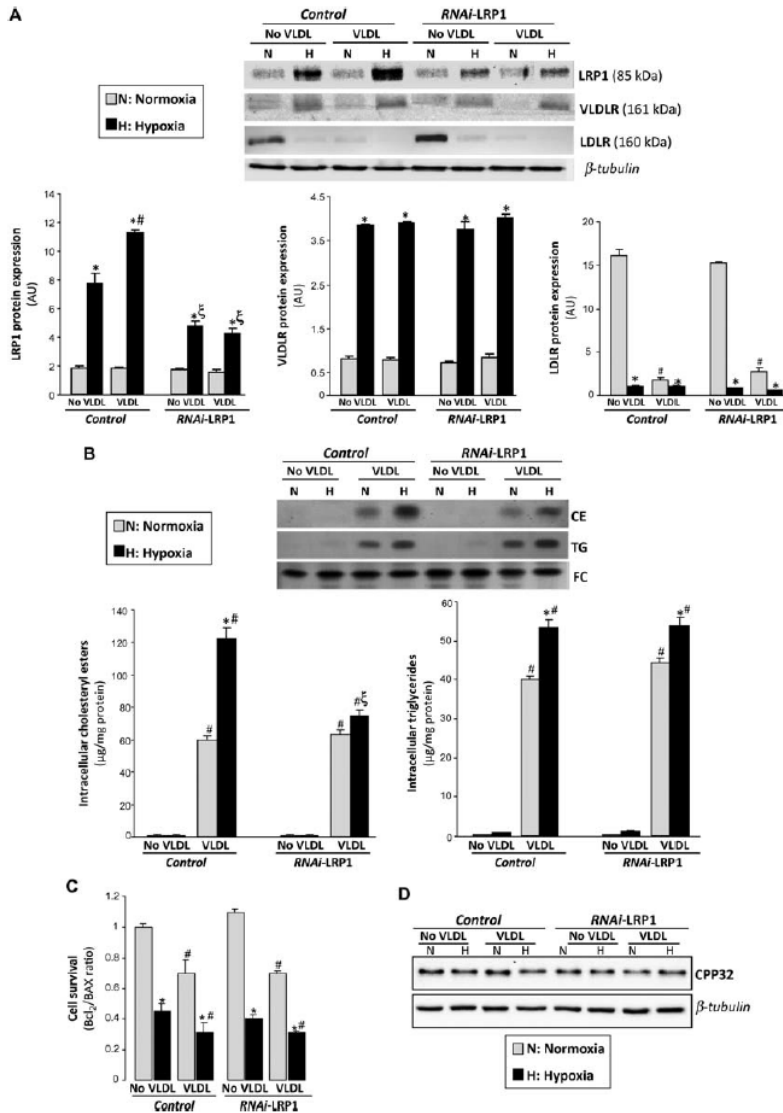
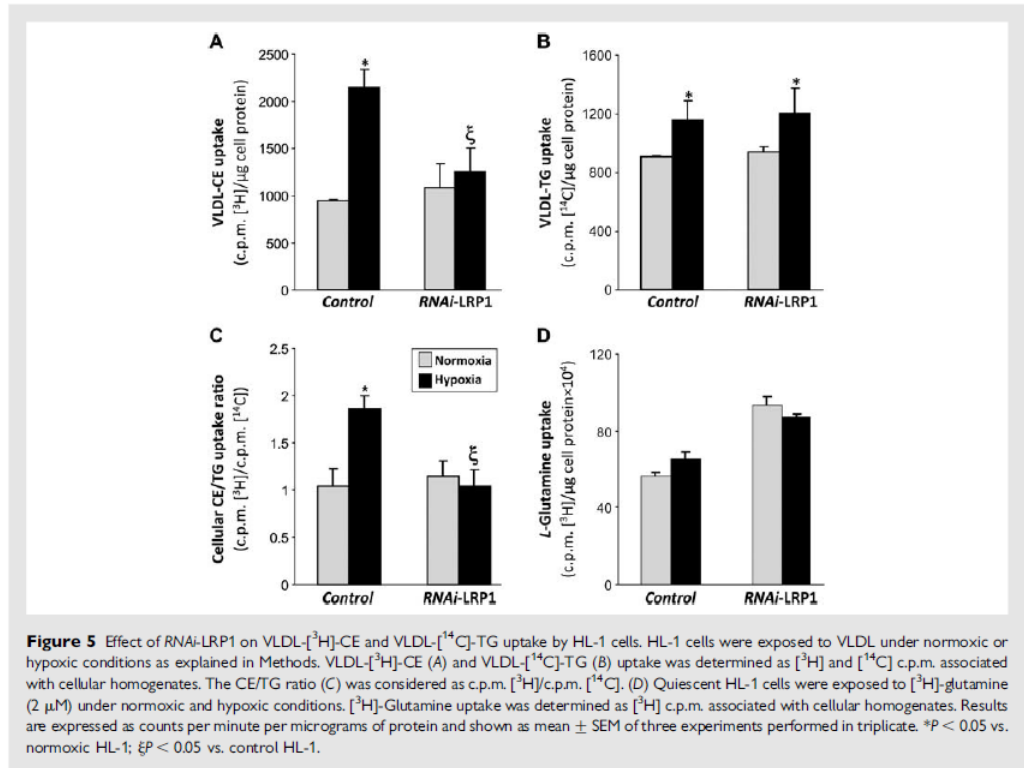


Figure 4 Effect of RNAi-LRP1 on lipoprotein expression and VLDL-derived intracellular lipid profile in normoxic and hypoxic HL-1 cells. HL-1 cells were exposed to VLDL (1.8 mM) under normoxic or hypoxic conditions as explained in Methods. (A) Western blot analysis and bar graphs showing the quantification of LRP1, VLDLR, and LDLR. Unchanged levels of β -tubulin are shown as a loading control. Results are expressed as mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate. (B) Thin-layer chromatography showing CE, TG, and FC bands, and histograms with their quantification. Results are expressed as micrograms per milligram of protein and shown as mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate. (C) The ratio between Bcl2 and BAX mRNA expression was considered the cell survival ratio. Data are shown as a percentage of control cells and expressed as mean \pm SEM of four experiments performed in duplicate. (D) Representative western blot showing caspase-3 (CPP32) protein expression. Unchanged levels of β -tubulin are shown as a loading control. * $P < 0.05$ vs. normoxic cells; # $P < 0.05$ vs. VLDL-unexposed cells; &#math;P < 0.05 vs. control cells.



effect due to starved conditions, we analysed the uptake of L- ^{3}H -glutamine in our experimental settings. Our results showed that neither hypoxia nor RNAi-LRP1 altered L- ^{3}H -glutamine uptake in HL-1 cells (Figure 5D), suggesting that the observed changes in VLDL uptake are unrelated to starvation.

3.6 Effect of LRP1 deficiency on cell survival and calcium handling

To test the viability of the cell culture, we evaluated the balance between intracellular mRNA levels of an apoptotic marker (BAX) and a survival marker (Bcl2). VLDL or hypoxia significantly decreased Bcl2/BAX ratio (Figure 4C) but not caspase-3 (CPP32) expression (Figure 4D), suggesting that VLDL and hypoxia did not induce cellular apoptosis, although they may reduce the survival capacity of HL-1 cells in agreement with previous results in NRVM cardiomyocytes.²² RNAi-LRP1 treatment did not influence HL-1 cell survival.

As shown in Supplementary material online, Figure S4, VLDL-exposed HL-1 cells either unstimulated or stimulated (centre panel) were more prone to present waves and irregular responses compared with VLDL-unexposed HL-1 cells (left panel), as previously shown in NRVM cardiomyocytes.²² The percentage of waves increased in calcium-overloaded unstimulated (centre panel, up) but not in stimulated HL-1 cardiomyocytes (centre panel, down).

VLDL-exposed LRP1-deficient HL-1 cells (right panel), either unstimulated or stimulated, showed a reduced percentage of waves and irregular responses compared with control HL-1 cells (centre panel). However, the percentage of not responding cells was much higher in LRP1-deficient cells (right panel) than in control cells (centre panel). In agreement, the percentage of not responding was increased, whereas the percentage of waves was reduced in calcium-overloaded-LRP1-deficient HL-1 cells under stimulation.

3.7 Effect of acute ischaemia induced by coronary balloon occlusion on lipoprotein receptor pattern and neutral lipid profile in the porcine myocardium

In order to test whether the findings obtained *in vitro* could be translated to the ischaemic heart, we used a porcine experimental model of acute ischaemia. First, LRP1 and VLDLR expression was determined in non-ischaemic (remote myocardial zone) and ischaemic (peri-necrotic myocardium or penumbra) regions in the myocardium of infarcted and sham-operated animals (Figure 6A) by western blot analysis. LRP1 protein expression was significantly increased in the ischaemic myocardium (5.68-fold vs. sham; $P < 0.05$) (Figure 6A, left panel). Although to a minor extent, VLDLR protein was also significantly increased in the ischaemic zone (2.15-fold vs. sham; $P < 0.05$)

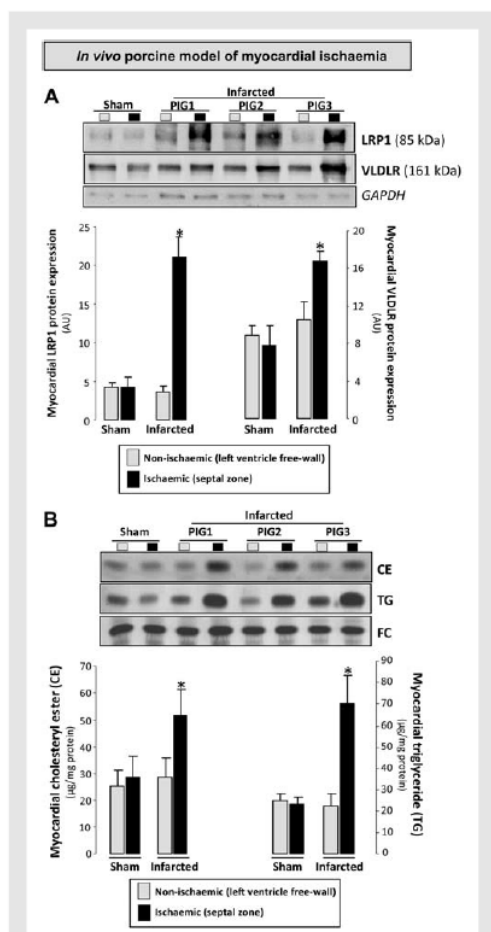


Figure 6 Effect of ischaemia on lipoprotein receptor expression pattern and neutral lipid profile in the ischaemic and non-ischaemic porcine myocardium. Frozen tissue from non-ischaemic (white bars) and ischaemic (black bars) myocardium from sham-operated animals ($n = 3$) and animals subjected to 90 min of ischaemia by coronary balloon occlusion ($n = 6$) was pulverized and homogenized. (A) Western blot analysis showing LRP1 and VLDLR bands, and bar graphs showing LRP1 and VLDLR quantification. Unchanged levels of GAPDH are shown as a loading control. (B) Thin-layer chromatography shows CE, TG, and FC bands. The data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. non-ischaemic myocardium and sham-operated animals.

(Figure 6A, right panel). We also evaluated the effect of ischaemia on myocardial CE, TG, and FC content analysed using thin-layer chromatography after lipid extraction (Figure 6B). Both CE (Figure 6B, left panel) and TG (Figure 6B, right panel) were strongly up-regulated in the ischaemic area of the myocardium (2-fold and 2.84-fold increase,

respectively, vs. sham; $P < 0.05$), whereas no differences were observed in the neutral lipid content of the non-ischaemic area and sham.

4. Discussion

Our results demonstrate that (i) hypoxia up-regulates LRP1 and VLDLR whereas down-regulates LDLR in cardiomyocytes, (ii) hypoxia up-regulates LRP1 expression through HIF-1 α in HL-1 cells, and (iii) LRP1 overexpression mediates hypoxia-induced VLDL-CE uptake and accumulation in cardiomyocytes. In addition, both LRP1 expression and CE levels are up-regulated in the ischaemic myocardium of an *in vivo* porcine model of AMI.

The current study shows that hypoxia up-regulates LRP1 through HIF-1 α in HL-1 cells, as previously shown in human VSMC.¹⁹ In agreement with previous results,²⁸ we also found that HIF-1 α is key for the hypoxic modulation of VLDLR in HL-1 cells. Therefore, LRP1 and VLDLR share a common mechanism of transcriptional activation by hypoxia and this may explain the huge myocardial LRP1 and VLDLR up-regulation that we have found in the porcine model of AMI. In contrast to the clear role of HIF-1 α on LRP1 and VLDLR overexpression, this transcription factor does not seem to play a role in LDLR down-regulation. In fact, LDLR down-regulation may be explained by the SREBP-1 and SREBP-2 decay in hypoxic HL-1 cells, as previously reported in hypoxic human VSMC.¹⁹

Niu *et al.*²⁹ demonstrated that cholesterol uptake from remnants of TG-rich lipoproteins was strongly reduced by suramin (an unspecific inhibitor of the LDL receptor superfamily) in a perfused heart model. In the present study, we found that LRP1 is crucial for selective CE uptake and accumulation in hypoxic cardiomyocytes. These results are in agreement with the role of LRP1 mediating CE selective uptake from lipoproteins^{18,30} due to LRP1 capacity to move to caveolae, patches of the sarcolemmal membrane that act as acceptors of CEs.³¹ In addition, LRP1 and proteoglycans, which are up-regulated by hypoxia,³² cooperate to mediate ligand uptake.³³ In contrast to the strong impact of LRP1 inhibition on VLDL-CE uptake in hypoxic cardiomyocytes, LRP1 deficiency did not exert any significant effect on VLDL-TG uptake or VLDL-TG accumulation. These results show that VLDL-CE uptake occurs via a different mechanism than VLDL-TG uptake. Previous studies showed that CD36 is involved in myocardial VLDL-TG uptake.¹⁴ CD36 is up-regulated by hypoxia³⁴ and it may thus participate in the increased FA uptake and TG accumulation under ischaemia. A recent study points to VLDLR as an essential receptor for TG accumulation in hypoxic HL-1 cells and in the ischaemic myocardium.²⁸ VLDLR closely interacts with LpL,¹¹ which plays a major role in VLDL uptake by the heart.^{14,28} Moreover, LpL and VLDLR activities correlate, have a similar tissue-specific expression and distribution,^{13,15} and are increased by hypoxia in the cardiomyocyte.^{22,28,35} Therefore, it is plausible that LpL and VLDLR participate in hypoxia-induced VLDL-CE accumulation. Further experiments aimed at establishing the precise contribution of LpL, VLDLR, and LRP1 in myocardial VLDL-CE uptake in pathophysiological situations will be extremely relevant for preventing the deleterious effects of TG and CE delivery to the heart.

Our data show that increased intracellular neutral lipid accumulation does not induce cardiomyocyte apoptosis in short incubation periods. Similar results have been previously reported in lipid-loaded human VSMC¹⁹ and HL-1 cells.²⁸ However, hypoxia and lipids probably induce cell death at longer exposure periods. Indeed, in the

context of diabetes/obesity, a strong TG accumulation has been correlated with cell death²⁸ and diastolic dysfunction in animal models^{36,37} and also in type 2 diabetes mellitus patients.³⁸ In the context of ischaemia, TG accumulation promotes cardiac ER stress.²⁸ The deleterious effects of myocardial lipids both in obesity/diabetes and in ischaemia have been exclusively ascribed to TG, assuming that these are the only neutral lipids accumulated in cardiomyocytes. It has been reported that TG-rich lipoproteins such as VLDL deliver both TG and CE to cardiomyocytes^{14,28} and that hypoxia increases both VLDL-TG and VLDL-CE delivery to neonatal cardiomyocytes.²² In the present study, we show that myocardial neutral lipid includes both TG and CE in a porcine model of acute ischaemia. Therefore, we consider that this assumption should be revised and that most of the deleterious effects of neutral lipid deposition 'lipotoxic effects' may not only be caused by TG but also by myocardial CE. Relevant studies have shown that myocardial cholesterol contributes to lipotoxic cardiomyopathy^{15,16} and that it is the cause of systolic and diastolic dysfunction.¹⁷ In fact, an inverse correlation between myocardial cholesterol levels and SERCA-2 expression has been shown.¹⁷ Our group has recently demonstrated that SERCA-2 plays a crucial role in the hypoxic potentiation of calcium handling disturbances induced by VLDL.²² Taken together, these results suggest that LRP1 may be a target in order to prevent ischaemic myocardial functional alterations associated with intracellular cholesterol accumulation in cardiomyocytes. Results from the present study show that although LRP1 inhibition reduces VLDL-induced waves and irregular responses, LRP1 deficiency increases the percentage of inactive cells and worsens HL-1 resistance to calcium overload. These results are in agreement with the pivotal role of LRP1 as a signal-transducing receptor that mobilizes lipoprotein intracellular release.³⁹ Indeed, the impairment of LRP1 cholesterol carrier function without altering LRP1 essential signal transduction is the better strategy to prevent hypoxia-induced CE accumulation.

Cardiomyocytes in the peri-infarct zone become markedly overloaded with neutral lipids¹⁰ that are key determinants for the transition from reversible to irreversible acute myocardial injury and for arrhythmias.⁴⁰ Therefore, our results should be considered for designing efficient strategies to prevent cardiac alterations derived from myocardial cholesterol accumulation.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

The authors thank the continuous support of Dr Laura Casaní and Martánez.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was funded by grants from Instituto Salud Carlos III; CIBER-OBN03/2006, REDINSCOR (RD06/0003/0000 and RD06/0003/0015); FIS PI080351 co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (F.E.D.E.R.); and by Fundació MARATÓ TV3 Project 080110. L.B., V.L.-C., and J.C. are members of the international graduate programme PROMISE (IRTG-1566), supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft

(Bonn, Germany). G.V. is recipient of a Ramon y Cajal contract (RyC-2009-05495 MICINN).

References

1. Feuray D, Darmellah A. Diabetes-related metabolic perturbations in cardiac myocyte. *Diabetes Metab* 2008;**34**:53–59.
2. Glenn DJ, Wang F, Nishimoto M, Cruz MC, Uchida Y, Holleran WM et al. A murine model of isolated cardiac steatosis leads to cardiomyopathy. *Hypertension* 2011;**57**: 216–222.
3. Balschi JA, Hai JO, Wolkowicz PE, Straeter-Knowlen I, Evanochko WT, Caulfield JB et al. 1H NMR measurement of triacylglycerol accumulation in the post-ischemic canine heart after transient increase of plasma lipids. *J Mol Cell Cardiol* 1997;**29**: 471–480.
4. Straeter-Knowlen IM, Evanochko WT, den Hollander JA, Wolkowicz PE, Balschi JA, Caulfield JB et al. 1H NMR spectroscopic imaging of myocardial triglycerides in excised dog hearts subjected to 24 hours of coronary occlusion. *Circulation* 1996;**93**:1464–1470.
5. Schäfer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003;**14**:281–287.
6. Goldfarb JW, Roth M, Han J. Myocardial fat deposition after left ventricular myocardial infarction: assessment by using MR water-fat separation imaging. *Radiology* 2009;**253**:65–73.
7. Osipov RM, Bianchi C, Feng J, Clements RT, Liu Y, Robich MP et al. Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. *Circulation* 2009;**120**:S22–S30.
8. Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 1994;**19**:59–113.
9. Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res* 2003;**34**:89–99.
10. Bilheimer DW, Buja LM, Parkey RW, Bonte FJ, Willers on JT. Fatty acid accumulation and abnormal lipid deposition in peripheral and border zones of experimental myocardial infarcts. *J Nucl Med* 1978;**19**:276–283.
11. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002;**43**:1997–2006.
12. Augustus AS, Kako Y, Yagyu H, Goldberg IJ. Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;**284**:E331–E339.
13. Kamataki A, Takahashi S, Masamura K, Iwasaki T, Hattori H, Naiki H et al. Remnant lipoprotein particles are taken up into myocardium through VLDL receptor—a possible mechanism for cardiac fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;**293**:1007–1013.
14. Bharadwaj KG, Hiyama Y, Hu Y, Huggins LA, Ramakrishnan R, Abumrad NA et al. Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake. *J Biol Chem* 2010;**285**:37976–37986.
15. Yagyu H, Chen G, Yokoyama M, Hirata K, Augustus A, Kako Y et al. Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2003;**111**:419–426.
16. Pillutla P, Hwang YC, Augustus A, Yokoyama M, Yagyu H, Johnston TP et al. Perfusion of hearts with triglyceride-rich particles reproduces the metabolic abnormalities in lipotoxic cardiomyopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;**288**:E1229–E1235.
17. Huang Y, Walker KE, Hanley F, Narula J, Houser SR, Tulenko TN. Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. *Circulation* 2004;**109**:97–102.
18. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Camino-Lopez S, Costales P, Badimon L. Cholesterol esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:117–123.
19. Castellano J, Aledo R, Sendra J, Costales P, Juan-Babot O, Badimon L et al. Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:1411–1420.
20. Claycomb WC, Larson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:2979–2984.
21. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H823–H829.
22. Castellano J, Farre J, Ferrnades J, Bayes-Genis A, Cinca J, Badimon L et al. Hypoxia exacerbates Ca(2+)-handling disturbances induced by very low density lipoproteins (VLDL) in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:894–902.
23. Vilalta M, Jørgensen C, Degano IR, Chernajovsky Y, Gould D, Noel D et al. Dual luciferase labelling for non-invasive bioluminescence imaging of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in demineralized bone matrix scaffolds. *Biomaterials* 2009;**30**:4986–4995.
24. Vilahur G, Juan-Babot O, Pena E, Onate B, Casani L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:522–533.
25. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Sanchez S, Rodriguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression

- in vascular smooth muscle cells; possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* 2002;**106**:3104–3110.
26. Jaeger LB, Dohgu S, Sultana R, Lynch JL, Owen JB, Erickson MA et al. Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun* 2009;**23**: 507–517.
 27. Sendra J, Llorente-Cortes V, Costales P, Huesca-Gomez C, Badimon L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovasc Res* 2008;**78**:581–589.
 28. Perman JC, Bostrom P, Lindbom M, Lidberg U, Stahman M, Hagg D et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 2011;**121**:2625–2640.
 29. Niu YG, Hauton D, Evans RD. Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates. *J Physiol* 2004;**558**:225–237.
 30. Swarnakar S, Beers J, Strickland DK, Azhar S, Williams DL. The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 2001;**276**:21121–21128.
 31. Wu L, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. *J Cell Biochem* 2005;**96**:1021–1033.
 32. Leonardo CC, Eakin AK, Ajmo JM, Gottschall PE. Versican and brevican are expressed with distinct pathology in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neurosci Res* 2008;**86**: 1106–1114.
 33. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Badimon L. Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:1905–1911.
 34. Mwaikambo BR, Yang C, Chemtob S, Hardy P. Hypoxia up-regulates CD36 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 2009;**284**:26695–26707.
 35. Pulnikunnil T, Puthanveetil P, Kim MS, Wang F, Schmitt V, Rodrigues B. Ischemia-reperfusion alters cardiac lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1801**:171–175.
 36. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:1784–1789.
 37. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 2003;**144**:3483–3490.
 38. Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JW, Diamant M, Bax JJ, Hammer S et al. Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2008;**52**:1793–1799.
 39. Bacsikai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW, Hyman BT. The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:11553–11556.
 40. Goonasekera CL, Balse E, Hatem S, Steele DF, Fedida D. Cholesterol and cardiac arrhythmias. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;**8**:965–979.

Supplemental online material

Methods

HL-1 cell culture

HL-1 cells were maintained in Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 μ M norepinephrine, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and L-Glutamine 2 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) in plastic dishes, coated with 12.5 μ g/mL fibronectin and 0.02% gelatin, in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. L-[3,4-³H(N)]-Glutamine was from Perkin-Elmer.

Neonatal Rat Ventricular Myocytes (NRVM) isolation and culture

Cardiomyocytes were separated from cardiac fibroblasts by preplating onto plastic dishes for 90 min at 37°C in 5% CO₂. Cardiomyocytes were maintained on 1% gelatine-coated dishes at a density of 7.5x10⁴ cells/cm² in 4:1 DMEM:M199 (Gibco) supplemented with 5% FBS (Invitrogen), 10% fetal horse serum (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin. 1 μ g/ml Cytosine β -D-arabinofuranoside (Sigma) was added to the culture media to inhibit proliferation of residual fibroblasts. The culture medium was changed every other day. After 48h in culture, myocytes exhibited regular spontaneous contractions. Cells were used for experiments after 3-6 days in culture.

Generation of LRP1-deficient cardiomyocytes

Design of LRP1 miRNA lentiviral vectors

Three different sequences miR RNAi (XM_1919; _8223 and _8531) were designed to downregulate LRP1 (Accession number. XM_001056970) and cloned into pLenti6.4-CMV-MSGW (Invitrogen). An universal insert negative control (Invitrogen, pcDNATM6.2-GW/miR negative control) was also used (Fig. IA online).

Lentiviral particle production

Lentiviral particle production was performed as previously described with some modifications.¹ Briefly, the day prior transfection, 3×10^6 human embryonic kidney cells 293T were seeded on 10 cm² plates. Lentiviral transfer vector (pLenti6.4-CMV-MSGW/miR, 6 μ g), viral envelope plasmid (pMD-G-VSV-G, 2 μ g) and packaging construct (pCMV- Δ R8.2, 4 μ g) were mixed with sodium chloride 150 mM, added to 250 μ L of PEI-NaCl solution (Polyplus transfection) and incubated at room temperature (RT) for 20 min. This DNA solution was then added drop-wise to the plate containing the 293T cells with medium, swirled gently, and incubated for 16 h at 37°C with 5% CO₂. The following day, the transfection solution was removed, and medium without fetal bovine serum (FBS) was added to the cells and it was maintained for 48 hours. The supernatant was then collected, centrifuged, and filtered through a 0.45 μ m low protein binding filter (Corning, Bath, United Kingdom). The filtered supernatant was concentrated using Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore) following manufacturer's instructions.

LRP1-deficient cardiomyocytes generation

Lentivirus stocks and a negative control generated from the resulting constructs were tittered by blasticidin selection. In each experimental set performed in confluent NRVM, cells were incubated for 18 hours in the presence of lentivirus with 10 multiplicity of infection (MOI). In order to generate a stock of LRP1-deficient HL-1 cells, they were stably transduced with 10 MOI lentivirus and maintained in a complete medium supplemented with blasticidin (10 μ g/mL) to select blasticidin-resistant colonies. HL-1 cell clones with maximal LRP1 downregulation were selected, grown with blasticidin and used in further experiments.

Small interference RNA-mediated gene silencing of HIF-1 α in HL-1 cells

To inhibit HIF-1 α expression, HL-1 cells were transiently transfected with HIF-1 α specific siRNA acquired from Applied Biosystems (siRNA ID 4390815). A siRNA-random was used as a negative control (Ambion AM 4636) in cellular transfections. HL-1 cells were transfected with siRNA by the nucleofection technique using the

Cell line Nucleofector™ kit L (VCA-1005) from LONZA-Amaza according to the manufacturer's instructions. The final siRNA transfection concentration for siRNA-HIF-1 α was 0.6 μ mol/L. After 48 hours of nucleofection, cells were exposed to normoxia or hypoxia for 4 hours and harvested by scraping in TriPure Reagent (Roche) for PCR and Western blot analysis.

Exposure of cardiomyocytes to VLDL under normoxic and hypoxic conditions

Cells were exposed to normoxia (21% O₂) in a Nirco gas incubator with gas mixtures consisting of 74% N₂ and 5% CO₂ or to hypoxia (1% O₂) in a Hypoxic/Anoxic Workstation: H35 (Don Whitley Scientific Ltd.) with 94% N₂ and 5% CO₂. VLDL was added and maintained for the last 12 hours of exposure to normoxic or hypoxic conditions (24 hours). Cells were then harvested in TriPure Reagent (Roche) for PCR and Western blot analysis or in NaOH 0.1 M for lipid extraction and thin layer chromatography.

In some experiments, cells were pre-incubated with lipopolysaccharide (LPS, Sigma L4516, 1 μ g/mL) or with angiotensin II (Sigma A9525, 1 μ M) for 2 hours before the addition of VLDL (1.8 mM).

VLDL preparation and DiI labeling

Human VLDL (d1.001-d1.019 g/mL) were obtained from pooled sera of normocholesterolemic volunteers. VLDL preparations were less than 24 hours old and without detectable levels of endotoxin (Limulus Amebocyte Lysate test, Bio Whittaker). VLDL were labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) by incubating VLDL (1 mg/mL) in PBS–0.5% BSA with 100 μ L of DiI in DMSO (3 mg/mL) for 8 hours at 37°C. The density of the VLDL solution was adjusted to 1.019, and VLDL were reisolated by ultracentrifugation, dialyzed, and filtered through a 0.22- μ m filter. No alterations of electrophoretic mobility were detected against unlabeled VLDL.

Lipid extraction and determination of cholesteryl ester, free cholesterol and triglyceride content of cardiomyocytes and myocardium

In cell culture experiments, NRVM cardiomyocytes or HL-1 cells were exhaustively washed and harvested in NaOH 0.1 M following the VLDL incubation period. In the animal experimental model, one portion of myocardial tissue (5 mg) was also homogenized in NaOH 0.1 M. Lipids were extracted as previously described^{4,5} and CE, FC and TG content was analyzed by thin layer chromatography.

The organic solvent was removed under an N₂ stream, the lipid extract redissolved in dichloromethane and one aliquot was partitioned by thin layer chromatography (TLC). TLC was performed on silica G-24 plates. The different concentrations of standards (a mixture of cholesterol, cholesterol palmitate, triglycerides, diglycerides and monoglycerides) were applied to each plate. The chromatographic developing solution was heptane/diethylether/acetic acid (74:21:4, vol/vol/vol). The spots corresponding to cholesteryl esters (CE), triglycerides (TG) and free cholesterol (FC) were quantified by densitometry against the standard curve of cholesterol palmitate, triglycerides and cholesterol, respectively, using a computing densitometer.

Preparation of double-radiolabeled VLDL particles and determination of VLDL uptake by cardiomyocytes

A 50-mL teflon round-bottom flask was coated with cholesteryl-1,2,-³H-(N) (125 μ Ci) and glycerol trioleate [¹⁴C] (25 μ Ci) (PerkinElmer Life Sciences) by evaporating the organic solvent at 37°C under vacuum. Then, 50 mL of human plasma were added and the flask was rotated in a water bath for 20 hours at 37°C. Double-radiolabeled VLDL was then isolated by sequential centrifugation, dialyzed and filtered.

Control or LRP1 deficient HL-1 cells were exposed to double-radiolabeled VLDL (1.8 mM) for 18 hours under normoxia or hypoxia. At the end of the incubation, cells were washed and harvested in 0.10 M NaOH. Radioactivity was determined in

50 μ L of cellular homogenates on a LS6500 multipurpose scintillation counter (Beckman Coulter) and counts were normalized to cellular protein.

Constructions for Luciferase Reporter Gene Assay and site-directed mutagenesis

Transient transfection assays of subconfluent HL-1 cells were performed in 12-well plates with 0.5 μ g/well of the indicated construction, 50 ng/well μ l of pRL-null (Promega) as control reporter vector and 2 μ L of lipofectamine. The DNA/liposome complexes were added to the cells for 3 hours. After 24 hours, transfected cells were exposed to hypoxia for 18 hours. Luciferase activity was measured using the Dual Luciferase assay kit (Promega) and a luminometer (Orion I, Berthold detection systems) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to renilla activity.

Real time PCR

The PCR-7000 Sequence Detection System of ABIPRISM (Applied Biosystems) was used to perform real time PCR with the following assays on demand: LRP1 (Rn01503901 or Mm00464601_m1), VLDLR (Rn01498166_m1 or Mm00443281_m1), LDLR (Rn00598440_m1 or Mm01151339_m1), SREBP-1 (Mm01138344_m1) and SREBP-2 (Mm01306292_m1). Bcl2 and BAX mRNA expression was detected using the assays on demand Rn99999125_m1 and Rn01480160_g1, respectively. ARBP (Rn00821065_g1) was used as endogenous control. Taqman real-time PCR was performed with 1 μ L/well of RT products (1 μ g total RNA) in 10 μ L of TaqMan PCR Master Mix (PE Biosystem) with the primers at 300 nM and the probe at 200 nM. PCR was performed at 95°C for 10 minutes (for AmpliTaq Gold activation) and then run for 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The threshold cycle (Ct) values were determined and normalized to endogenous control.

Western blot

Blots were incubated with monoclonal antibodies against LRP1 (Epitomics 2703-1, dilution 1:7000), VLDLR (Santa Cruz Biotechnology, sc-11823, dilution 1:100) or LDLR (Epitomics, 1956-1, dilution 1:250). HIF-1 α expression was detected with anti-HIF-1 α (dilution 1:50, Santa Cruz sc-10790) and CPP32 with anti-CPP32 (Santa Cruz, sc-136219). Equal protein loading in each lane was verified staining filters with Ponceau and also by incubating blots with monoclonal antibodies against GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-20357, dilution 1:100) for NRVM or against α -tubulin for HL-1 cells (Abcam, ab6046, dilution 1:100).

Apoptosis detection

Apoptotic cells were visualized using ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International) following the manufacturer's instructions. Fragmented DNA strands of the apoptotic cells are detected by enzymatically labelling the free 3'-OH ends with modified nucleotides. In brief, cell cultures were fixed with 1% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature and permeabilized with ethanol:acetic acid 2:1 for 5 minutes at -20°C. Equilibration buffer was then applied to the cells for 10 seconds at room temperature to transfer labelled nucleotides to the terminal ends of the broken DNA. The reaction was stopped with Wash Buffer for 10 minutes and cells were then incubated with antibody conjugate for 30 minutes at room temperature. Finally, cultures were washed with PBS, mounted under a glass coverslip and visualized with a confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar, Germany).

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by One-way ANOVA to compare the means of the different groups followed by a post-hoc Fischer PLSD comparison to detect the significant differences between each other. (Statistical software package Statview). A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Fig. I online

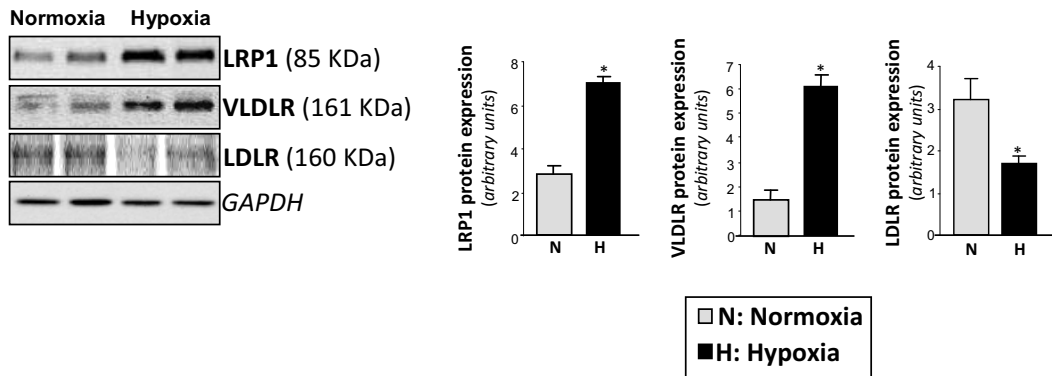


Figure I online. Effect of hypoxia on LRP1, VLDLR and LDLR expression in NRVM cardiomyocytes. Western blot analysis and bar graphs quantification of LRP1, VLDLR and LDLR bands in NRVM exposed to normoxia or hypoxia for 24 hours. Unchanged levels of GAPDH are used as loading control. *P<0.05 vs. normoxic cells.

(A)

miR RNAi – XM_001056970_1919

Top oligo 5' TGCTGCATACACGAGGAACAGCTCATGTTTTGGCCACTGACTGACATGAGCTGCCTCGTGTATG 3'
 Bottom oligo 5' CCTGCATACACGAGGCAGCTCATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATGAGCTGTTCCCTCGTGTATGC 3'

miR RNAi – XM_001056970_8223

Top oligo 5' TGCTGTCCTCACAATCCACAACCTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAGTTTGGATTGTGAGGA 3'
 Bottom oligo 5' CCTGTCTCACAATCCAAACTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCAGTTTGTGGATTGTGAGGAC 3'

miR RNAi – XM_001056970_8531

Top oligo 5' TGCTGAGCAGAACTTGTTCAGTGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCCACTGCCAAGTCTCGCT 3'
 Bottom oligo 5' CCTGAGCAGAACTTGGCAGTGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCCACTGCAACAAGTCTCGCTC 3'

pcDNA™6.2-GW/miR – control

Top Oligo 5'- TGCTGAAATGACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCGAGTACATTT -3'
 Bottom Oligo 5'- CCTGAAATGACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCGAGTACATTT -3'

(B)

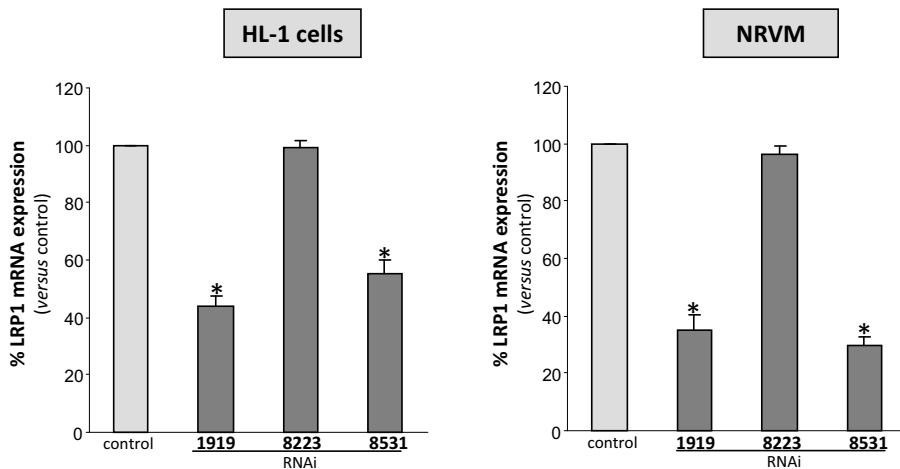


Figure II online. Efficiency of designed miR RNAi to downregulate LRP1 expression in HL-1 cells and NRVM. (A) Three miR RNAi (1919; 8223 and 8531) were designed to target LRP1 expression (XM_001056970), and transduced using lentiviral particles. An universal negative control (pcDNA™6.2-GW/miR-neg) was included in the experiments. (B) Real-time PCR quantification of LRP1 mRNA expression levels in hypoxic HL-1 cells and NRVM. Data were processed with a specially designed software based on threshold cycle (Ct) values, normalized to ARBP mRNA levels and expressed as percentage of LRP1 expression relative to controls. Results are shown as mean±SEM of three experiments performed in duplicate. *P<0.05 vs control.

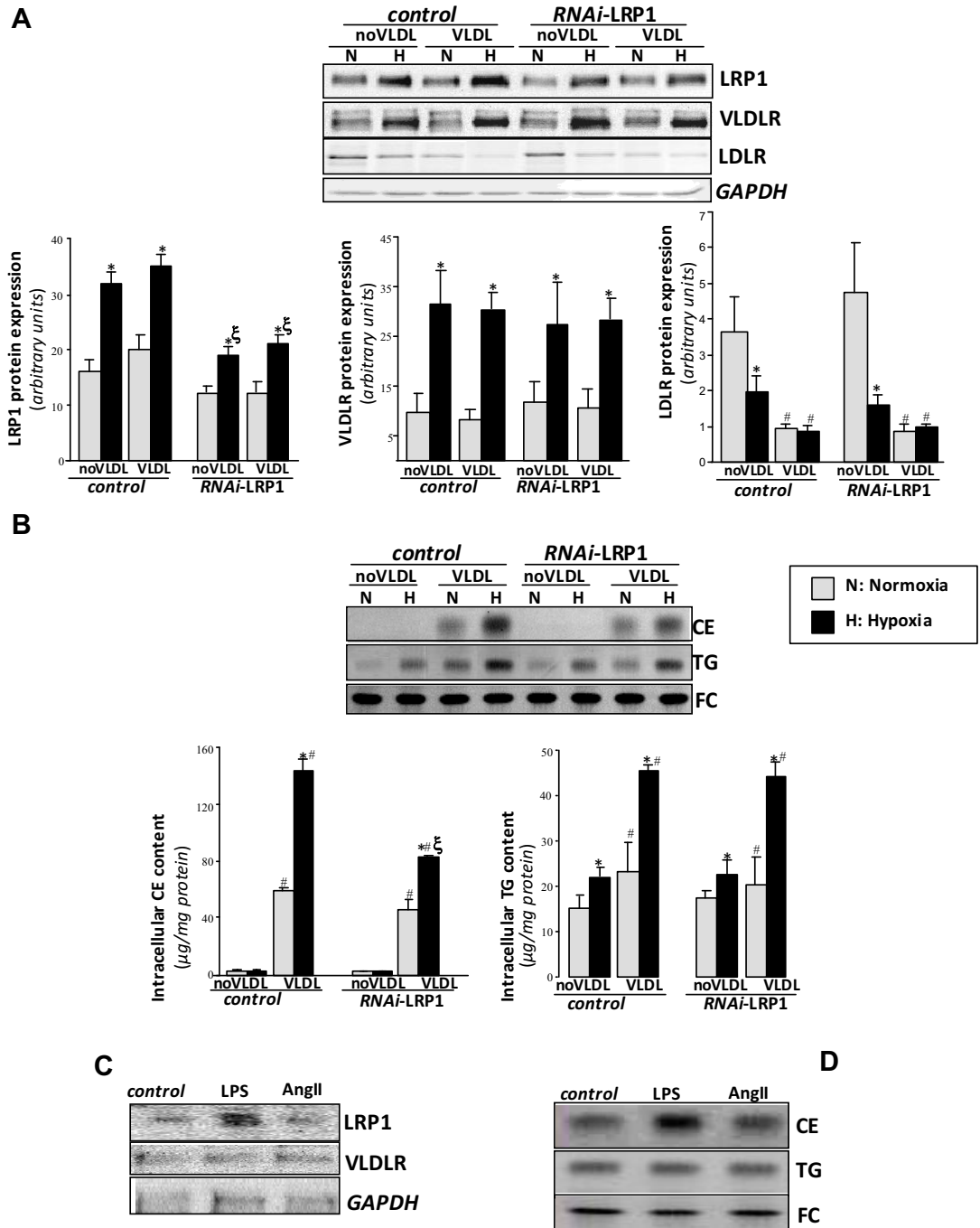


Figure III online. Effect of RNAi-LRP1 on lipoprotein expression and VLDL-derived intracellular lipid profile in normoxic and hypoxic NRVM. NRVM cardiomyocytes were exposed to VLDL (1.8 mM) under normoxic or hypoxic conditions as explained in Methods. (A) Western blot analysis and bar

graphs showing the quantification of LRP1, VLDLR and LDLR. Unchanged levels of GAPDH are shown as loading control. Results are expressed as mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate. (B) Thin layer chromatography showing cholesteryl ester (CE), triglyceride (TG) and free cholesterol (FC) bands and histograms with their quantification. Results are expressed as micrograms per milligram of protein and shown as mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate. *P<0.05 vs. normoxic cells; #P<0.05 vs. VLDL-unexposed cells; ξ P<0.05 vs. control cells. (C) Western blot analysis of LRP1 and VLDLR expression in NRVM cardiomyocytes exposed to LPS (1 μ g/mL) and angiotensin II (1 μ M) for 24 hours. Unchanged levels of GAPDH are used as loading control. (D) Thin layer chromatography showing CE, TG and FC bands in NRVM cardiomyocytes exposed to LPS (1 μ g/mL) and angiotensin II (1 μ M) for 24 hours.

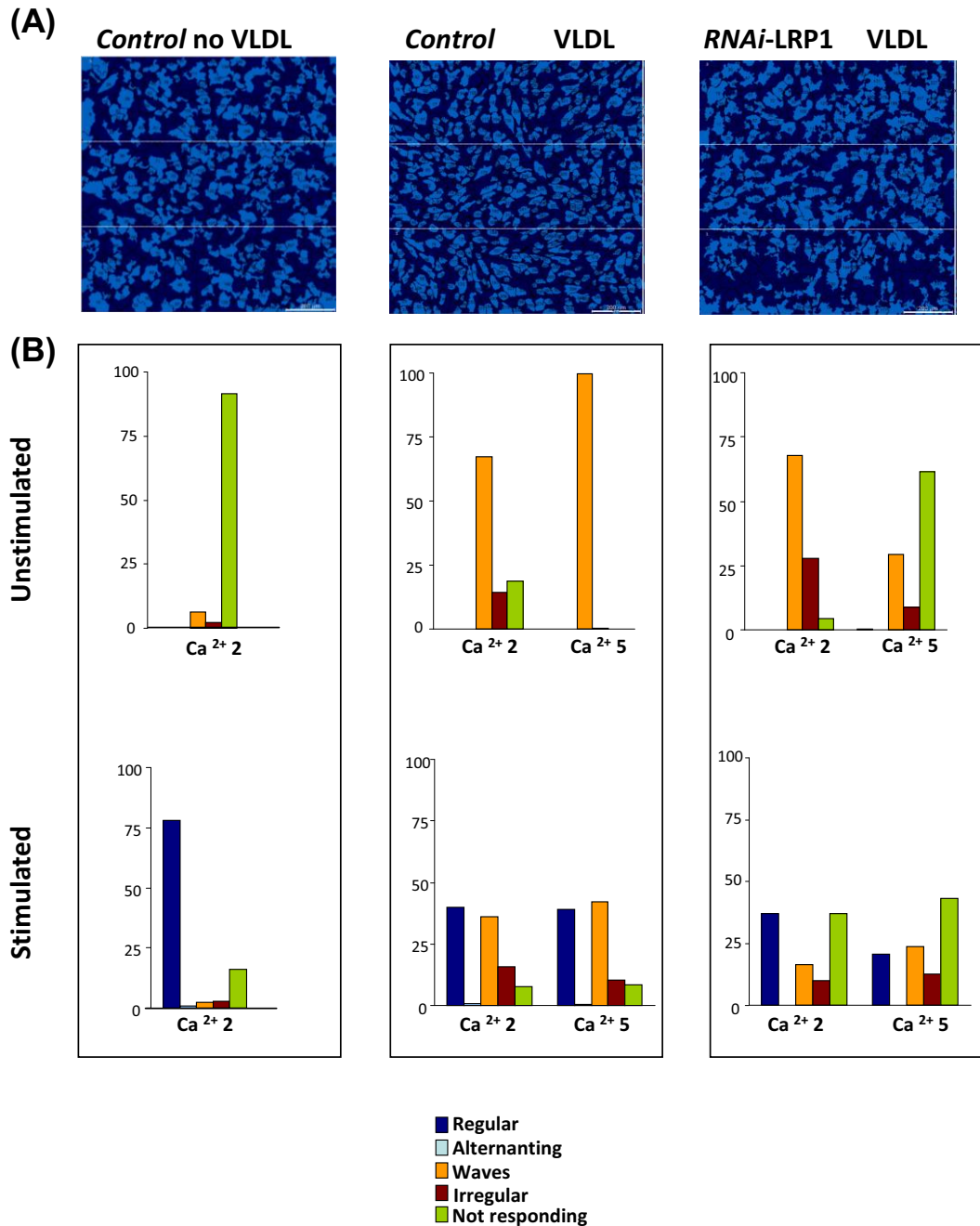


Figure IV online. Calcium handling in VLDL-exposed HL-1 cells exposed to low extracellular Ca^{2+} (2 mmol/L) and high extracellular Ca^{2+} (5 mmol/L) (A) Image of a representative field of cultured HL-1 cardiomyocytes used for calcium handling. (B) Distribution of regular, alternating, waves, irregular and not responding calcium transient amplitudes at 0 and 0.5 Hz stimulation frequency in HL-1 cells

unexposed to VLDL (left panel), exposed to VLDL (1.8 mM) (central panel) and treated with siRNA-LRP1 and exposed to VLDL (1.8 mM) (right panel).

ARTÍCULO 2

“Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients”

“La expresión del receptor Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) se correlaciona con la acumulación de ésteres de colesterol en el miocardio de pacientes con cardiomiopatía isquémica

REVISTA: *Journal of Translational Medicine* 2012, 10:160

Factor de impacto: 3.474

AUTORES: Roi Cal¹, Oriol Juan-Babot¹, Vicenç Brossa², Santiago Roura³, Carolina Gálvez-Montón³, Manolo Portoles⁴, Miguel Rivera⁴, Juan Cinca⁴, Lina Badimon^{1,5} and Vicenta Llorente-Cortés¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

²Servicio de Cardiología, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

³ICREC Programa de Investigación, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, España

⁴Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España

⁵CIBER de Obesidad y Nutrición (CIBER-OBN), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, España

RESUMEN:

Objetivos: Nuestra hipótesis fue que la sobreexpresión de los receptores lipoproteicos debe estar relacionada con la acumulación lipídica en el miocardio isquémico humano. La sobreacumulación de lípido intramiocárdica contribuye a la disfunción contráctil y la generación de arritmias en la cardiomiopatía. Debido a esto

el propósito del trabajo fue observar el efecto de LDL a dosis hipercolesterolémicas y VLDL a dosis hipertrigliceridémicas en la expresión del LRP1 en cardiomiocitos, así como la posible correlación entre la expresión del receptor LRP1 y la acumulación lipídica en muestras de tejido de ventrículo izquierdo de pacientes con cardiomiopatía isquémica (ICM).

Métodos y resultados: Se realizaron experimentos con cultivos celulares que incluyen cardiomiocitos control y deficientes en LRP1 expuestos a lipoproteínas en condiciones de normoxia e hipoxia. También se incluyeron a estudio corazones explantados de 18 pacientes con ICM y 8 corazones sanos. La expresión de los receptores low density lipoproteína receptor-related protein 1(LRP1), very low density lipoprotein receptor (VLDLR) y low density lipoprotein receptor (LDLR) fue analizada por PCR a tiempo real y Western Blot. La acumulación de colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (FC) fue analizada por cromatografía en capa fina (CCF). Resultados de Western Blot mostraron que los niveles proteicos de LRP1, VLDLR y HIF-1 α estaban incrementados en corazones isquémicos. Análisis con inmunohistoquímicas y microscopía confocal mostraron que el LRP1 y el HIF-1 α estaban incrementados en cardiomiocitos de pacientes con ICM. Estudios *in vitro* revelaron que VLDL, LDL e hipoxia incrementan la expresión del LRP1, y éste juega un papel importante en la acumulación de CE procedentes de las lipoproteínas en los cardiomiocitos. La acumulación de CE en el miocardio se correlacionó fuertemente con los niveles de expresión del LRP1 en corazones isquémicos.

Conclusión: Nuestros resultados sugieren que el incremento en la expresión del LRP1 es un factor clave en la acumulación miocárdica de colesterol esterificado en corazones isquémicos humanos, pudiendo llegar a ser el LRP1 clave en la prevención de los efectos deletéreos provocados por tal acumulación en el miocardio de pacientes con cardiomiopatía isquémica..

PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO: La directora de la tesis Vicenta Llorente Cortés da constancia de que el doctorando Roi Cal Pérez-Quevedo participó en el cultivo de la línea celular de cardiomiocitos HL-1 así como la generación y cultivo de células HL-1 deficientes en LRP1, la preparación de muestras de tejido, la preparación de LDLAG, el procesamiento de las muestras obtenidas de células HL-1 y tejido (PCR a tiempo real, Western Blot y CCF), el análisis de resultados y la configuración y elaboración final del artículo.

La directora: Vicenta Llorente Cortés



RESEARCH

Open Access

Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients

Roi Cal¹, Oriol Juan-Babot¹, Vicenç Brossa², Santiago Roura³, Carolina Gálvez-Montón³, Manolo Portoles⁴, Miguel Rivera⁴, Juan Cinca², Lina Badimon^{1,5} and Vicenta Llorente-Cortés^{1*}

Abstract

Our hypothesis was that overexpression of certain lipoprotein receptors might be related to lipid accumulation in the human ischemic myocardium. Intramyocardial lipid overload contributes to contractile dysfunction and arrhythmias in cardiomyopathy. Thus, the purpose of this study was to assess the effect of hypercholesterolemic LDL and hypertriglyceridemic VLDL dose on LRP1 expression in cardiomyocytes, as well as the potential correlation between LRP1 expression and neutral lipid accumulation in the left ventricle tissue from ischemic cardiomyopathy patients. Cell culture experiments include control and LRP1-deficient cardiomyocytes exposed to lipoproteins under normoxic and hypoxic conditions. Explanted hearts from 18 ICM patients and eight non-diseased hearts (CNT) were included. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), very low density lipoprotein receptor (VLDLR) and low density lipoprotein receptor (LDL) expression was analyzed by real time PCR and Western blotting. Cholesteryl ester (CE), triglyceride (TG) and free cholesterol (FC) content was assessed by thin layer chromatography following lipid extraction. Western blotting experiments showed that protein levels of LRP1, VLDLR and HIF-1 α were significantly upregulated in ischemic hearts. Immunohistochemistry and confocal microscopy analysis showed that LRP1 and HIF-1 α were upregulated in cardiomyocytes of ICM patients. *In vitro* studies showed that VLDL, LDL and hypoxia exerted an upregulatory effect on LRP1 expression and that LRP1 played a major role in cholesteryl ester accumulation from lipoproteins in cardiomyocytes. Myocardial CE accumulation strongly correlated with LRP1 levels in ischemic hearts. Taken together, our results suggest that LRP1 upregulation is key for myocardial cholesterol ester accumulation in ischemic human hearts and that LRP1 may be a target to prevent the deleterious effects of myocardial cholesterol accumulation in ischemic cardiomyopathy.

Keywords: Ischemic cardiomyopathy, LRP1, VLDLR, HIF-1 α myocardial lipid accumulation

Introduction

The ischemic condition caused by decreased coronary flow is one of the most important factors leading to heart failure. Under ischemic conditions the myocardium undergoes lipid accumulation in animal models [1-3] and humans [4]. In the ischemic heart, lipid vacuoles have been located in the periphery of the risk area [5,6]. While some authors have proposed a cardioprotective role for

cytosolic lipids in the cardiomyocyte [7,8], others associate this phenomena to lipotoxicity [2,9]. In fact, it has been consistently reported that intramyocardial lipid overload significantly contributes to contractile dysfunction [10] and arrhythmias [11]. Recent work from our group demonstrated that myocytes exposed to high very low density lipoprotein (VLDL) doses depicts intracellular accumulation of neutral lipids, downregulation of SERCA2 expression, reduction of calcium transient amplitude, and SR calcium loading. These effects were exacerbated by submitting the cultured myocytes to an hypoxic environment [12]. Remarkably, a high prevalence

* Correspondence: dllorente@csic-iccc.org

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Ma Claret, 167, 08025, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



of fat deposition has been found in areas of chronic myocardial infarction in humans [4]. The patients with fat deposition had larger infarctions, decreased wall thickening and impaired endocardial wall motion [4].

It is known from several years ago that triglyceride (TG)-rich lipoproteins (chylomicrons and VLDL) supply both triglycerides and cholesteryl esters (CE) to the heart [13-15]. At present, the lipoprotein receptors involved in TG and/or cholesterol uptake by the cardiomyocyte remain largely unknown. Indeed, a basal expression of lipoprotein receptors is essential to guarantee a correct energetic supply for the heart since its inhibition causes a marked decline in cardiac mechanical function [15]. However, the upregulation of several lipoprotein receptors, including very low density lipoprotein receptor (VLDLR) [16] or low density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) [17], has been previously reported to induce neutral lipid accumulation in cardiomyocytes under ischemic conditions. Moreover, both VLDLR [16] and LRP1 [17,18] share a HIF-1 α -dependent mechanism of transcriptional activation by hypoxia in cultured cells. Our group has also shown that LRP1 expression and cholesteryl esters levels are found upregulated in the ischemic myocardium of an *in vivo* porcine model of acute myocardial infarction [17]. LRP1 is also upregulated by extracellular matrix-aggregated LDL in cultured human vascular smooth muscle cells and by hypercholesterolemia in the porcine vascular wall [19].

According to our previous work in this field, we hypothesized that LRP1 may be upregulated by lipids in cardiomyocytes playing a key role in the ischemia-induced neutral lipid accumulation in human heart. Thus, the purpose of this study was to assess the effect of hypercholesterolemic LDL and hypertriglyceridemic VLDL dose on LRP1 expression in cardiomyocytes, as well as the potential correlation between LRP1 expression and neutral lipid accumulation in the left ventricle tissue from patients with ischemic cardiomyopathy.

Material and methods

Collection of human samples

A total of 18 explanted human hearts from ischemic cardiomyopathy patients was collected and immediately processed. In particular, these patients were undergoing cardiac transplantation at Sant Pau Hospital, Barcelona and La Fe Hospital, Valencia. Clinical data, electrocardiogram, Doppler echocardiography, hemodynamic studies, and coronary angiography were available on all patients. All patients were functionally classified according to the New York Heart Association (NYHA) criteria, and were receiving medical treatment according to the guidelines of the European Society of Cardiology [20], with diuretics 90 %, angiotensin-converting enzyme inhibitors 87 %,

β -blockers 50 %, aldosterone antagonists 70 %, digoxin 49 % and statins 80 %.

Eight non-diseased hearts were also obtained from donors with neurological death caused by traffic accident. The hearts were initially considered for cardiac transplantation but were subsequently deemed unsuitable for transplantation either because of blood type or size incompatibility. All donors had normal LV function and no history of myocardial disease or active infection.

Transmural samples were taken from the infarct border zone, and were immediately stored at -80°C . The project was approved by the local Ethics Committee (Biomedical Ethics Committee of "La Fe, Valencia" and "Sant Pau, Barcelona", Spain) and conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. All patients gave written informed consent that was obtained according to our institutional guidelines.

Tissue homogenization

Frozen ventricular tissues (25 mg) were pulverized using a mortar and a pestle in liquid nitrogen. Sample were then homogenized in TriPure isolation reagent (Roche Molecular Biochemicals) for total RNA and protein extraction according to manufacturer's instructions.

HL-1 cardiomyocyte cell culture

The murine HL-1 cell line was generated by Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Centre, New Orleans, Louisiana, USA) and kindly provided by Dr. U Rauch (Charité-Universitätsmedizin Berlin). These cells show cardiac characteristics similar to those of adult cardiomyocytes. LRP1-deficient cardiomyocytes were generated as previously described [17]. Control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes were maintained in Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 μM norepinephrine, 100 units/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, and L-Glutamine 2 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) in plastic dishes, coated with 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronectin and 0.02 % gelatin, in a 5 % CO_2 atmosphere at 37°C .

VLDL and LDL preparation

Human VLDL ($d_{1.019}$ - $d_{1.019}$ g/mL) and LDL ($d_{1.009}$ - $d_{1.063}$ g/mL) were obtained from pooled sera of normocholesterolemic volunteers. VLDL and LDL preparations were less than 24 hours old and without detectable levels of endotoxin (Limulus Amebocyte Lysate test, Bio Whittaker). Aggregated LDL (agLDL) was prepared by vortexing LDL in PBS at room temperature. The formation of LDL aggregates was performed as previously described [21-23]. The ultrastructure of agLDL obtained by vortexing was similar to that of LDL modified by versican [22],

one of the main chondroitin sulfate proteoglycans structuring the arterial intima.

Exposure of cardiomyocytes to VLDL and LDL under normoxic and hypoxic conditions

Cells were exposed to normoxia (21 % O₂) in a Nirco gas incubator with gas mixtures consisting of 74 % N₂ and 5 % CO₂ or to hypoxia (1 % O₂) in a Hypoxic/Anoxic Workstation: H35 (Don Whitley Scientific Ltd.) with 94 % N₂ and 5 % CO₂. Lipoproteins were added and maintained for the last 12 hours of exposure to normoxic or hypoxic conditions (24 hours). Cells were then harvested in TriPure Reagent (Roche) for PCR and Western blot analysis or in NaOH 0.1 M for lipid extraction and thin layer chromatography.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from fresh frozen tissue or cultured HL-1 cardiomyocytes using TriPure isolation reagent (Roche Molecular Biochemicals) and the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Extracted RNA was eluted in 25 µL of nucleases-free water. RNA yield and quality were assessed by agarose electrophoresis and spectrophotometry, and then stored at -80°C until was used. RNA was digested with DNase I (Invitrogen). One µg of total RNA was used for cDNA synthesis according to the protocol provided with the HighCapacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Applied Biosystems) was added to prevent RNase-mediated degradation. The cDNA was also stored at -20°C.

Gene expression analyses by RT-PCR

Gene expression analyses of *LRP1*, *VLDLR*, and *LDLR* mRNA were performed at mRNA level by quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (q-RT-PCR). Specific primer and fluorescent TaqMan probe for *LRP1*, *VLDLR* and *LDLR* were selected within a list of predesigned assays (Assays-on-Demand *LRP1* (Hs00233999_m1), *VLDLR* (Hs01045922_m1) and *LDLR* (Hs00181192_m1) (Applied Biosystems). *18srRNA* (4319413E) was used as a housekeeping gene. We mixed 5 µL of single-stranded cDNA (equivalent to 100 ng of total RNA) with 1 µL of 20x TaqMan Gene Expression Assays for each Assay-on-Demand, 10 µL of TaqMan Universal PCR Master Mix, and 4 µL of nucleases-free water. After gentle mixing, the mixture was transferred into a real-time PCR microplate. The Real-time PCR microplate was sealed, centrifuged, and then was placed in the sample block of an Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min

at 60°C. Expression levels were measured in triplicate. The threshold cycle (Ct) values were normalized to the housekeeping gene [17,18].

Western blotting

Total protein was extracted from fresh frozen tissue or HL-1 cell cultures using TriPure isolation reagent (Roche Molecular Biochemicals). Proteins were analyzed by Western blot analysis as previously described [17,18]. Blots were incubated with monoclonal antibodies against human LRP1 (β-chain, clone 8B8 RD1 61067), VLDLR (Santa Cruz Biotechnology, Inc, D-17, sc-11823), HIF-1α (Santa Cruz Biotechnology, H-206, sc-10790), LDLR (Epitomics, EP1553Y, 1956-1), VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc, A2611, sc-152) and mouse monoclonal anti-Troponin T (Thermo scientific MS-295). Equal protein loading in each lane was verified staining filters with Ponceau and also by incubating blots with monoclonal antibodies against β-actin (Abcam, ab8226).

Lipid extraction and semi-quantitative analysis of cholesteryl ester, free cholesterol and triglyceride content of cardiomyocytes and myocardium

HL-1 cardiomyocytes were exhaustively washed and harvested in NaOH 0.1 M following the lipoprotein

Table 1 Clinical and echocardiographic characteristics from whom explanted ischemic hearts were obtained

	ICM (n = 18)
Age (years)	54.53 ± 2.67
Gender male (%)	93 %
Prior hypertension (%)	46
Diabetes mellitus (%)	27
Obesity (%)	20
Total cholesterol (nmol/L)	3.90 ± 0.28
Perfusion abnormalities* (%)	67 %
Echo-Doppler study	
Ejection fraction (%)	25.86 ± 1.80
Intraventricular septum in diastole (mm)	11.08 ± 0.47
Left ventricular posterior wall in diastole (mm)	9.67 ± 0.62
Left ventricular end-diastolic diameter (mm)	67.00 ± 2.45
Left ventricular end-systolic diameter (mm)	58.50 ± 3.94
Treatment (%)	
Diuretics	90
Angiotensin-converting enzymes inhibitors	87
β-blockers	50
Aldosterone antagonist	70
Digoxin	49
Statins	80

ICM, Ischemic cardiomyopathy; *the patients with perfusion abnormalities were considered those subjected to coronary interventions (i.e. by-pass, angioplasty, stents and others).

incubation period. In the animal experimental model, one portion of myocardial tissue (5 mg) was also homogenized in NaOH 0.1 M. Lipids were extracted as previously described [17,18] and CE, FC and TG content was analyzed by thin layer chromatography.

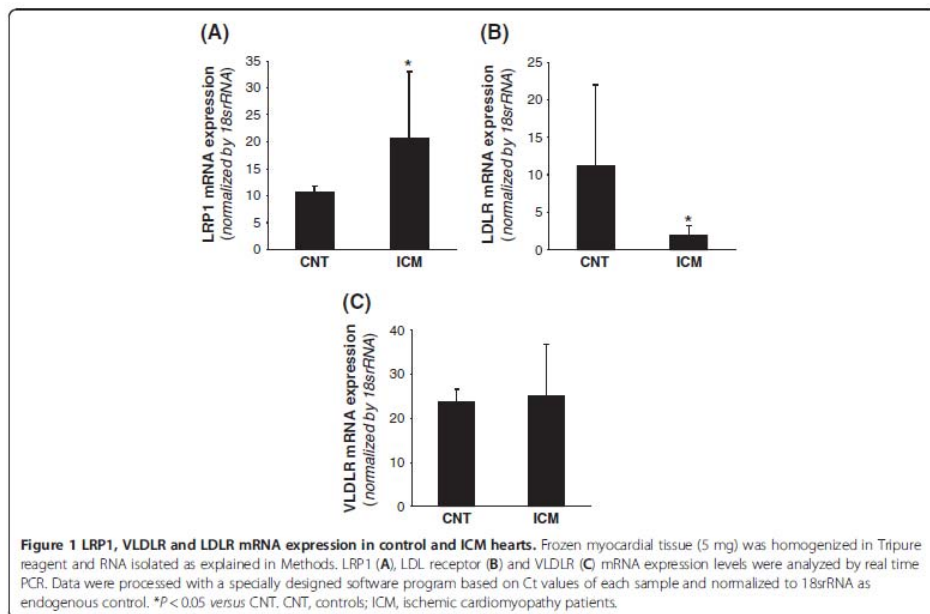
The organic solvent was removed under an N₂ stream, the lipid extract redissolved in dichloromethane and one aliquot was partitioned by thin layer chromatography (TLC). TLC was performed on silica G-24 plates. The different concentrations of standards (a mixture of cholesterol, cholesterol palmitate, triglycerides, diglycerides and monoglycerides) were applied to each plate. The chromatographic developing solution was heptane/diethylether/acetic acid (74:21:4, vol/vol/vol). The spots corresponding to cholesteryl esters (CE), triglycerides (TG) and free cholesterol (FC) were quantified by densitometry against the standard curve of cholesterol palmitate, triglycerides and cholesterol, respectively, using a computing densitometer.

Immunohistochemical analysis

Hearts were obtained from human transplant operations. Immediately after surgical excision, myocardium was cut in appropriated blocks. Myocardial tissues were immersed in fixative solution (4 % paraformaldehyde), embedded in

paraffin, cut into 5 µm thick serial sections and placed on poly-L-lysine coated slides. The primary antibodies were rabbit monoclonal anti-LRP1 (Epitomics 2703 dilution 1:100), mouse monoclonal anti-Troponin T (Thermo scientific MS-295, dilution 1:100) and mouse monoclonal anti-HIF-1α (Novus NB100-105, dilution 1:50). Antigen retrieval was required before performing immunohistochemical staining of Troponin T and HIF-1α. In a set of experiments, before incubation with primary antibody (2 hours), sections were washed and endogenous peroxidase activity suppressed with H₂O₂. Non-specific binding was blocked with an appropriate serum. The primary antibodies were detected using the avidin-biotin immunoperoxidase technique. The sections were incubated with an appropriate biotinylated secondary antibody (1:200, Vector®). 3,3'-diaminobenzidine-haematoxylin chromogen was used for nuclear stain. The images were captured by Nikon Eclipse 80i microscope and digitized by Retiga 1300i Fast camera. Magnification (240X).

In other set of experiments, cryosections were subsequently incubated with a Cy3-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno Research Laboratories) at 37 °C for 1 h. Slices were finally counterstained for 10 min with Hoechst 33342 (Sigma), and analyzed under a TCS SP5 confocal microscope (Leica).



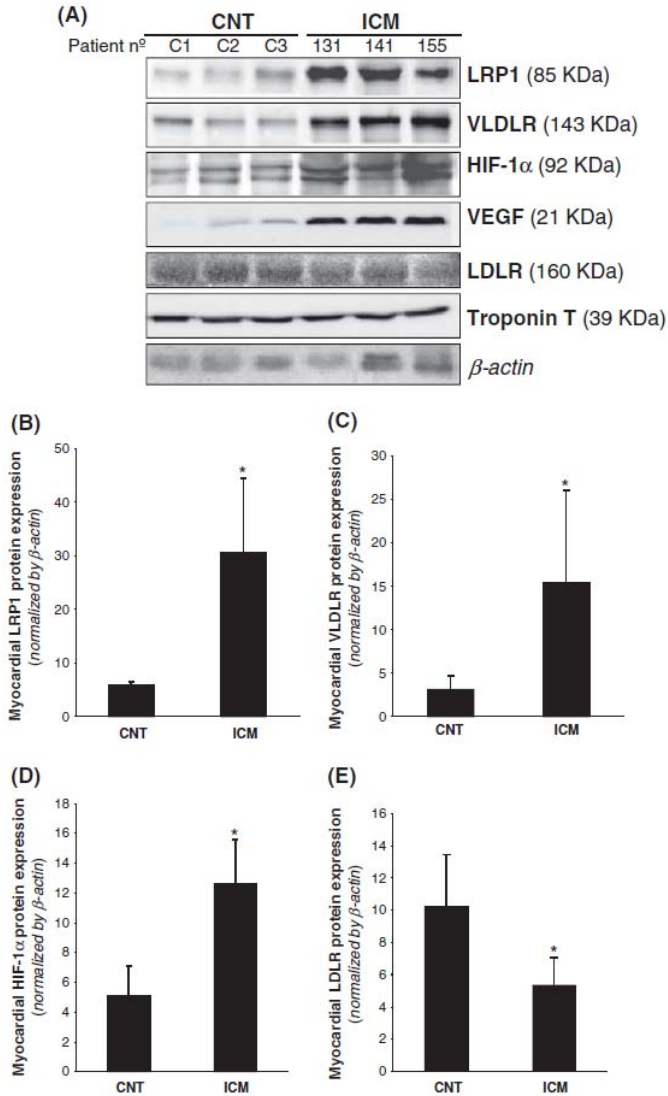


Figure 2 LRP1, VLDLR and LDLR protein levels in control and ICM hearts. Representative Western blot analysis (A) showing LRP1, VLDLR, HIF-1α, VEGF, LDLR and troponin T protein expression in three controls and three ICM patients. Bar graphs showing the mean \pm SD of protein LRP1 (B), VLDLR (C), HIF-1α (D) and LDLR (E) band quantification. Unchanged levels of β -actin were shown as loading control and used to normalize protein bands. * $P < 0.05$ versus CNT. CNT, controls; ICM, ischemic cardiomyopathy patients.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance between groups was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post-hoc Tamhane* test. Correlation analysis was performed according to Pearson. Statistics were calculated using Statistical software package Statview (SPSS) for Windows. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

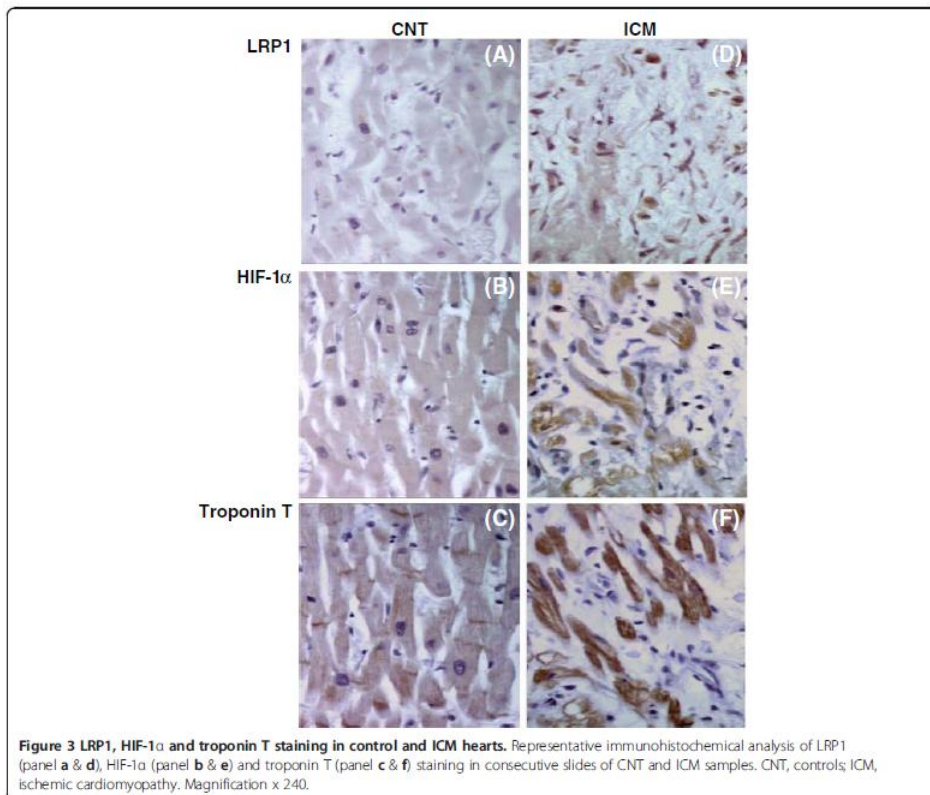
Clinical characteristics of patients

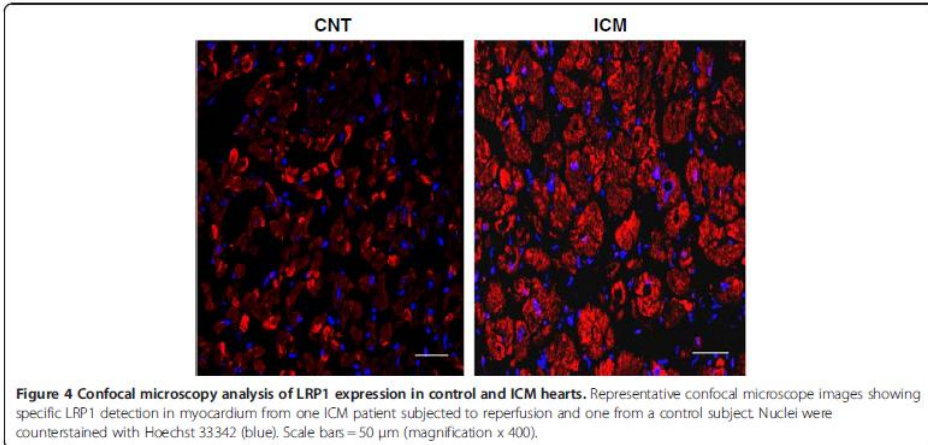
The clinical and echocardiographic characteristics of patients are summarized in Table 1. These patients were all symptomatic, had a NYHA functional classification of III-IV and were previously diagnosed with significant comorbidities including hypertension, hypercholesterolemia, obesity, and diabetes mellitus. Patients (93 %) were mostly men with a mean age of 54.53 ± 2.67 years and

had at least one vessel affected by atherosclerosis. Left ventricular end-diastolic diameter was 67.00 ± 2.45 . Eight non-diseased donor hearts were used as control (CNT) (60 % male, mean age 55 ± 3 years, and EF > 50 %). A high percentage of patients (67 %) were subjected to reperfusion techniques, also indicative of peri-infarct ischemia.

Myocardial lipoprotein receptor expression

LRP1 expression was analyzed at mRNA level by real time PCR and at the protein level by Western blot analysis from the same sample. As shown in Figure 1A, LRP1 mRNA expression was significantly higher in ICM than in control group (ICM: 20.57 ± 12.41 vs CNT: 10.66 ± 1.13 , $P < 0.05$). In contrast, LDLR mRNA expression (Figure 1B) was significantly lower in ICM compared to controls (ICM: 1.89 ± 1.29 vs CNT: 11.14 ± 10.90 , $P < 0.05$). No differences were found in VLDLR mRNA expression between controls and ICM hearts (Figure 1C).

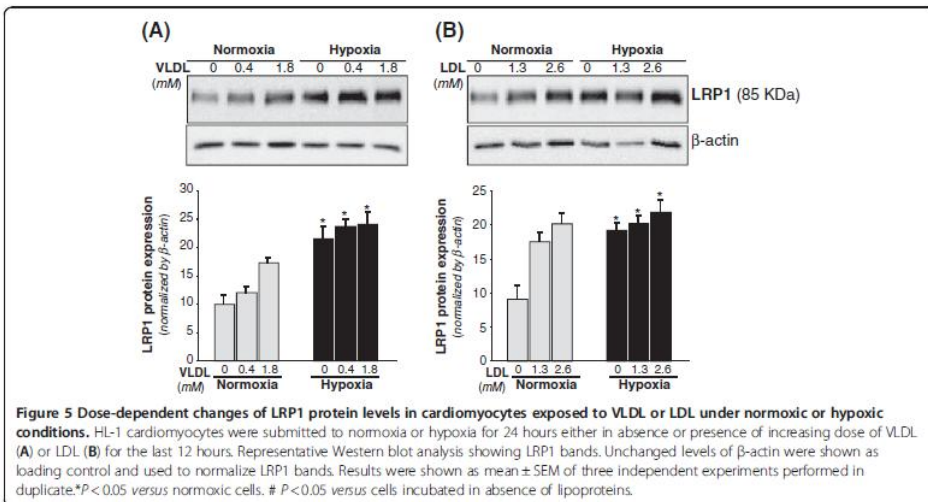




In agreement with real-time PCR data, Western blot analysis showed that LRP1 protein expression was significantly higher in ICM than in CNT hearts (ICM: 30.62 ± 13.93 vs CNT: 5.92 ± 0.66 , $P < 0.05$) (Figure 2A & B). Additionally, VLDLR protein expression was significantly upregulated in ICM compared to CNT samples (ICM: 15.48 ± 10.62 vs CNT: 3.68 ± 2.98 , $P < 0.05$) (Figure 2A & C). In order to know whether HIF-1 α transcription factor may play a role on lipoprotein receptor upregulation in ICM samples, we analyzed HIF-1 α

protein levels by Western blotting and used VEGF as a positive control. HIF-1 α protein levels were significantly higher in ICM in comparison with CNT hearts (ICM: 12.63 ± 2.92 vs CNT: 5.11 ± 1.97 , $P < 0.05$) (Figure 2A & D), as well as VEGF significantly increased in ICM samples. In contrast to LRP1 and VLDLR, LDLR protein expression was significantly lower in ICM samples (Figure 2A & E).

Immunohistochemical analysis (Figure 3A) showed that LRP1 (panel a) and HIF-1 α (panel b) staining were



undetectable within control myocardium. On the contrary, there was a positive staining for LRP1 (panel d) and HIF-1 α (panel e) in the myocardium of ICM patients. Confocal microscopy showed higher cardiomyocyte LRP1 staining in ICM patients compared to control subjects (Figure 4).

Effect of VLDL and LDL on LRP1 protein expression in cardiomyocytes under normoxic and hypoxic conditions
VLDL (1.8 mM) (Figure 5A) and LDL (2.6 mM) (Figure 5B) significantly increased LRP1 protein by 1.72-fold and 2-fold, respectively. Hypoxia *per se* also exerted a significant upregulatory effect on LRP1 expression in HL-1 cardiomyocytes in agreement with previous results [17]. Previous studies from our group showed that LRP1 play a key role for aggregated LDL (agLDL) uptake in human vascular smooth muscle cells [21-23]. To know whether LRP1 may also take modified lipids in cardiomyocytes, we exposed control and LRP1-deficient cardiomyocytes [17] to agLDL. As shown in Figure 6, LRP1 deficiency significantly decreased the strong intracellular CE accumulation ($65 \pm 3 \mu\text{g CE/mg protein}$) derived from agLDL (0.6 mM) in HL-1 cardiomyocytes. In contrast, LRP1 deficiency did not influence the slight intracellular CE ($10.6 \pm 0.2 \mu\text{g CE/mg protein}$) induced by native LDL (0.6 mM) in cardiomyocytes.

Myocardial neutral lipid content and correlation with lipoprotein receptor expression

Myocardial lipid content was analyzed by thin layer chromatography following lipid extraction. Figure 7 shows representative CE, TG and FC bands from ICM patients and controls. Both myocardial CE (ICM: 92.2 ± 68.3 vs CNT: 39 ± 18 , $P < 0.05$) and TG (ICM: 100.2 ± 44.4 vs CNT: 50.8 ± 39.4 , $P = 0.04$) content was significantly increased in ICM vs CNT. FC content of myocardium was unaltered by disease.

Myocardial CE strongly correlated with LRP1 mRNA ($R^2 = 0.74$, $P < 0.0001$) (Figure 8A) and LRP1 protein expression ($R^2 = 0.72$, $P < 0.0001$) (Figure 8B). Although to a minor extent, myocardial CE also correlated with VLDLR protein expression ($R^2 = 0.398$, $P < 0.012$). In contrast, myocardial TG content did not show any correlation with LRP1 mRNA or protein expression.

Discussion

Taken together, our results demonstrate for the first time that myocardial LRP1 expression and cholesteryl ester content appear strongly increased and interrelated in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients. In particular, we show that LRP1 is upregulated in ischemic human hearts at mRNA and protein levels, although to a different extent. This difference in the quantitative modulation of LRP1 at mRNA and protein levels by

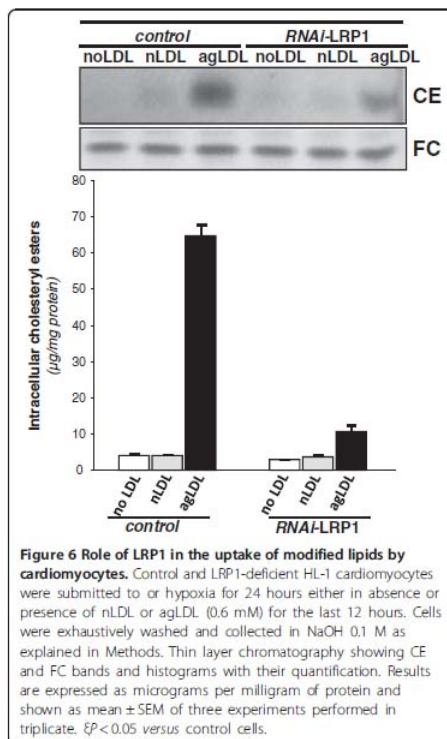
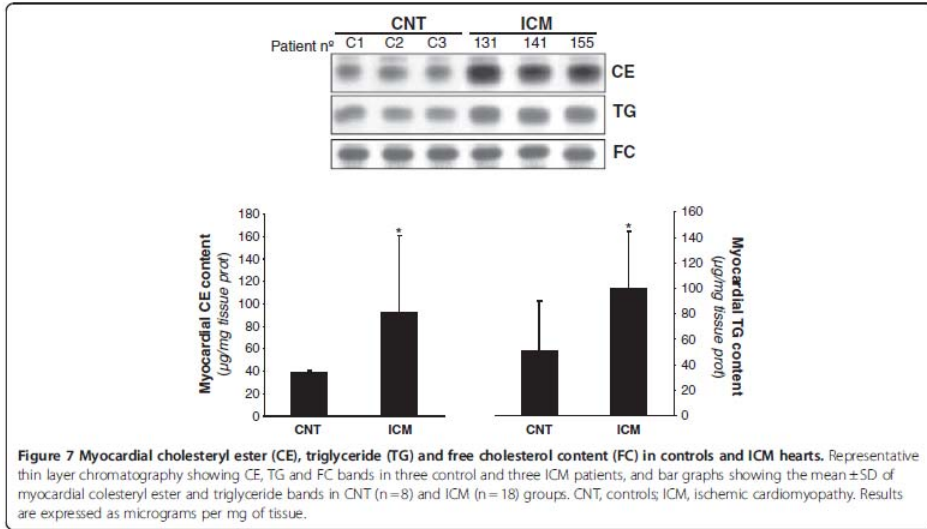


Figure 6 Role of LRP1 in the uptake of modified lipids by cardiomyocytes. Control and LRP1-deficient HL-1 cardiomyocytes were submitted to or hypoxia for 24 hours either in absence or presence of nLDL or agLDL (0.6 mM) for the last 12 hours. Cells were exhaustively washed and collected in NaOH 0.1 M as explained in Methods. Thin layer chromatography showing CE and FC bands and histograms with their quantification. Results are expressed as micrograms per milligram of protein and shown as mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate. $\xi P < 0.05$ versus control cells.

hypoxia has been previously shown in human VSMC and it may be explained at least in part by the long half-life time of LRP1 protein [18].

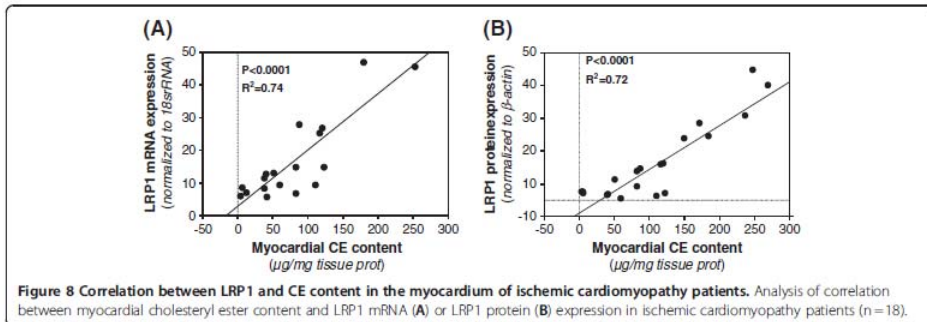
The upregulation of HIF-1 α protein levels in ICM hearts suggests that in patients, as previously shown in cultured cardiomyocytes [17] and vascular cells [18], HIF-1 α may participate in myocardial LRP1 upregulation in ischemic hearts. However, further studies are required to know the precise role of HIF-1 α on myocardial LRP1 overexpression in ischemic cardiomyopathy. In the group of patients included in this study, there was a high percentage of those with documented perfusion abnormalities, indicative of peri-infarct ischemia. Moreover, enrolled patients had at least one vessel affected by atherosclerosis. Therefore, cardiovascular risk factor such as hypercholesterolemia or hypertension likely modulate LRP1 expression in the myocardium, as previously reported by our group in the vascular wall [19,24-26]. Indeed, the presented results demonstrate that high VLDL and LDL dose strongly increased LRP1 protein levels in cardiomyocytes.



Ischemia has been reported to upregulate VLDLR expression in cultured cardiomyocytes [12,16] and mice [16]. We also found VLDLR protein overexpressed in a porcine model of acute myocardial infarction [17] and in human ischemic hearts. Although VLDLR has been reported to be upregulated at mRNA level in myocardial biopsies taken from patients scheduled for coronary bypass surgery [16], we did not observe alterations of mRNA VLDLR expression levels in explanted hearts from ICM patients. It has been previously suggested that cyclosporine, an immunosuppressant used for the treatment of transplant recipients, inhibits VLDLR mRNA expression in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients [16]. In contrast to LRP1 expression, LDLR mRNA expression was lower in ischemic hearts

compared to controls in agreement with our previous results in hypoxic cardiomyocytes [12,17] and vascular cells [18], suggesting that the classical LDLR plays no role in the neutral lipid accumulation associated to ischemic myocardium.

A significant finding of this study is the close association between LRP1 expression and cholesterol ester accumulation in ischemic human hearts. Although this study does not provide information about the mechanisms involved in the link between LRP1 expression and CE accumulation, previous studies in our group have shown that LRP1 plays an essential role in the selective VLDL-cholesterol ester uptake by hypoxic cardiomyocytes [17]. Additionally, results from the present study show that cardiomyocyte LRP1, as vascular LRP1 [21-23],



internalizes cholesteryl esters from modified lipoproteins. Taken together, these results support that CE over-accumulation in human ischemic hearts may be caused by the capacity of LRP1, when overexpressed by hypoxia, to take up cholesterol from lipoproteins. Previously, it has been shown that increased expression of VLDLR is essential for the accumulation of triglycerides in hypoxic cardiomyocytes and ischemic myocardium in mice [16]. These authors also found a slight but significant correlation between VLDLR mRNA and ORO staining. Here, we found that VLDLR, although to a minor extent that LRP1 expression, also correlated with CE accumulation in ischemic heart. In contrast, we did not observe any significant correlation between LRP1 or VLDLR expression and myocardial TG content. This lack of correlation may be related to the multiple pathways that influence myocardial TG content, that may derive from endogenous synthesis [27,28], diffusion of albumin-associated fatty acids [29] or lipoprotein-TG-hydrolysis by LpL [30,31].

In addition, also in agreement with our previous studies *in vitro* [12,17] and *in vivo* [17], we evidenced that in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients there was not only triglyceride but also cholesteryl ester accumulation. This is an interesting observation since most of the previous studies assumed that myocardial neutral lipid accumulation consist only in triglycerides [1-3,16]. Indeed, a precise knowledge about the mechanism of myocardial lipid uptake is required to prevent the deleterious consequences of this process in cardiac functionality.

Limitations and considerations of the study

The complexity of cardiomyopathy and heart failure originated by myocardial infarction cannot be afforded by testing the effect of hypoxia (1 % O₂) in cultured cardiomyocytes or the effect of coronary occlusion on porcine myocardial gene expression. However, these *in vitro* and *in vivo* models have been useful to identify new genes involved in pathophysiological mechanisms underlying the deleterious effect of hypoxia on cardiac function. Recently, our group has previously identified LRP1 as key receptor for cholesteryl ester accumulation in hypoxic cardiomyocytes and ischemic porcine myocardium [17]. Results from the present study show that there is a strong LRP1 upregulation that significantly correlates with cholesteryl ester accumulation in ischemic cardiomyopathy patients. Therefore, our results suggest that cardiac alterations associated to the deleterious effects of myocardial cholesterol accumulation may be modulated through LRP1 targeting in heart failure and cardiomyopathy.

The clinical consequences of lipid accumulation under ischemia have not been directly addressed in this study

but it is known that there is a close association between CE content of sarcoplasmic reticulum and SERCA-2 suppression [32]. Additionally, hypercholesterolemia exacerbates myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion [33]. It is also known that hypoxia exerted a downregulatory effect on SERCA2 expression through HIF-1 α [34]. Our group demonstrated that hypoxia exacerbates the alterations in calcium handling induced by VLDL through potentiation of SERCA2 downregulation [12], and that the percentage of waves was reduced in calcium-overloaded-LRP1-deficient cardiomyocytes under stimulation. Taken together, our results consistently point out that LRP1 is a potential molecular target to prevent myocardial CE accumulation, and thus the cardiac alterations induced by cholesterol loading in ischemic cardiomyopathy.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RC performed *in vitro* experiments and molecular analysis, OJB designed and set up immunohistochemical analysis, SR and CGM performed confocal microscopy experiments, OJB, VB, MP and JMR collected the data from the patients. JC and LB oversaw the manuscript. VLLC conceived the study, designed and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgement

The authors thank the continuous support of Laura Nasarre, Marta Sánchez and Ma Angeles Velasco. This work was funded by grants from Instituto de Salud Carlos III, REDINSCOR RD06/003/0000 (J. Cinca), RD06/0003/0015 (V. Lorente-Cortés and O. Juan-Babot), RD06/0003/1001 (M. Portoles and J. Rivera), FIS P11/00747 cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (F.E.D.E.R.) and by Fundació MARATÓ TV3 (080110). LB and VLLC are members of the international graduate program PROMISE (IRTG.1566).

Author details

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Ma Claret, 167, 08025, Barcelona, Spain. ²Cardiology Service, IIB-Sant Pau. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ³CREC. Research Program, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain. ⁴Research Center, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain. ⁵CIBER OBN, Instituto de Salud Carlos III, Cordoba, Spain.

Received: 3 July 2012 Accepted: 25 July 2012

Published: 8 August 2012

References

- Chabowski A, Gorski J, Calles-Escandon J, Tandon NN, Bonen A: Hypoxia-induced fatty acid transporter translocation increases fatty acid transport and contributes to lipid accumulation in the heart. *FEBS Lett* 2006, **580**:3617-3623.
- Schaffer JE: Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003, **12**:281-287.
- van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB: Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav* 2008, **94**:231-241.
- Goldfarb JW, Roth M, Han J: Myocardial fat deposition after left ventricular myocardial infarction: assessment by using MR water-fat separation imaging. *Radiology* 2009, **253**:65-73.
- Jodalén H, Stangeland L, Grong K, Vik-Mo H, Lekven J: Lipid accumulation in the myocardium during acute regional ischaemia in cats. *J Mol Cell Cardiol* 1985, **17**:973-980.
- Straeter-Knowlen IM, Evanochko WT, den Hollander JA, Wolkowicz PE, Balschi JA, Caulfield JB, Ku DD, Pohost GM: ¹H NMR spectroscopic

- imaging of myocardial triglycerides in excised dog hearts subjected to 24 hours of coronary occlusion. *Circulation* 1996, **93**:1464–1470.
7. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, Schaffer JE: Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2003, **100**:3077–3082.
 8. Barba I, Chavarria L, Ruiz-Meana M, Mirabet M, Aguiló E, Garcia-Dorado D: Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. *J Physiol* 2009, **587**:1331–1341.
 9. van de Weijer T, Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P: Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2011, **92**:10–18.
 10. Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patel S, Youker KA, Taegtmeyer H: Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes* 2002, **51**:2587–2595.
 11. Fujita S, Terasaki F, Otsuka K, Katashima T, Kanzaki Y, Kawamura K, Tanaka T: Markedly increased intracellular lipid droplets and disruption of intercellular junctions in biopsied myocardium from a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Vessel* 2008, **23**:440–444.
 12. Castellano J, Farré J, Fernandes J, Bayes-Genis A, Cincin J, Badimon L, Hove-Madsen L, Llorente-Cortés V: Hypoxia exacerbates Ca²⁺-handling disturbances induced by very low density lipoproteins (VLDL) in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011, **50**:894–902.
 13. Fielding CJ: Metabolism of cholesterol-rich chylomicrons. Mechanism of binding and uptake of cholesteryl esters by the vascular bed of the perfused rat heart. *J Clin Invest* 1978, **62**:141–151.
 14. Pilluta P, Hwang YC, Augustus A, Yokoyama M, Yagyu H, Johnston TP, Kaneko M, Ramasamy R, Goldberg IJ: Perfusion of hearts with triglyceride-rich particles reproduces the metabolic abnormalities in lipotoxic cardiomyopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, **288**:E1229–E1235.
 15. Niu YG, Hauton D, Evans RD: Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates. *J Physiol* 2004, **558**:225–237.
 16. Perman JC, Boström P, Lindbom M, Lidberg U, Stråhman M, Hägg D, Lindskog H, Scharin Täng M, Ornerovic E, Mattsson Hultén L, Jeppsson A, Petursson P, Olivecrona HG, Strickland DK, Ekroos K, Olofsson SO, Borén J: The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 2011, **121**:2625–2640.
 17. Cal R, Castellano J, Revuelta-López E, Aledo R, Barriga M, Farré J, Vilahur G, Nasane L, Hove-Madsen L, Badimon L, Llorente-Cortés V: Low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced VLDL-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2012, **94**:469–479.
 18. Castellano J, Aledo R, Sendra J, Costales P, Juan-Babot O, Badimon L, Llorente-Cortés V: Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, **31**:1411–1420.
 19. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Sánchez S, Rodríguez C, Badimon L: Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* 2002, **106**:3104–3110.
 20. Sweedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Lévy S, Linde C, Lopez-Sendon JL, Nieminen MS, Piérard L, Remme WJ: Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005, **26**:1115–1140.
 21. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L: LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**:1572–1579.
 22. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Hurt-Camejo E, Martínez-González J, Badimon L: Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, **22**:387–393.
 23. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Camino-López S, Costales P, Badimon L: Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**:117–123.
 24. Costales P, Aledo R, Vértiza S, Das A, Shah VH, Casado M, Badimon L, Llorente-Cortés V: Selective role of sterol regulatory element binding protein isoforms in aggregated LDL-induced vascular low density lipoprotein receptor-related protein-1 expression. *Atherosclerosis* 2010, **213**:458–468.
 25. Llorente-Cortés V, Costales P, Bernués J, Camino-López S, Badimon L: Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription. *J Mol Biol* 2006, **359**:950–960.
 26. Sendra J, Llorente-Cortés V, Costales P, Huesca-Gómez C, Badimon L: Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovasc Res* 2008, **78**:581–589.
 27. Glenn DJ, Wang F, Nishimoto M, Cruz MC, Uchida Y, Holleran WM, Zhang Y, Yeghiazarians and D.G. Gardner: A murine model of isolated cardiac steatosis leads to cardiomyopathy. *Hypertension* 2011, **57**:216–222.
 28. Liu L, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu YH: Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007, **117**:1679–1689.
 29. Hamilton JA, Kamp F: How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 1999, **48**:2255–2269.
 30. Merkel M, Heeren J, Dudeck W, Rinninger F, Radner H, Breslow JL, Goldberg IJ, Zechner R, Gretten H: Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 2002, **277**:7405–7411.
 31. Augustus AS, Koko Y, Yagyu H, Goldberg IJ: Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, **284**:E331–339.
 32. Huang Y, Walker KE, Hanley F, Narula J, Houser SR, Tulenko TN: Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. *Circulation* 2004, **109**:97–102.
 33. Osipov RM, Bianchi C, Feng J, Clements RT, Liu Y, Robich MP, Glazer HP, Sodha NR, Sellke FW: Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. *Circulation* 2009, **120**(11 Suppl):S22–S30.
 34. Ronkainen VP, Skoumal R, Tavi P: Hypoxia and HIF-1 suppress SERCA2a expression in embryonic cardiac myocytes through two interdependent hypoxia response elements. *J Mol Cell Cardiol* 2011, **50**:1008–1016.

doi:10.1186/1479-5876-10-160

Cite this article as: Cal et al.: Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients. *Journal of Translational Medicine* 2012 **10**:160.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ARTÍCULO 3

“Low density lipoproteins (LDL) promote unstable calcium handling linked to reduce SERCA2 and connexin-40 expression in cardiomyocytes”

“Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), promueven la inestabilidad en el manejo del calcio ligado a la reducción de la expresión de SERCA2 y de la conexina-40 en cardiomiocitos”

REVISTA: Pendiente de aceptación en *PLoS ONE* (2013)

Factor de impacto: 4.092

AUTORES: Barriga M¹⁺, Cal R¹⁺, Cabello N¹, Llach A², Vallmitjana A⁴, Benítez R⁴, Badimon L^{1,3}, Cinca J², Llorente-Cortés V¹, Hove-Madsen L¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

²Servicio de Cardiología, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

³CIBER de Obesidad y Nutrición (CIBER-OBN)

⁴Departamento Ingeniería de Sistemas, Automática e Informática Industrial, Universitat Politècnica de Catalunya

⁺Coautores

RESUMEN:

Objetivos: Los efectos dañinos de tener altos niveles de colesterol en plasma sobre el sistema cardiovascular son ampliamente conocidos, pero poca atención se ha prestado en la repercusión de éstos sobre la funcionalidad del cardiomiocito. Se comprobó la hipótesis de cómo afecta el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) sobre la dinámica del calcio y la propagación de señales en cultivos celulares de cardiomiocitos atriales HL-1.

Métodos y resultados: Se marcó el calcio intracelular, para visualizarlo por microscopía confocal, con fluo-4 y se sometió a estimulación de campo a los cultivos de cardiomiocitos HL-1 con frecuencias crecientes de estimulación. La expresión génica y proteica de la conexina-40 (Cx40), la conexina-43 (Cx43) y la ATPasa del retículo sarcoplásmico que transfiere Ca^{2+} (SERCA2) fue determinada por PCR a tiempo real y Western Blot. A frecuencias de estimulación bajas los cultivos presentan curvas de movilización del calcio uniformes a todas las dosis de lipoproteínas LDL testadas. Sin embargo a la dosis alta de 500 μg LDL/mL si se redujo la amplitud de las curvas de movilización del calcio un 43%. Además de forma dosis dependiente, las LDL incrementaron la fracción de respuestas “beat-to-beat” irregulares y alternantes cuando el intervalo de estimulación fue acortado. Este efecto fue ligado a una reducción en la expresión proteica de SERCA2 alcanzando un máximo de un 43% a la dosis de 200 μg LDL/mL. El colesterol de LDL también redujo la velocidad de conducción de las señales de calcio desde 3.2 ± 0.2 mm/s sin LDL hasta 1.7 ± 0.1 mm/s con 500 μg LDL/mL. Esto coincidió con una reducción en la expresión de Cx40 sin alterar significativamente la Cx43.

Conclusión: El colesterol procedente de lipoproteínas LDL desestabiliza el manejo del calcio en cultivos de cardiomiocitos HL-1 sujetos a un ritmo rápido de estimulación al reducir la expresión de SERCA2 y Cx40 y al reducir la velocidad de conducción de las señales de calcio.

PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO: La directora de la tesis Vicenta Llorente Cortés da constancia de que el doctorando Roi Cal Pérez-Quevedo participó en el cultivo de la línea celular de cardiomiocitos HL-1, el aislamiento de lipoproteínas LDL, la extracción lipídica, el procesamiento de las muestras obtenidas de células HL-1 (PCR a tiempo real, Western Blot y CCF), el análisis de resultados y la configuración y elaboración final del artículo.

La directora: Vicenta Llorente Cortés

**Low density lipoproteins promote unstable calcium handling linked to reduced SERCA2
and connexin-40 expression in cardiomyocytes**

Barriga M^{a*}, Cal R^{a*}, Cabello N^a, Llach A^b, Vallmitjana A^d, Benítez R^d, Badimon L^{a,c}, Cinca J^b,
Llorente-Cortés V^{a,ξ}, Hove-Madsen L^{a,ξ}.

^aCardiovascular Research Center, CSIC-ICCC. IIB-Sant Pau. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
Barcelona

^bCardiology Service, IIB-Sant Pau. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de
Barcelona

^cCIBER de Obesidad y Nutricion (CIBER-*OBN*)

^dDept Ingenieria de Sistemas, Automática e Informática Industrial, Universitat Politècnica de
Catalunya

* These authors contributed equally to this work

Short title: LDL-dependent stability and propagation of calcium transients.

Key words: LDL-cholesterol; Myocyte function; Calcium imaging; SERCA2; Connexin

ξ Corresponding authors:

Vicenta Llorente-Cortés & Leif Hove-Madsen

Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC,

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Sant Antoni M^a Claret, 167

08025 Barcelona

Tel:+34 935565620

FAX: +34 935565559

E-mail: cllorente@csic-iccc.org & lhove@csic-iccc.org

ABSTRACT

The damaging effects of high plasma levels of cholesterol in the cardiovascular system are widely known, but little attention has been paid to direct effects on cardiomyocyte function. We therefore aimed at testing the hypothesis that Low Density Lipoprotein (LDL) cholesterol affects calcium dynamics and signal propagation in cultured atrial myocytes. For this purpose, intracellular calcium was visualized in fluo-4 loaded atrial HL-1 myocyte cultures subjected to field stimulation at increasing stimulation frequencies. Connexin-43 (Cx43), connexin-40 (Cx40) and SERCA2 mRNA and protein expression levels were determined by real time PCR and western blot analysis. At low stimulation frequencies all cultures had uniform calcium transients at all LDL concentrations tested. However, 500 μg LDL/mL maximally reduced the calcium transient amplitude by 43% from 0.30 ± 0.04 to 0.17 ± 0.02 ($p<0.05$). Moreover, LDL-cholesterol dose-dependently increased the fraction of alternating and irregular beat-to-beat responses observed when the stimulation interval was shortened. This effect was linked to a concurrent reduction in SERCA2 protein expression reaching a maximum of 43% at 200 μg LDL/mL ($p<0.05$). LDL-cholesterol also slowed the conduction velocity of the calcium signal from $3.2\pm 0.2\text{mm/s}$ without LDL to $1.7\pm 0.1\text{mm/s}$ with 500 μg LDL/mL ($p<0.05$). This coincided with a reduction in Cx40 expression (by $44\pm 3\%$; $p<0.05$ for mRNA and by $79\pm 2\%$; $p<0.05$ for Cx40 protein at 200 $\mu\text{g/ml}$ LDL) whereas the Cx-43 expression did not change significantly. In conclusion, LDL-cholesterol destabilizes calcium handling in cultured atrial myocytes subjected to rapid pacing by reducing SERCA2 and Cx40 expression and by slowing the conduction velocity of the calcium signal.

INTRODUCTION

The damaging effects of hypercholesterolemia in the cardiovascular system are widely known, but little attention has been paid to direct effects on cardiomyocyte function even though most of the adult patients suffering from dyslipemia in industrialized societies are at risk of suffering sudden cardiac death (SDC) caused by arrhythmias[31]. Therefore, an antiarrhythmic potential of cholesterol-lowering drugs may result from either a direct electrophysiological antiarrhythmic effect of these drugs or from an indirect antiarrhythmic action resulting from lowering the cholesterol levels provided that cholesterol have arrhythmogenic actions. Since cardiac arrhythmias among others have been linked to changes in the activity of ion channels[22, 26, 27], altered intracellular calcium handling[10, 17, 19, 22, 28], or disturbances in the conduction of the electrical signal through cardiac gap junctions[24], the antiarrhythmic effects of cholesterol-lowering drugs could be due to a direct or indirect action on one or several of these mechanisms.

Regarding the direct actions of cholesterol-lowering drugs it has been reported that statins can reduce the density of the sarcolemmal Na⁺-K⁺ pump[9], desensitize beta-adrenergic signalling[20] and reduce beta-adrenergic receptor mediated RAC-1 activation and apoptosis[12], affect the activity of Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells[23], the expression of genes that regulate calcium homeostasis in skeletal muscle[6], and calcium uptake in smooth muscle cells[4]. Although several of these properties of statins may confer antiarrhythmic activity to statins they have not been directly associated with specific antiarrhythmic actions.

On the other hand, hypercholesterolemia has been associated with electrical remodelling and increased vulnerability to ventricular fibrillation in a rabbit hypercholesterolemic model[15]. Recently, we also reported that very low-density lipoproteins (VLDL) uptake induces intracellular lipid accumulation in cardiomyocytes, which is associated with disturbances in intracellular calcium handling linked to SERCA2 downregulation[2]. These results suggest that lipoprotein accumulation may modulate intracellular calcium handling. Furthermore, hypercholesterolemia has been associated with down-regulation of connexin-40 (Cx40) and connexin-43 (Cx43)[1, 14] and statins have been shown to reverse this effect[1]. Thus, it is conceivable that low density lipoprotein (LDL) uptake and derived intracellular lipid accumulation have direct effects on intracellular calcium homeostasis and signal propagation in cardiac myocytes. To test this hypothesis, we here investigated how exogenous LDL affected cholesterol accumulation in cultured cardiomyocytes and the concurrent effects on calcium dynamics, signal propagation, as well as SERCA2 and connexin expression.

METHODS

HL-1 cardiomyocyte cell culture

The murine HL-1 cell line was generated by Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Centre, New Orleans, Louisiana, USA) and kindly provided by Dr. U Rauch (Charité-Universitätmedizin Berlin). These cells showed cardiac characteristics similar to those of adult cardiomyocytes such as the presence of highly ordered myofibrils and cardiac-specific junctions in the form of intercalated disks as well as the presence of cardio-specific voltage dependent currents such as the I_{Kr} and an ultrastructure similar to primary cultures of adult atrial cardiac myocytes.[3, 29]. The HL-1 cells were maintained in a Claycomb Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 μ M norepinephrine, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and L-Glutamine 2 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) in plastic dishes, coated with 12.5 μ g/mL fibronectin and 0.02% gelatin, in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

LDL isolation and characterization

Human LDLs (d_{1.019}-d_{1.063} g/mL) were obtained from pooled sera of normocholesterolemic anonymous volunteers. LDL preparations were less than 24 hours old, non-oxidized (less than 1.2 mmol malonaldehyde/mg protein LDL) and without detectable levels of endotoxin (Limulus Amebocyte Lysate test, Bio Whittaker). The purity of LDLs was assessed by agarose gel electrophoresis (Paragon System, Beckmann) and the composition of LDL was, as expected, cholesterol:protein (2:1). The study was approved by the

institutional ethics committee at Hospital of Santa Creu i Sant Pau and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Lipid extraction

At the end of LDL-exposure period, cells were exhaustively washed, twice with PBS, twice with PBS–1% BSA, and twice with PBS–1% BSA–heparin 100 U/mL before they were harvested for intracellular lipid determination or calcium-handling studies as previously described[2, 18]. One aliquot of the cell suspension was extracted with methanol/dichlorometane (2:1, vol/vol). After solvent removal under an N₂ stream, the lipid extract was redissolved in dichloromethane and one aliquot was partitioned by thin layer chromatography.

Determination of cholesteryl ester and free cholesterol intracellular content

Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica G-24 plates. The different concentrations of standards (a mixture of cholesterol, cholesterol palmitate, triglycerides, diglycerides and monoglycerides) were applied to each plate. The chromatographic developing solution was heptane/diethylether/acetic acid (74:21:4, vol/vol/vol). The spots corresponding to cholesteryl ester (CE) and free cholesterol (FC) were quantified by densitometry against the standard curve of cholesterol palmitate, triglycerides and cholesterol, respectively, using a computing densitometer (Molecular Dynamics).

Determination of intracellular calcium handling

Twenty-four hours before experimentation, HL-1 cardiomyocytes were incubated in a culture medium containing one of four LDL concentrations: 0, 125, 250 or 500 µg/mL, and

the stability and propagation of the calcium signal was recorded upon a step-wise reduction of the stimulation interval from 2.5 to 0.75s. To detect changes in intracellular calcium handling, cultures were loaded with fluo-4 and calcium was assessed in a 1x1 mm square of the cell culture using a resonance scanning confocal microscope (Leica SP5 AOBS) with a 10x objective. Cell cultures were loaded with 2.5 μM fluo-4AM for 15 min at room temperature followed by 30 min of deesterification. Fluo-4 was excited at 488 nm with the laser intensity set to 20% and subsequently attenuated to 10%. Fluorescence emission was collected between 505 and 650 nm at a frame rate of 25 Hz, and changes in intracellular calcium were estimated by normalizing the fluorescence emission (F) to the fluorescence emission at rest (F_0). The experimental solution contained (in mM): NaCl 136, KCl 4, NaH_2PO_4 0.33, NaHCO_3 4, CaCl_2 2, MgCl_2 1.6, HEPES 10, Glucose 5, pyruvic acid 5, (pH=7.4). Calcium signals were detected and characterized off-line using Leica LAS software or a custom made program that automatically detects the calcium signal (baseline fluorescence, peak fluorescence, calcium transient amplitude, and calcium transient duration at half maximum (FDHM) for each cell in the culture. Cell segmentation is performed by inspecting spatial regions presenting large variability in the fluorescence signal. Regions with sizes between 150 and 1500 μm^2 are identified as cells and their average calcium signal is measured. Cells presenting a signal-to-noise-ratio below 2.5 are rejected and classified as inactive cells. Calcium transients recorded at a given stimulation interval were classified as uniform, alternating, or irregular according to the beat-to-beat variations in the amplitude of the calcium transients. The propagation pattern of the calcium transient through the image field was also characterized as uniform, alternating or irregular. In this case, the propagation pattern was considered uniform if all calcium transients propagated from the proximal region (next to the stimulation electrode) to the distant region of the image field. Alternating propagation

patterns were those showing an alternating response at the distal region, with the extreme being a response on every second pulse at the distant region. Irregular propagation patterns included all responses where the response at the distal region was irregular.

Real time PCR

Gene expression of SERCA2, Cx40, and Cx43 was assessed by real time PCR-7000 Sequence Detection System of ABIPRISM (Applied Biosystems) using the following assays on demand: mouse Cx40 (Mn01264990_m1), mouse Cx43 (Mn00439105_m1), SERCA2 (Rn01499537_m1), Rat ribosomal protein, large, P0 (*ARBP*) (Rn00821065_g1) was used as endogenous control. Taqman real-time PCR was performed with 1- μ L/well of RT products (1 μ g total RNA) in 10 μ L of TaqMan PCR Master Mix (PE Biosystem) with the primers at 300 nM and the probe at 200 nM. PCR was performed at 95°C for 10 minutes (for AmpliTaq Gold activation) and then run for 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute on the ABIPRISM 7000 Detection System. The threshold cycle (Ct) values were determined and normalized to endogenous control[2].

Western blot

Proteins were analyzed by Western blot analysis as previously described. Blots were incubated with monoclonal antibodies against SERCA2 (Novus Biologicals NB100-237), Cx40 (Invitrogen, 36-4900) and Cx43 (Sigma-Aldrich C6219). Equal loading of protein in each lane was verified staining filters with Ponceau and also by incubating blots with monoclonal antibodies against beta tubulin for HL-1 cardiomyocytes (Abcam, ab6046, dilution 1:500).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. A statview (Abacus Concepts) statistical package for the Macintosh Computer System was used for all analysis. Statistical significance was assessed by ANOVA for repeated measurements and by t-test when appropriate. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Elevation of exogenous LDL levels induces cholesterol accumulation.

To test how exogenous LDL levels affected cholesterol accumulation in cultured cardiomyocyte, HL-1 cardiomyocytes were exposed to increasing concentration of LDL (0, 50, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As shown in Figure 1, increasing LDL levels increased basal intracellular CE from 2.6 ± 0.2 at baseline to 23.5 ± 1.6 with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL and 45 ± 4 μg CE/mg cell protein with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL. As expected, intracellular free cholesterol (FC) levels were not altered by LDL in HL-1 cardiomyocytes.

Effect of LDL on the calcium transient

To test if intracellular CE accumulation was associated with changes in intracellular calcium handling, we first examined how exogenous LDL affected the intracellular calcium transient elicited by field stimulation. Figure 2A shows an image of a field with indication of 427 myocytes that had calcium transients when subjected to field stimulation. Representative traces of global calcium transients recorded in control conditions and with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL, which induces maximal CE accumulation, are shown in Figure 2B. When stimulated at intervals of 2s, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL reduced the amplitude of the calcium transient by 43% (from 1.33 ± 0.04 to 1.20 ± 0.02 , $p<0.05$), and there was a concurrent reduction in both baseline and peak fluorescence (panel 2C). By contrast, the duration of the calcium transient at half maximum was unaffected by LDL ($938\pm 33\text{ms}$ with LDL vs. $1021\pm 32\text{ms}$ in control).

To determine whether the observed changes in the calcium transient were associated to LDL-mediated changes in the expression of SERCA2, we analyzed the effect of increasing LDL doses on SERCA2 expression. Figure 2D-E show that LDL dose-dependently reduced the expression of both SERCA2 mRNA levels and protein levels. At a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

LDL, SERCA2 protein was maximally reduced to 43% of the level detected in myocytes incubated without LDL.

Effect of LDL on the stability and propagation of the calcium transient

To test if the reduction in SERCA2 expression also affected the beat-to-beat stability of the calcium transient, myocyte cultures were subjected to field stimulation at increasingly shorter pacing intervals. Figure 3A shows calcium transients elicited at increasingly shorter stimulation intervals in the absence of LDL (Control) and in the presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL. The calcium transient amplitudes were uniform at all LDL concentrations with long intervals between stimulation pulses. As the stimulation interval was shortened cultures started to present alternating (cyclical oscillations between two or three values) or irregular calcium transients (cultures responded in an irregular manner to the stimulation pulses). Figure 3B shows examples of uniform, alternating and irregular responses. Figure 3C shows the relationship between the stimulation interval and the percentage of preparations presenting uniform, alternating and irregular responses. Moreover, it shows that LDL-cholesterol increased the fraction irregular responses and decreased the fraction of uniform responses at shorter stimulation intervals. Thus, when stimulated at 0.75s intervals, the fraction of irregular responses increased from 41% at 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL to 71% at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL and the fraction of uniform responses decreased from 30% to 8%.

To determine if exogenous LDL affected the propagation of the calcium signal across the myocyte culture, calcium transients were measured in two regions of interest proximal and distant to the stimulation electrodes. Figure 4A shows a map of an image field with indication of the activation time for each myocyte in the field. The black rectangle indicates the region used to quantify the calcium transient proximal to the stimulation electrode and

the calcium transient distant to the stimulation electrodes was quantified in the region delimited by the light grey rectangle. Figure 4B illustrates how incubation with LDL dramatically impaired the ability of calcium signal to propagate uniformly from the proximal to the distant region. Figure 4C shows how LDL dose-dependently increased the fraction of non-uniform propagation patterns.

To determine if the promotion of non-uniform propagation patterns by increasing LDL-doses was linked to changes in the propagation velocity, this parameter was determined as the time required for the calcium transient to advance from the proximal (green rectangle) to the distant (pink rectangle) region of the myocyte culture as shown in figure 5A. Figure 5B shows that LDL-dose dependently reduced the propagation velocity (dx/dt) at stimulation frequencies where signal propagation was uniform.

Effect of LDL on connexin-40 and connexin-43 expression

To determine whether alterations in the propagation of the calcium signal were associated to changes in the expression of connexins, we analyzed the effect of increasing dose of LDL on Cx40 and Cx43 expression in HL-1 cardiomyocytes. LDL at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ maximally reduced Cx40 mRNA expression by 45% (Figure 6A) and Cx40 protein expression by 79% (Figure 6B). In contrast, LDL did not exert a significant effect on Cx43 mRNA or protein expression. Interestingly, we found an inverse correlation between intracellular CE content and Cx40 protein expression (Figure 6C) in HL-1 cardiomyocytes.

DISCUSSION

The main finding of this study is that LDL-cholesterol reduces the calcium transient in a dose-dependent manner, destabilizes calcium handling on a beat-to-beat basis and slows the conduction velocity of the calcium signal in cultured atrial myocytes subjected to rapid pacing. This alteration of calcium handling is accompanied by an LDL-dependent down-regulation of SERCA2 and Cx40 expression.

LDL-mediated reduction of the calcium transient

We have recently shown that exposure of cultured cardiomyocytes to high VLDL doses induce intracellular CE and triglyceride accumulation and a concurrent reduction in SERCA2 expression, SR calcium loading, and in the intracellular calcium transient[2]. The present data show that exposure to pathological doses of LDL also promotes CE accumulation, reduces SERCA2 expression, and diminishes the calcium transient; supporting the notion that intracellular CE accumulation impairs SR calcium handling. In line with this, a previous study performed in a hypercholesterolemic animal model showed that SERCA2 expression inversely correlated with CE lipid enrichment of the sarcoplasmic reticulum[11].

LDL-mediated destabilization of the beat-to-beat response

Interestingly, high extracellular LDL levels also altered the beat-to-beat stability of the calcium transient when myocyte cultures were subjected to increased stimulation frequency. Theoretically, the LDL-mediated reduction in SERCA2 expression could lead to insufficient SR calcium reuptake at short pacing intervals, and thus affect the beat-to-beat stability of the calcium transient[16]. However, insufficient SR calcium reuptake would also be expected to result in a rate-dependent elevation of cytosolic calcium concentration at

baseline, a phenomenon that was observed in control conditions but not with high extracellular LDL (see figure 3). Instead, LDL dose-dependently impaired propagation of the calcium transient across the myocyte culture at short pacing intervals suggesting a reduction in excitability[21] and/or a reduction in the communication between the cultured cardiomyocytes[5, 8].

LDL-mediated reduction of connexin-40 expression and signal propagation

The observation that the Cx40 protein expression is dose dependently reduced as the LDL-induced accumulation of intracellular CE increases could account for the observed LDL-mediated reduction in the propagation velocity of the calcium signal[5]. Moreover, the observation that intracellular CE derived from LDL plays a significant role on Cx40 reduction is in accordance with previous work in aortic endothelium where the Cx40 expression was found strongly reduced in a hyperlipidemic apoE knockout mice[30]. In contrast to the downregulatory effect of LDL on Cx40 expression, we did not observe any significant effects of LDL on CX43 expression in HL-1 cardiomyocytes, suggesting that Cx40 and Cx43 are differentially regulated by LDL in atrial cardiomyocytes.

Previous studies in mouse and goat models have reported that lack of Cx40 increases atrial vulnerability to arrhythmia[13, 25], suggesting that the LDL-mediated reduction in Cx40-expression reported here might increase the vulnerability to atrial arrhythmia. In line with this notion, a marked increase in intracellular lipid droplets has been associated to the disruption of intercellular junctions in the biopsied myocardium from a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[7].

Considerations on the model

Although our findings cannot be directly extrapolated to clinical conditions, cultured atrial HL-1 myocytes retain fundamental features of the native cardiomyocyte such as intracellular calcium transients and contraction in response to electrical field stimulation as well as propagation of the calcium signal through the cultured adult cardiomyocytes[3, 29]. Moreover, this *in vitro* model may be useful to investigate effect of high LDL levels on intracellular lipid accumulation and calcium handling in cardiomyocytes, and appropriate for studying concurrent effects of LDL on the expression of calcium handling proteins, on the intracellular calcium transient, and on its propagation through the multicellular myocyte preparation.

In summary, our results highlight LDL-cholesterol as a potential contributor to reductions of the calcium transient amplitude and its propagation in cardiomyocytes by suppressing SERCA2 and Cx-40 expression.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation to LH-M (CNIC2009-08, SAF2011-30312), to RB (DPI2009-06999), and from the Spanish Ministry of Health and Consume to VL (FIS PI11/00747). LB and VLLC are members of the international graduate program PROMISE (IRTG-1566), supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bonn, Germany). Funding from Redes de Investigación Cooperativa, Instituto de Salud Carlos III, red REDINSCOR RD06-0003-0000 and RD06-0003-0015 and Fundació MARATÓ TV3 (080110) is also acknowledged.

The authors have no conflicts of interest to declare

REFERENCES

1. Bacova B, Radosinska J, Knezl V, Kolenova L, Weismann P, Navarova J, Barancik M, Mitasikova M, Tribulova N (2010) Omega-3 fatty acids and atorvastatin suppress ventricular fibrillation inducibility in hypertriglyceridemic rat hearts: implication of intracellular coupling protein, connexin-43. *J Physiol Pharmacol* 61:717-723
2. Castellano J, Farre J, Fernandes J, Bayes-Genis A, Cinca J, Badimon L, Hove-Madsen L, Llorente-Cortes V (2011) Hypoxia exacerbates Ca²⁺-handling disturbances induced by very low density lipoproteins (VLDL) in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 50:894-902 doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.002
3. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, Jr. (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2979-2984
4. Clunn GF, Sever PS, Hughes AD (2010) Calcium channel regulation in vascular smooth muscle cells: synergistic effects of statins and calcium channel blockers. *Int J Cardiol* 139:2-6 doi: 10.1016/j.ijcard.2009.05.019
5. de Groot JR, Veenstra T, Verkerk AO, Wilders R, Smits JP, Wilms-Schopman FJ, Wiegerinck RF, Bourier J, Belterman CN, Coronel R, Verheijck EE (2003) Conduction slowing by the gap junctional uncoupler carbenoxolone. *Cardiovascular research* 60:288-297 doi: 10.1016/j.cardiores.2003.07.004
6. Draeger A, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Hoppeler H, Mueller M, Breil F, Mohaupt MG, Babiychuk EB (2010) Statin therapy and the expression of genes that regulate calcium homeostasis and membrane repair in skeletal muscle. *Am J Pathol* 177:291-299 doi: 10.2353/ajpath.2010.091140

7. Fujita S, Terasaki F, Otsuka K, Katashima T, Kanzaki Y, Kawamura K, Tanaka T, Kitaura Y (2008) Markedly increased intracellular lipid droplets and disruption of intercellular junctions in biopsied myocardium from a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Vessels* 23:440-444 doi: 10.1007/s00380-008-1079-0
8. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP (1993) The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci* 105:985-991
9. Gray DF, Bundgaard H, Hansen PS, Buhagiar KA, Mihailidou AS, Jessup W, Kjeldsen K, Rasmussen HH (2000) HMG CoA reductase inhibition reduces sarcolemmal Na(+)-K(+) pump density. *Cardiovascular research* 47:329-335 doi: 10.1016/S0008-6363(00)00106-1
10. Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genis A, Roura S, Rodriguez Font E, Aris A, Cinca J (2004) Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation* 110:1358-1363 doi: 10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87
11. Huang Y, Walker KE, Hanley F, Narula J, Houser SR, Tulenko TN (2004) Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. *Circulation* 109:97-102 doi: 10.1161/01.CIR.0000109213.10461.F6
12. Ito M, Adachi T, Pimentel DR, Ido Y, Colucci WS (2004) Statins inhibit beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes via a Rac1-dependent mechanism. *Circulation* 110:412-418 doi: 10.1161/01.CIR.0000136088.18960.E6

13. Kirchhoff S, Nelles E, Hagedorff A, Kruger O, Traub O, Willecke K (1998) Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 8:299-302 doi: 10.1016/S0960-9822(98)70114-9
14. Lin LC, Wu CC, Yeh HI, Lu LS, Liu YB, Lin SF, Lee YT (2005) Downregulated myocardial connexin 43 and suppressed contractility in rabbits subjected to a cholesterol-enriched diet. *Lab Invest* 85:1224-1237 doi: 10.1038/labinvest.3700324
15. Liu YB, Wu CC, Lu LS, Su MJ, Lin CW, Lin SF, Chen LS, Fishbein MC, Chen PS, Lee YT (2003) Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling, and increased vulnerability to ventricular fibrillation in hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 92:1145-1152 doi: 10.1161/01.RES.0000072999.51484.92
16. Llach A, Molina CE, Fernandes J, Padro J, Cinca J, Hove-Madsen L (2011) Sarcoplasmic reticulum and L-type Ca(2) channel activity regulate the beat-to-beat stability of calcium handling in human atrial myocytes. *J Physiol* 589:3247-3262 doi: 10.1113/jphysiol.2010.197715
17. Llach A, Molina CE, Prat-Vidal C, Fernandes J, Casado V, Ciruela F, Lluís C, Franco R, Cinca J, Hove-Madsen L (2011) Abnormal calcium handling in atrial fibrillation is linked to up-regulation of adenosine A2A receptors. *Eur Heart J* 32:721-729 doi: 10.1093/eurheartj/ehq464
18. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Camino-Lopez S, Costales P, Badimon L (2006) Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:117-123 doi: 10.1161/01.ATV.0000193618.32611.8b

19. Mackenzie L, Bootman MD, Laine M, Berridge MJ, Thuring J, Holmes A, Li WH, Lipp P (2002) The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca(2+) signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol* 541:395-409 doi: 10.1113/jphysiol.2001.013411
20. Muhlhauser U, Zolk O, Rau T, Munzel F, Wieland T, Eschenhagen T (2006) Atorvastatin desensitizes beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes via reduced isoprenylation of G-protein gamma-subunits. *FASEB J* 20:785-787 doi: 10.1096/fj.05-5067fje
21. Osadchii OE, Soltysinska E, Olesen SP (2011) Na⁺ channel distribution and electrophysiological heterogeneities in guinea pig ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H989-1002 doi: 10.1152/ajpheart.00816.2010
22. Pogwizd SM (2000) Increased Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger in the failing heart. *Circ Res* 87:641-643 doi: 10.1161/01.RES.87.8.641
23. Seto SW, Au AL, Lam TY, Chim SS, Lee SM, Wan S, Tjiu DC, Shigemura N, Yim AP, Chan SW, Tsui SK, Leung GP, Kwan YW (2007) Modulation by simvastatin of iberiotoxin-sensitive, Ca²⁺-activated K⁺ channels of porcine coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 151:987-997 doi: 10.1038/sj.bjp.0707327
24. van der Velden HM, Jongsma HJ (2002) Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets. *Cardiovascular research* 54:270-279 doi: 10.1016/S0008-6363(01)00557-0
25. van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, van Zijverden M, Groenewegen WA, Allesie MA, Jongsma HJ (1998) Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9:596-607

26. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM (1999) Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 85:428-436 doi: 10.1161/01.RES.85.5.428
27. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM (1997) Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 80:772-781 doi: 10.1161/01.RES.80.6.772
28. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Deng SX, Vest JA, Cervantes D, Coromilas J, Landry DW, Marks AR (2004) Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* doi: 304:292-296 10.1126/science.1094301
29. White SM, Constantin PE, Claycomb WC (2004) Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H823-829 doi: 10.1152/ajpheart.00986.2003
30. Yeh HI, Lu CS, Wu YJ, Chen CC, Hong RC, Ko YS, Shiao MS, Severs NJ, Tsai CH (2003) Reduced expression of endothelial connexin37 and connexin40 in hyperlipidemic mice: recovery of connexin37 after 7-day simvastatin treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1391-1397 doi: 10.1161/01.ATV.0000083508.21989.15
31. Zipes DP, Wellens HJ (1998) Sudden cardiac death. *Circulation* 98:2334-2351 doi: 10.1161/01.CIR.98.21.2334

FIGURE LEGENDS

Figure 1. LDL induces intracellular cholesteryl ester accumulation. **A** Thin layer chromatography showing intracellular cholesteryl ester and free cholesterol in HL-1 cell cultures incubated with 0, 50, 125, 250, and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL. **B** Line graphs showing the relationship between the extracellular LDL concentration and intracellular cholesteryl ester (diamonds) and free cholesterol (square) levels in HL-1 cardiomyocytes. Results were expressed as microgram of cholesterol per milligram of protein and shown as the mean of three experiments performed in duplicate. Values significantly different from the level with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL are indicated with asterisks.

Figure 2. LDL reduces the intracellular Ca^{2+} - transient and SERCA2 expression. **A** Image of a representative field of cultured HL-1 cardiomyocytes used for calcium imaging. Individual myocytes with calcium transients are indicated in blue. Scale bar is 100 μm . **B** Global calcium transients elicited by field stimulation at 2s intervals in the absence of LDL (control) and the presence of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL. **C** Average baseline (left panel), peak (center panel) and amplitude (right panel) of the calcium transients recorded without (CON) and with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL. Values were recorded in three different fields from eight HL-1 preparations. Statistical differences between CON and LDL are indicated with an asterisk. **D** Real-time PCR analysis showing SERCA2 mRNA expression. Data were processed with a specially designed software programme based on Ct value of each sample and normalized to *ARBP* mRNA. **E** Representative western blot analysis showing SERCA2 bands and bar graphs showing SERCA2 band quantification. Unchanged levels of b-tubulin were shown as loading control.

Results are shown as mean±SEM of three independent experiments performed in duplicate.

*P<0.05 vs. cells incubated in absence of LDL

Figure 3. LDL promote non-uniform Ca²⁺ - transients at short stimulation intervals. A

Calcium transients recorded at stimulation intervals of 2.5, 2, 1.5, 1 and 0.75s (top to bottom) in the absence (CONTROL) or the presence of 500 µg/ml LDL (right panel). Each stimulation pulse is indicated with a dot above the traces. **B** Representative traces illustrating uniform, alternating and irregular response **C** Distribution of uniform (black bar), alternating (grey bar) or irregular (white bar) calcium transient amplitudes at decreasing stimulation intervals recorded in the absence (CONTROL) or the presence of 500 µg/ml LDL (right panel). Values were recorded in four different fields from each of five HL-1 preparations.

Figure 4. LDL prevents uniform propagation of the Ca²⁺ - transient. A

HL-1 image field with the activation time for individual myocytes shown in color code. Black and light grey rectangles at the bottom and the top of the images indicate regions used to measure calcium transients proximal and distal to the stimulation electrodes respectively. Image field is 1x1 mm. **B** Calcium transients recorded in the black and grey rectangles are shown in black and grey traces. Recordings were performed at stimulation intervals of 2.5, 2, 1.5, 1, and 0.75s (top to bottom) in the absence of LDL (CONTROL) or the presence of 500 µg/ml LDL (right panel). Notice that LDL disrupted a uniform propagation of the calcium transient from the dark to the light grey rectangle. **C** Rate dependent distribution of the propagation pattern recorded with 0 (CONTROL) and 500 µg/ml LDL (indicated above figures). The stimulation interval is given below each bar (in seconds) and the propagation patterns were

classified as uniform (black bars), alternating (grey bars) or irregular (white bars). See methods for details. Values were recorded in four different fields from each of five HL-1 preparations.

Figure 5. LDL slows the propagation velocity of the Ca^{2+} - transient. **A** HL-1 image field with the activation time for individual myocytes shown in color code. Green and pink rectangles at the bottom and the top of the images indicate regions used to measure calcium transients proximal and distal to the stimulation electrodes respectively. Image field is 1x1 mm. The middle panel shows global calcium transients and the lower panes shows local calcium transients recorded in green and pink rectangles. The propagation velocity (dx/dt) was calculated as distance between the two rectangles divided by the time elapsed between the green and pink calcium transients at their half maximum (dt , indicated below traces). **B** Effect of 0 (Control), 100, 250, and 500 $\mu\text{g/ml}$ LDL on the propagation velocity (dx/dt) recorded at stimulation intervals of 2.5, 2, and 1.5s. Values were recorded in four different fields from each of five HL-1 preparations. Values statistically different from the corresponding Control value are indicated with asterisks.

Figure 6. LDL reduces connexin-40 expression in HL-1 myocytes.

A Effect of the LDL concentration on connexin-40 (Cx40) and connexin-43 (Cx43) mRNA levels in HL-1 myocyte cultures. **B** Effect of the LDL concentration on Cx40 and Cx43 protein levels in the same HL-1 cultures shown in panel A. **C** Relationship between intracellular cholesteryl ester (CE) and Cx40 and Cx43 protein levels in HL-1 myocyte cultures.

Results are shown as mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate.

* $P < 0.05$ vs. cells incubated in absence of LDL.

Figure 1

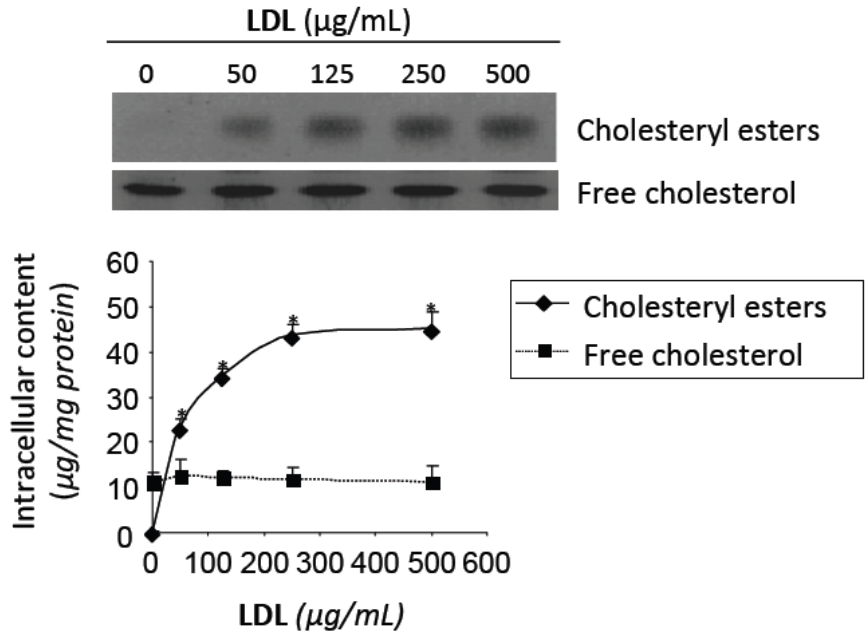


Figure 2

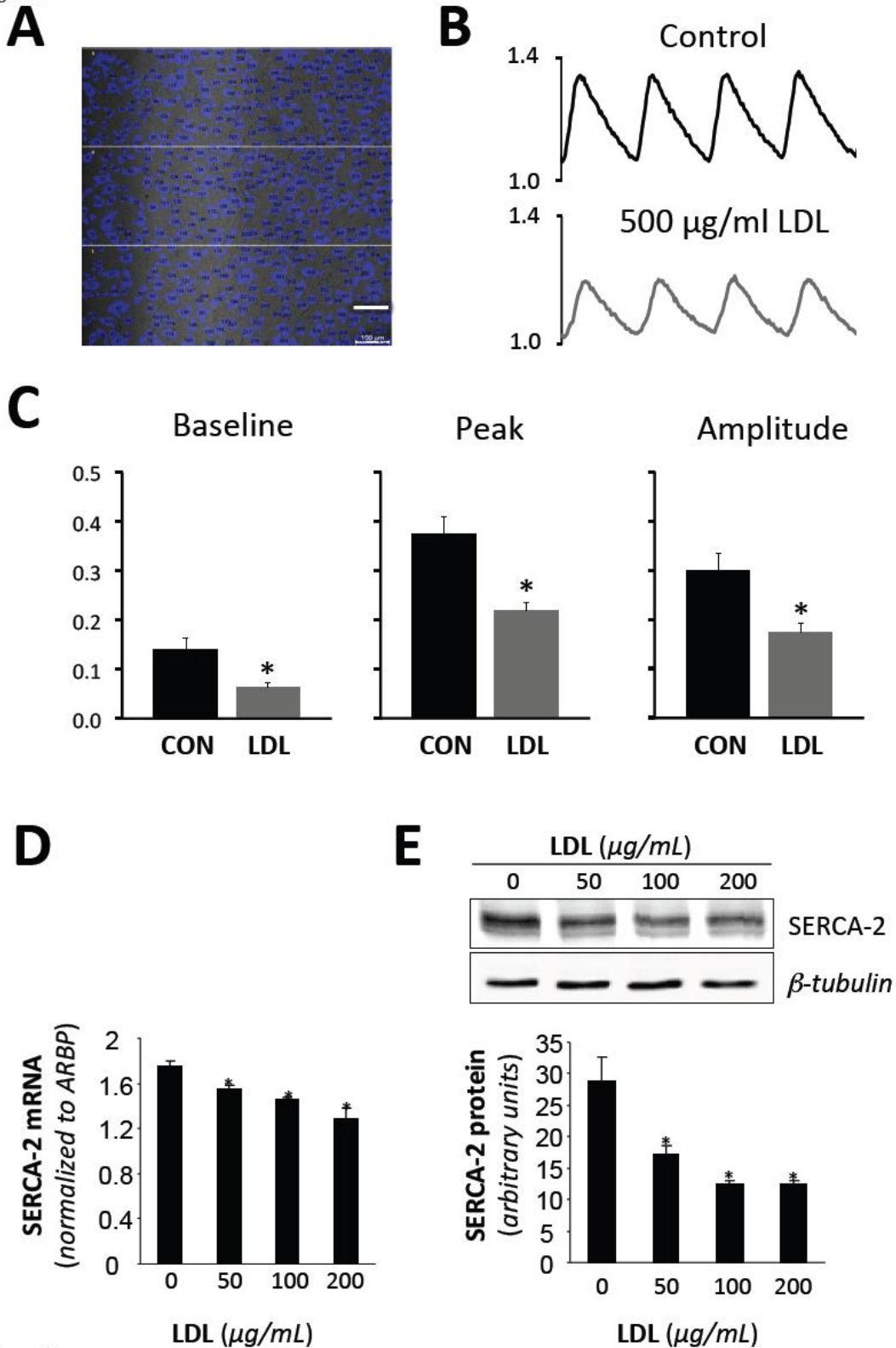


Figure 2

Figure 3

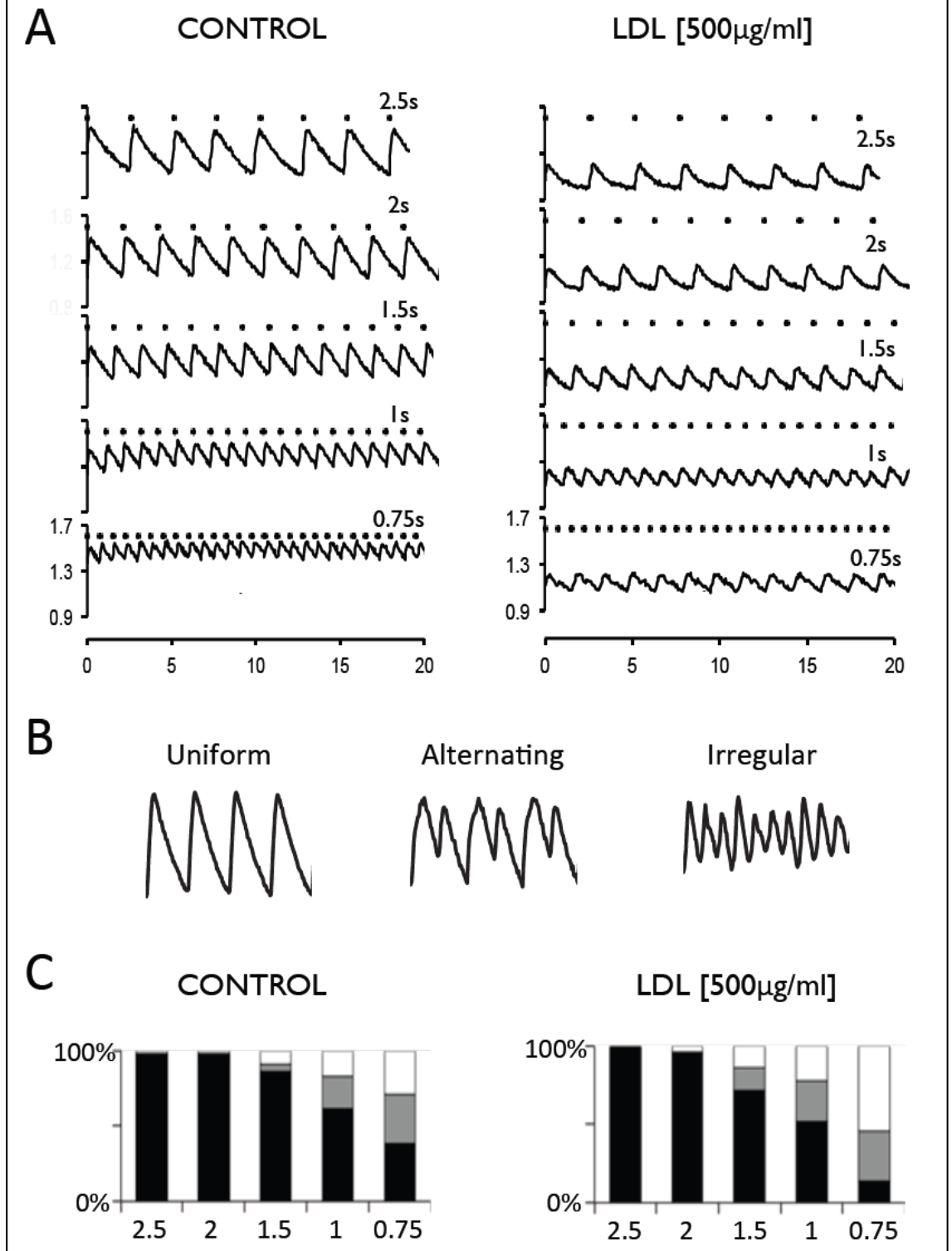
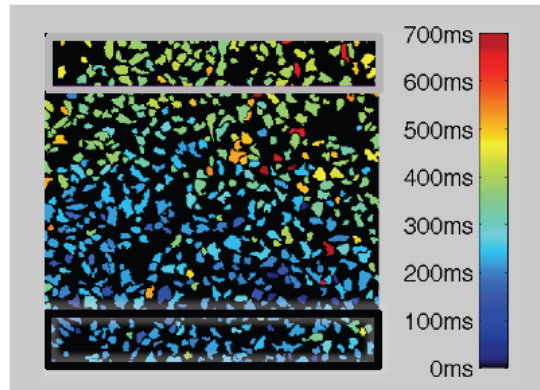
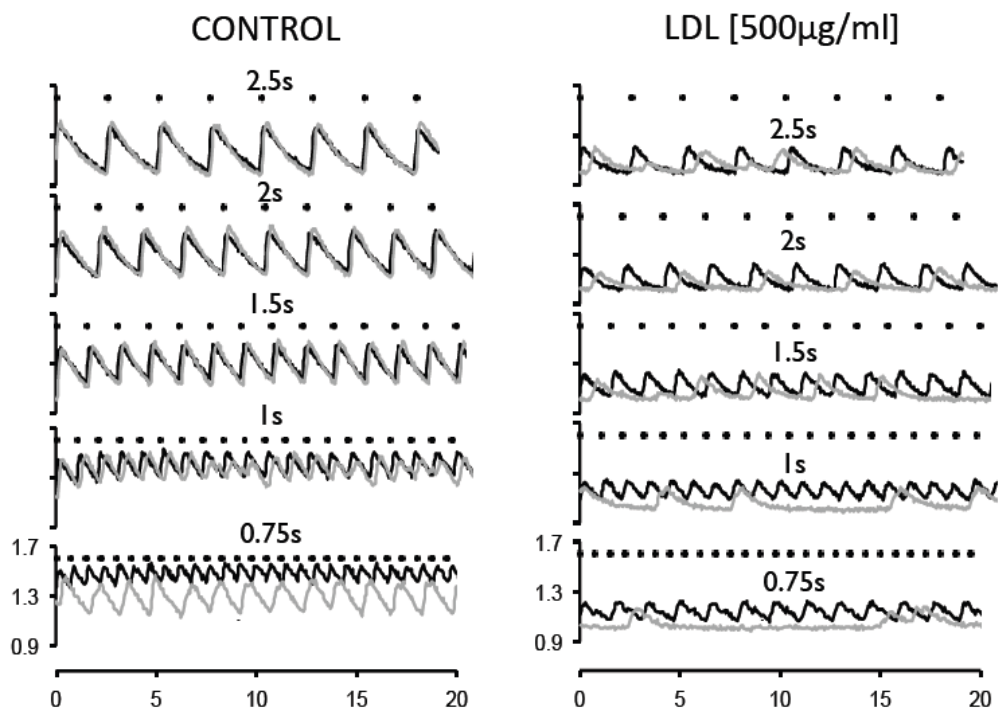


Figure 4

A



B



C

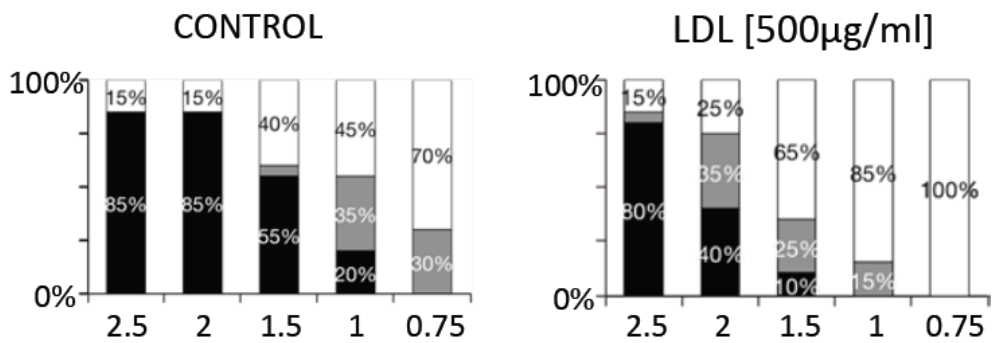
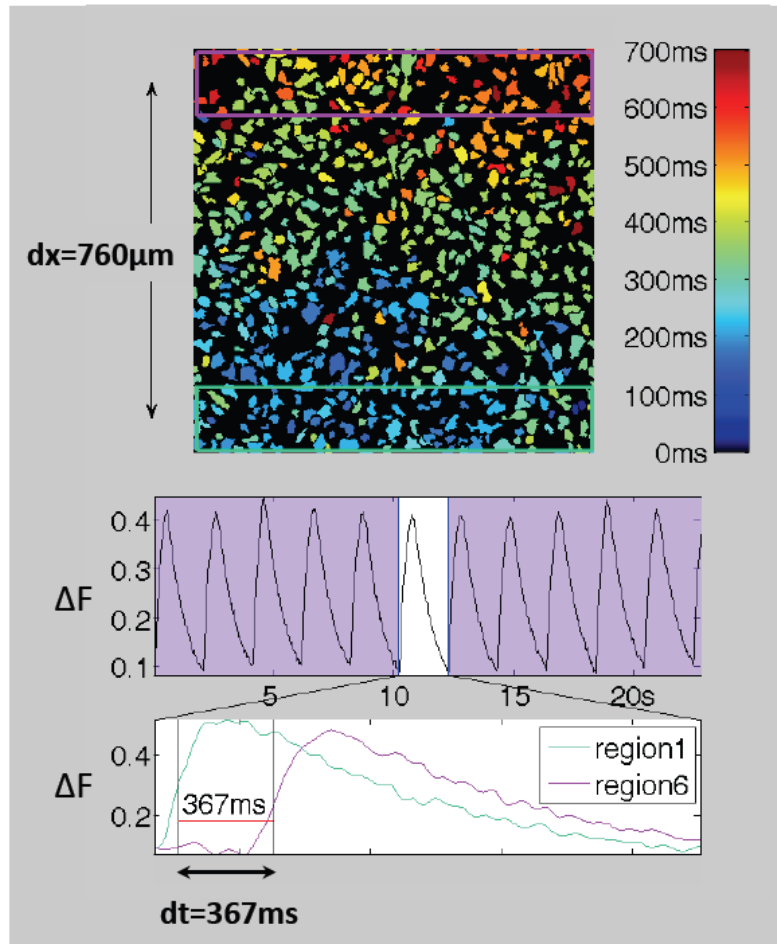


Figure 4

Figure 5

A



B

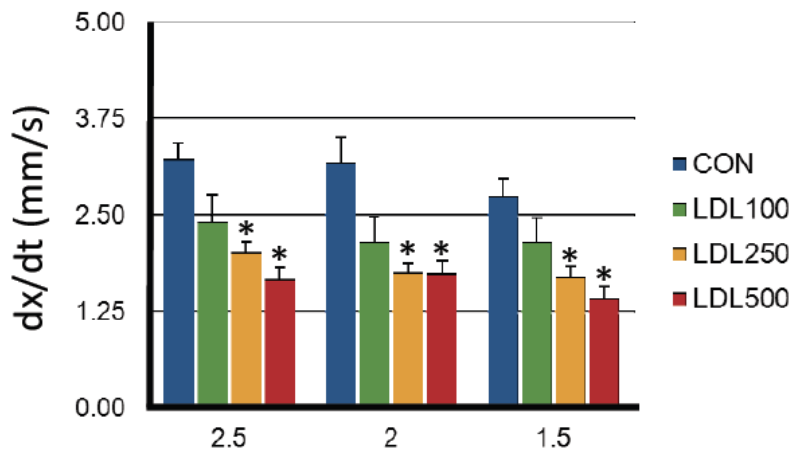
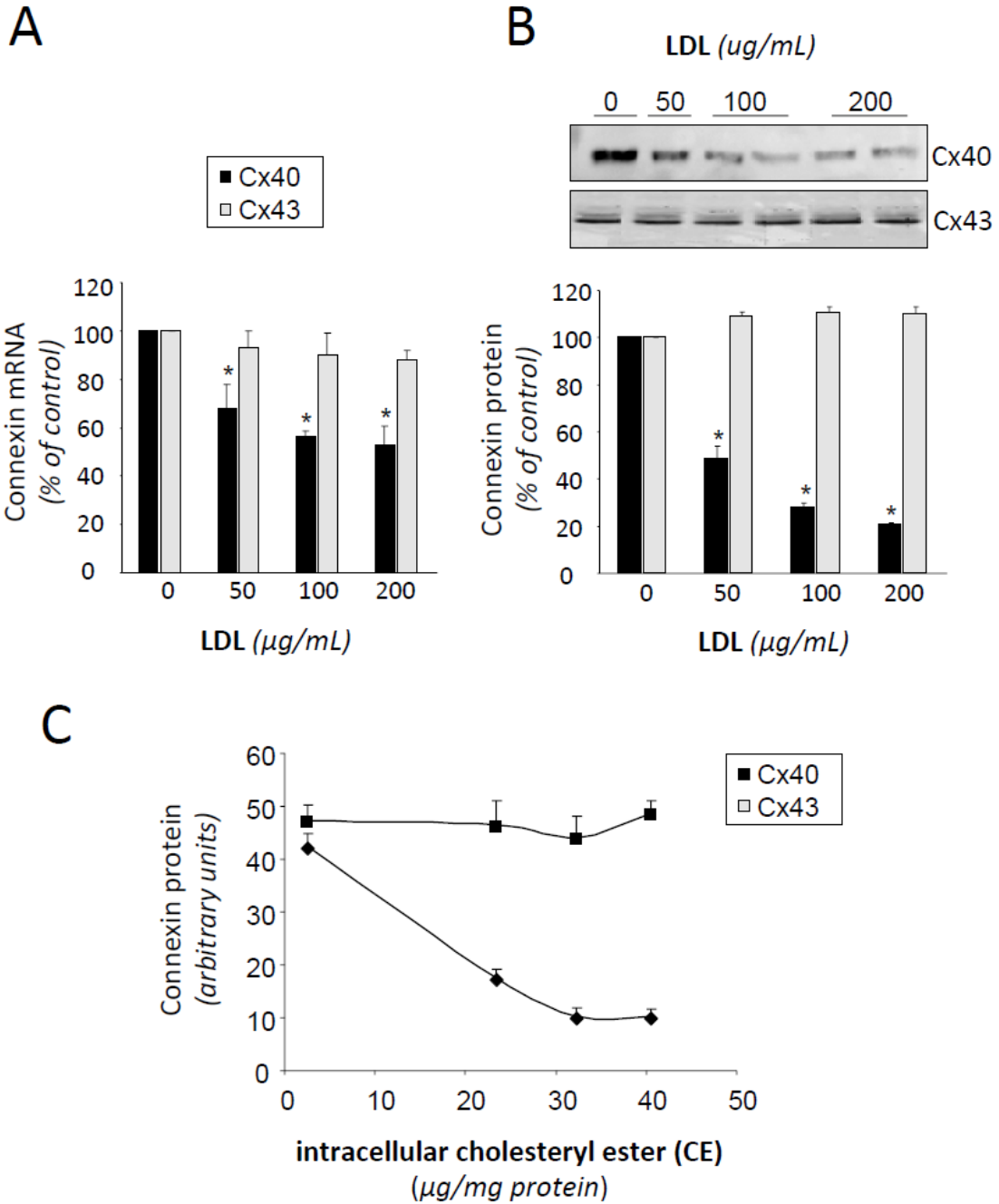


Figure 6



DISCUSIÓN GLOBAL

DISCUSIÓN GLOBAL

RELACIÓN DEL LRP1 CON LA ATEROSCLEROSIS E ISQUEMIA MIOCÁRDICA

En la aterosclerosis, durante el progreso de la lesión, las células vasculares como macrófagos y células musculares lisas vasculares (VSMC) [40, 229] captan lipoproteínas modificadas que contribuyen a la deposición lipídica en la capa íntima arterial que da origen al engrosamiento de la pared vascular. El estrechamiento de las arterias coronarias y la limitación de la llegada de oxígeno y nutrientes al miocardio durante el desarrollo y progresión de las lesiones ateroscleróticas es la principal causa que da origen a la cardiomiopatía isquémica, principal patología desencadenante de un fallo cardíaco. Este desequilibrio producido entre la demanda cardíaca y el suministro de oxígeno, al no llegar la sangre, genera la necrosis de los tejidos afectados, severas alteraciones metabólicas de las zonas periféricas y la disfunción general del corazón

Estudios previos de nuestro grupo demostraron la importancia del receptor LRP1 en la etiología de la aterosclerosis a nivel vascular cuando observaron que en las VSMC internaliza de forma selectiva el colesterol esterificado (CE) derivado de las LDL agregadas (LDLag) [40, 73, 80], una de las principales modificaciones de las lipoproteínas LDL presentes en la capa íntima arterial. El LRP1 no está regulado a la baja por los niveles intracelulares de colesterol ni a través de la disminución del factor SREBP-2, a diferencia del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLR), lo que hace que siga expresándose en situaciones de hipercolesterolemia y agravando aún más la acumulación lipídica y la progresión de la lesión aterosclerótica. También en trabajos recientes del grupo se comprobó la regulación al alza del LRP1 por la sobreexpresión del factor de transcripción HIF-1 α bajo condiciones de hipoxia en VSMC [228].

HIPOXIA EN CARDIOMIOCITOS Y MIOCARDIO

A nivel del corazón, se conoce que los cardiomiocitos acumulan lípidos intracelularmente bajo determinadas condiciones patológicas como son la diabetes [230], la obesidad [231] y la isquemia [232, 233]. Esta acumulación grasa, en un tejido no adiposo como es el corazón, se conoce como esteatosis y se asocia con procesos de lipotoxicidad, disfunciones y fallo cardiaco, tamaños de infarto más grande, y ha sido encontrada en áreas de infarto de miocardio crónico en humanos [207, 234]. En concordancia, en diferentes modelos animales se observó que la dislipemia incrementaba el daño en el miocardio isquémico [208].

Estudios recientes del grupo [235] demostraron que en cultivos celulares de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVM), el receptor de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR) está sobreexpresado en hipoxia, y cuando expones las células a VLDL en condiciones de hipoxia el incremento observado en la acumulación lipídica es aún mayor que el observado en normoxia.

A diferencia de en VSMC, poco se sabe acerca del perfil de expresión y consecuencias funcionales de los efectos de la isquemia en los receptores lipoproteicos en los cardiomiocitos. Por todo esto y con la base de los estudios previos del grupo sobre el LRP1 en VSMC y NRVM nos propusimos analizar el efecto de la hipoxia sobre la expresión del LRP1, VLDLR y LDLR.

Nuestros resultados demostraron que, en cardiomiocitos HL-1 y NRVM, la hipoxia incrementa la expresión génica y proteica de los receptores LRP1 y VLDLR a través del factor de transcripción HIF-1 α , en concordancia con los resultados previos de nuestro grupo en VSMC humanas, NRVM y resultados de Perman et al en HL-1 [88]. LRP1 y VLDLR mostraron ser regulados por la hipoxia a través de un mecanismo común de activación transcripcional que explica el gran incremento en la

expresión proteica de ambos receptores que observamos en el modelo porcino de infarto agudo de miocardio.

En las muestras de miocardio de pacientes con cardiomiopatía isquémica observamos también incrementada la expresión de los receptores LRP1 y VLDLR a nivel proteico, y la del LRP1 también a nivel génico. Aunque ya se ha observado la regulación al alza del VLDLR a nivel de mRNA en biopsias de miocardio de pacientes programados para cirugía de *by-pass* coronario [88], en nuestros resultados no observamos alteraciones a nivel génico en los corazones de los pacientes con cardiomiopatía isquémica respecto a los corazones controles. Esto probablemente es debido a la administración al paciente, previo al trasplante de corazón, del inmunosupresor ciclosporina que inhibe la expresión del mRNA del VLDLR en el miocardio de los pacientes con cardiomiopatía isquémica.

A diferencia del claro papel de HIF-1 α en la sobreexpresión del LRP1 y VLDLR, este factor de transcripción no parece tener ningún papel en la regulación a la baja del LDLR en los cardiomiocitos HL-1 bajo condiciones de hipoxia. De hecho, este efecto sobre el LDLR puede ser explicado por la caída en la expresión de SREBP-1 y SREBP-2 en condiciones de hipoxia, como previamente se vió en VSMC humanas [228]. Además ésta disminución de los SREBP por la hipoxia probablemente contribuyó, junto con la sobreexpresión de HIF-1 α , al incremento de expresión del LRP1 en cardiomiocitos, de acuerdo a resultados previos de nuestro grupo que demostraron que el LRP1 está regulado negativamente por los SREBP [81, 116].

En las muestras de miocardio de pacientes con cardiomiopatía isquémica la expresión del mRNA del LDLR fue más baja en comparación a los corazones controles en concordancia con los resultados obtenidos en cardiomiocitos hipóxicos.

ACUMULACIÓN LIPÍDICA INTRACELULAR EN CARDIOMIOCITOS Y MIOCARDIO

La acumulación intracelular de lípidos es una alteración común descrita en los eventos isquémicos [167, 168] que puede llegar a producir lipotoxicidad.

Los ácidos grasos (AG), procedentes de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se oxidan con la β -oxidación para abastecer de energía al corazón en condiciones de funcionamiento normales. Pero en condiciones de isquemia, para optimizar la producción de energía, los cardiomiocitos usan carbohidratos, por lo que los AG procedentes de lipoproteínas se esterifican y acumulan intracelularmente transformados en triglicéridos (TG) dentro de vacuolas lipídicas en las regiones periinfárticas con daño reversible del miocardio [206, 233, 236, 237]. Pero además de TG, las VLDL también han sido descritas como fuente de colesterol en el miocardio [86, 159, 238], que en situaciones de isquemia también se puede acumular intracelularmente generando lipotoxicidad y alteraciones fisiológicas [155, 177].

Niu et al [159] demostraron en un modelo de corazones perfundidos que la captación de colesterol, pero no de TG, procedente de las VLDL estaba muy reducida por la suramina, un inhibidor inespecífico de la familia del LDLR, y por lo tanto la entrada de colesterol dependía de la familia de estos receptores lipoproteicos. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos del grupo donde se observó el papel del LRP1 como mediador de la captación selectiva de CE procedente de lipoproteínas en VSMC [73, 239]. Esta captación está favorecida también por la capacidad de desplazamiento del receptor hacia las caveolas en las balsas lipídicas de membrana que actúan como receptoras de CE [240]. Además la expresión de LRP1 y proteoglicanos está incrementada en hipoxia y ambos cooperan en la captación de ligandos en las membranas [214, 241].

Mediante cromatografías en capa fina (CCF) revelamos el papel crucial del LRP1 en la captación selectiva y acumulación de CE procedente de lipoproteínas en los cardiomiocitos hipóxicos. En contraposición al fuerte impacto de la inhibición del LRP1 en la captación de CE procedente de VLDL, el silenciamiento génico del LRP1 en cardiomiocitos HL-1 no ejerció ningún efecto significativo ni en la captación ni en la acumulación de TG. Esto evidencia que la captación de colesterol procedente de VLDL en el corazón ocurre a través de un mecanismo diferente al de los TG.

Estudios llevados a cabo por Bharadwaj et al mostraron la participación de CD36 en la captación de TG y de LpL en la captación de CE procedentes de VLDL en el miocardio [86]. CD36 también se sobreexpresa en hipoxia [87] y contribuye a la captación de ácidos grasos (AG) y acumulación de TG en situaciones de isquemia. Sin embargo Perman et al [88] afirmaron que CD36 no juega ningún papel en la captación incrementada de TG en condiciones de hipoxia y señalaron al VLDLR como el receptor esencial para la acumulación de TG en cardiomiocitos HL-1 hipóxicos y en el miocardio isquémico de ratones. Además el VLDLR y la lipoproteína lipasa (LpL) interactúan para la captación de VLDL por el corazón., presentan la misma distribución en tejidos y su expresión está incrementada en cardiomiocitos hipóxicos. Todo esto sugiere que posiblemente VLDLR y LpL colaboran también en la captación incrementada por hipoxia de CE procedente de VLDL, por lo que serían necesarios más estudios para discernir la contribución precisa de LpL, VLDLR y LRP1 en la acumulación miocárdica de colesterol con el fin de prevenir los efectos deletéreos de la acumulación lipídica en el corazón.

En nuestros resultados con muestras de corazones de pacientes con cardiomiopatía isquémica observamos la sobreexpresión génica y proteica del LRP1 en comparación con muestras de corazones controles. Además en células HL-1 in vitro comprobamos también el incremento de la expresión proteica del LRP1 no sólo por la hipoxia sino también por dosis hipertriglicéridémicas e hipercolesterolémicas

de VLDL y LDL respectivamente. La acción conjunta de hipoxia y lipoproteínas obtuvo un efecto sinérgico alcanzando la máxima sobreexpresión proteica del LRP1.

En resultados de CCF de las muestras de corazón de pacientes con cardiomiopatía isquémica pudimos comprobar la acumulación incrementada de CE y TG. Analizando los datos de expresión y acumulación obtenidos de los pacientes en conjunto, encontramos una estrecha asociación-correlación significativa entre la expresión génica y proteica del receptor LRP1 y la acumulación de CE en corazones humanos isquémicos.

Aunque nuestros estudios en miocardio isquémico humano no proveen información específica sobre los mecanismos involucrados en la asociación existente entre la expresión del LRP1 y la acumulación lipídica de CE, los resultados en cardiomiocitos hipóxicos (HL-1 y NRVM) sí que muestran el papel esencial del LRP1 en la captación y acumulación de CE procedente de VLDL. Además estudiamos como el LRP1 de cardiomiocitos, al igual que el de VSMC [41, 73, 80], es capaz de internalizar CE de lipoproteínas modificadas por agregación. Todo esto sugiere que la sobreacumulación de CE que se observa en corazones humanos isquémicos puede ser causada por la capacidad del LRP1, sobreexpresado en hipoxia, de captar el CE procedente de lipoproteínas.

Encontramos también una ligera correlación en las muestras de miocardio isquémico humano entre la expresión del VLDLR y la acumulación de CE aunque de menor alcance que la del LRP1. Sin embargo no se encontró relación alguna entre cualquiera de los dos receptores con la acumulación de TG en el miocardio pese a los resultados ya comentados de Perman et al [88] donde sí observaron en biopsias de miocardio isquémico humano, una débil relación entre la expresión génica del VLDLR y la acumulación de gotas lipídicas. Esto puede ser debido a las diferentes vías que comentamos de entrada de TG al miocardio que van desde la síntesis

endógena [231, 242], la difusión asociada a albúmina [243] o la hidrólisis por LpL [244, 245].

Nuestros datos mostraron que el aumento de la acumulación intracelular de lípidos neutros no induce la apoptosis de los cardiomiocitos en cultivo a tiempos de incubación cortos. Sin embargo la hipoxia y los lípidos probablemente inducen la muerte de las células a tiempos de exposición largos. Resultados similares ya fueron señalados en HL-1 [88], VSMC humanas [81] y macrófagos [246]. De hecho en el contexto de diabetes/obesidad, una importante acumulación de TG se ha asociado con muerte celular y disfunción diastólica en modelos animales [162, 247] y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [248]. Perman et al afirmaron que la acumulación de TG en el ratón isquémico empeora la supervivencia al aumentar el estrés en el retículo sarcoplásmico.

Aunque los efectos deletéreos de la carga lipídica en el miocardio que ocurren en situaciones de isquemia, diabetes u obesidad han sido históricamente adscritos a TG, asumiendo que eran los únicos lípidos neutros acumulados en cardiomiocitos, se ha demostrado que lipoproteínas ricas en triglicéridos, como las VLDL, liberan TG y también CE a los cardiomiocitos [86, 88], y que la hipoxia incrementa esta captación en cardiomiocitos NRVM [235]. De hecho, nuestros resultados in vivo muestran claramente que los lípidos neutros que se acumulan en el modelo porcino de miocardio isquémico incluyen tanto TG como CE. Por tanto, cabría considerar que los efectos deletéreos de la lipotoxicidad no sólo son causados por TG sino también por la acumulación de CE. Relevantes estudios mostraron ya que el colesterol en el miocardio contribuye a la cardiomiopatía lipotóxica [155, 177] causante de disfunción sistólica y diastólica [178]. Además se encontró una correlación inversa entre los niveles de colesterol en el miocardio y los niveles de expresión de SERCA2 [178]. Trabajos en nuestro grupo demostraron el papel que juega la reducción de la expresión de SERCA2 en las alteraciones en el manejo del calcio inducidas por la hipoxia y las VLDL [235].

Todos estos resultados *in vitro*, *in vivo* y en miocardio de pacientes con cardiomiopatía isquémica evidenciaron que la acumulación de lípidos neutros en el miocardio no consta sólo de TG como sugieren la mayoría de estudios previos [88, 234, 249, 250], sino también de CE. Además demostraron la fuerte presencia del receptor LRP1 en situaciones de isquemia e hipercolesterolemia que modulan su expresión al alza en el miocardio, tal y como vió nuestro grupo que ocurría en pared vascular [81, 228].

CONSECUENCIAS FUNCIONALES EN EL MANEJO DEL CALCIO DERIVADAS DE LA HIPOXIA MIOCÁRDICA Y LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA

Los efectos dañinos en el sistema cardiovascular de tener altos niveles de colesterol en plasma y su impacto en la arteriosclerosis coronaria son ampliamente conocidos, pero poco se sabe acerca de su repercusión sobre el miocardio y la funcionalidad del cardiomiocito. Puesto que la mayoría de pacientes que sufren dislipidemias están en riesgo de padecer muerte súbita a causa de arritmias [251] y la medicación destinada a reducir el colesterol presenta un potencial efecto antiarrítmico, se deduce el aparente efecto pro-arrítmico del colesterol. En el corazón isquémico se han encontrado vacuolas lipídicas en la periferia de las zonas infartadas [168, 233] y han sido ampliamente documentados los fenómenos asociados de disfunción cardíaca [252] y arritmias [253] producidos por la carga lipídica intramiocárdica. Además, las arritmias cardíacas han sido ligadas a cambios en la actividad de los canales iónicos [254-256], alteraciones en el manejo del calcio intracelular [254, 257-260], y cambios en la conducción de las señales eléctricas a través de las uniones gap [261], por lo que los efectos de los medicamentos que reducen el colesterol podrían ser en uno o más de estos mecanismos.

La hipercolesterolemia ha sido asociada con el remodelado eléctrico, potenciales de acción de duración prolongada e incrementada vulnerabilidad a la

fibrilación ventricular en modelos in vivo de conejo hipercolesterolémico [262]. El aumento de la susceptibilidad a las arritmias ventriculares, inducidas por los niveles de colesterol en sangre, también se ha observado en ratones con la expresión alterada de las uniones gap cardiacas, que mantienen el acoplamiento eléctrico para asegurar propagaciones organizadas del potencial de acción que rigen la contracción ordenada del corazón. Asociados a las alteraciones atriales y ventriculares en el miocardio se encuentran los reducidos niveles de los principales componentes de las uniones gap cardiacas, las conexinas 40 y 43 (Cx40 y Cx43) [263, 264]. Trabajos recientes del grupo demostraron que la acumulación lipídica en cardiomiocitos expuestos a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) conlleva serias alteraciones en el manejo del calcio intracelular (reducción de la expresión de SERCA2, reducción de la amplitud de las curvas de movilización del calcio y de la carga de calcio del retículo sarcoplasmático (SR)). Además, estos efectos observados se incrementaban en condiciones de hipoxia, debido a la sobreacumulación de CE y TG en estas condiciones [235].

Todo esto sugiere que la captación de lipoproteínas LDL ricas en colesterol, y la consecuente acumulación lipídica intracelular, modulan el manejo del calcio y la propagación de señales en los cardiomiocitos. La exposición a dosis patológicas de LDL promovió la acumulación de CE, la reducción de la expresión de SERCA2 y la disminución de las curvas de movilización de calcio, apoyando la noción de que la acumulación de CE intracelular perjudica el manejo de calcio en el retículo sarcoplásmico. De acuerdo con esto, Huang et al demostraron en un modelo de conejo con dieta hipercolesterolémica que los niveles de expresión de SERCA2 estaban inversamente correlacionados con la carga lipídica de CE [178].

En nuestros resultados los altos niveles de LDL también desestabilizaron el patrón de respuesta beat-to-beat de las curvas de movilización del calcio cuando los cardiomiocitos fueron sujetos a frecuencias de estimulación crecientes. La reducida expresión de SERCA2 en presencia de las LDL podría llevar a una insuficiente

recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico a intervalos cortos de estimulación, lo que afectaría al patrón beat-to-beat de las curvas de movilización del calcio [258]. Aunque la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico en cardiomiocitos HL-1 controles es dependiente de la concentración citosólica de calcio, en presencia de LDL no ocurre así. De hecho, la deteriorada propagación de las curvas de movilización de calcio a través del cultivo de cardiomiocitos a intervalos de estimulación cortos, afectadas de forma dosis dependiente por LDL, sugiere una reducción en la excitabilidad [265] y comunicación entre los cardiomiocitos en cultivo [253, 266-268].

La reducida expresión proteica de la conexina-40 (Cx40) observada, de forma dosis dependiente por la acumulación de CE procedente de LDL, podría suponer la causa de la observada reducción de la velocidad de propagación de la señal de calcio en presencia de las LDL [266]. El papel que juega además el CE intracelular procedente de LDL en la reducción de Cx40 está en concordancia con resultados previos en endotelio aórtico, donde los niveles de expresión de la Cx40 fueron muy reducidos en ratones apoE *knockout* hiperlipidémicos [269].

A diferencia del efecto de las LDL en la reducción de la expresión de la Cx40, en la Cx43 no apreciamos cambios significativos en los cardiomiocitos HL-1, sugiriendo que ambas conexinas son reguladas de forma diferencial por las LDL en cardiomiocitos atriales. De hecho, en diferentes estudios en modelos de ratón *knockout* para la Cx40 ya se había apreciado una bajada en la velocidad de conducción atrial [270, 271] mientras que en modelos de ratón *knockout* para la Cx43 la bajada en la velocidad de conducción era ventricular [272, 273], mostrando así el papel diferencial de ambas conexinas en los cardiomiocitos.

Estudios en modelos de ratón y cabra mostraron que la carencia de la Cx40 incrementa la vulnerabilidad atrial a las arritmias [152, 153], pudiendo extrapolar que las LDL, que nosotros observamos que reducen la Cx40, incrementan la

vulnerabilidad a las arritmias atriales. En concordancia con esto, un incremento de las gotas lipídicas intracelulares ha sido asociado con la alteración de las uniones intercelulares en biopsias de miocardio de pacientes con cardiomiopatía arritmogénica de ventrículo derecho [253].

CONSIDERACIONES DE LOS MODELOS

Debido a la complejidad de la cardiomiopatía y el fallo cardiaco originados por infarto de miocardio, los efectos de la isquemia en la funcionalidad del cardiomiocito no pueden ser evaluados únicamente testando *in vitro* el efecto de la hipoxia en cultivo celular o *in vivo* el efecto en el miocardio porcino de una oclusión coronaria. Sin embargo, la utilización de estos modelos es útil para identificar nuevos genes involucrados en los mecanismos fisiopatológicos asociados a los efectos deletéreos de la hipoxia, como la exposición a altas concentraciones de VLDL y LDL en la acumulación de lípidos intracelularmente o las alteraciones en la expresión de proteínas involucradas en el manejo del calcio, en las ondas de movilización del calcio y en su propagación por el cultivo celular.

Aunque los resultados obtenidos no pueden ser directamente extrapolados a condiciones clínicas, los cultivos atriales de cardiomiocitos HL-1 mantienen las características fundamentales de los cardiomiocitos nativos como las ondas de movilización de calcio intracelular y las contracciones en respuesta a estimulación eléctrica, así como la propagación de la señal de calcio a través del cultivo de cardiomiocitos [217, 218].

Los resultados obtenidos en cardiomiocitos neonatales de rata podrían no ser aplicables de forma general ya que no están totalmente diferenciados. Las células NRVM se diferencian de los cardiomiocitos adultos en temas morfológicos, bioquímicos o de metabolismo energético, por lo que podrían responder a la isquemia de forma diferente. Se emplearon como cultivo primario para la realización

en paralelo de varios experimentos con la línea celular de cardiomiocitos HL-1, y su elección se basó en la previa experiencia del grupo ya que en comparación con los cardiomiocitos adultos tienen una supervivencia mayor *in vitro* y requieren un mantenimiento más sencillo.

IMPLICACIONES CLÍNICAS

Tomados en conjunto, los resultados de la tesis sugieren que LRP1 podría ser una diana con el fin de prevenir las alteraciones isquémicas miocárdicas funcionales asociados con la acumulación de colesterol intracelular en los cardiomiocitos. Los resultados del presente estudio muestran que aunque la inhibición del LRP1 reduce ondas y respuestas irregulares inducidas por las VLDL, la deficiencia del LRP1 aumenta también el porcentaje de células inactivas y empeora la resistencia a la sobrecarga de calcio. Estos resultados están de acuerdo con la función central de LRP1 como un receptor de transducción de señales que moviliza el calcio intracelular [274]. De hecho, el deterioro de la función selectiva del LRP1 como portador de colesterol sin llegar a alterar la transducción de señales es la mejor estrategia para prevenir la acumulación de CE inducida por la hipoxia. Cardiomiocitos en zonas periinfárticas se sobrecargan notablemente con lípidos [206] neutros que son determinantes para la transición de la lesión miocárdica aguda de reversible a irreversible y para las arritmias [275]. Por lo tanto, nuestros resultados deberían ser considerados para el diseño de estrategias eficientes con el fin de prevenir las alteraciones cardíacas derivadas de la sobreacumulación de colesterol en el miocardio.

CONCLUSIONES

1. El receptor LRP1 media la captación selectiva y acumulación de colesterol esterificado procedente de las lipoproteínas VLDL en cardiomiocitos hipóxicos.

1.1 La expresión génica y proteica de los receptores LRP1 y VLDLR está incrementada in vitro en cardiomiocitos hipóxicos e in vivo en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio. En el caso del LRP1 en cardiomiocitos es a través del factor de transcripción inducible por la hipoxia HIF-1 α .

1.2 La hipoxia induce la sobreacumulación lipídica de colesterol esterificado y triglicéridos procedentes de VLDL en cardiomiocitos.

2. Los niveles de expresión del receptor LRP1 presentan una fuerte correlación con la acumulación de colesterol esterificado en el miocardio de corazones isquémicos humanos.

2.1 La expresión de los receptores LRP1 y VLDLR, así como del factor de transcripción HIF-1 α , está incrementada en el miocardio isquémico humano.

3. Las lipoproteínas LDL potencian las alteraciones en el manejo del calcio intracelular en cardiomiocitos HL-1 inducidas por la acumulación de colesterol esterificado.

3.1 Las LDL reducen la amplitud de las curvas de movilización de calcio a través de cultivos de cardiomiocitos HL-1.

3.2 Las LDL reducen la expresión de SERCA2 en cardiomiocitos HL-1 e incrementan la fracción de respuestas beat-yo-beat irregulares y alternantes a intervalos de estimulación cortos.

3.3 Las LDL reducen la velocidad de conducción de las señales de calcio coincidiendo con la reducción de la expresión de la conexina-40.

APÉNDICE

APÉNDICE

A continuación se citan otras publicaciones en las que el doctorando Roi Cal Pérez-Quevedo ha participado a lo largo del periodo de su tesis doctoral. La participación en estos trabajos ha permitido una mejor formación investigadora para el doctorando.

1. Llorente-Cortes V, Casani L, Cal R, Llenas A, Juan-Babot O, Camino-López S, Sendra J and Badimon L. *Cholesterol-lowering strategies reduce vascular LRP1 overexpression induced by hypercholesterolaemia*. Eur J Clin Invest 2011, 41(10):1087-97.

Factor de impacto: 3.018

2. Cal R, García-Arguinzonis M, Revuelta-López E, Castellano J, Padró T, Badimon L, Llorente-Cortes V. *Aggregated LDL induces LRP1 protein stabilization through E3 ubiquitin-ligase CHFR downregulation in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012, 33(2):369-77.

Factor de impacto: 6.368

3. Costales P, Castellano J, Revuelta-López E, Cal R, Aledo R, Llampayas O, Nasarre L, Juarez C, Badimon L, Llorente-Cortés V. *Lipopolysaccharide downregulates CD91/low-density lipoprotein receptor-related protein 1 expression through SREBP-1 overexpression in human macrophages*. Atherosclerosis 2012.

Factor de impacto: 3.794

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. Circulation. **125**(1): p. e2-e220.
2. Fruchart, J.C., et al., *New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III15-9.
3. Ross, R. and L. Harker, *Hyperlipidemia and atherosclerosis*. Science, 1976. **193**(4258): p. 1094-100.
4. Steinberg, D., *Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy*. J Lipid Res, 2006. **47**(7): p. 1339-51.
5. Steinberg, D., *The pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part IV: the 1984 coronary primary prevention trial ends it--almost*. J Lipid Res, 2006. **47**(1): p. 1-14.
6. Grundy, S.M., *Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 1998. **81**(4A): p. 18B-25B.
7. Nordestgaard, B.G., et al., *Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women*. JAMA, 2007. **298**(3): p. 299-308.
8. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N Engl J Med, 1992. **326**(4): p. 242-50.
9. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 310-8.
10. Badimon, L. and J. Martinez-Gonzalez, *[Endothelium and vascular protection: an update]*. Rev Esp Cardiol, 2002. **55 Suppl 1**: p. 17-26.
11. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.
12. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
13. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
14. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
15. Fuster, V., et al., *27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 1. Pathogenesis of coronary disease: the biologic role of risk factors*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 964-76.
16. Flammer, A.J., et al., *The assessment of endothelial function: from research into clinical practice*. Circulation. **126**(6): p. 753-67.
17. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 168-75.
18. Grover-Paez, F. and A.B. Zavalza-Gomez, *Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors*. Diabetes Res Clin Pract, 2009. **84**(1): p. 1-10.
19. Fuster, V., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 2126-46.

BIBLIOGRAFÍA

20. Davies, P.F., *Endothelial mechanisms of flow-mediated athero-protection and susceptibility*. *Circ Res*, 2007. **101**(1): p. 10-2.
21. Camejo, G., et al., *Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(19): p. 14131-7.
22. Boisvert, W.A., et al., *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(2): p. 353-63.
23. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Mol Cell*, 1998. **2**(2): p. 275-81.
24. Collins, R.G., et al., *P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *J Exp Med*, 2000. **191**(1): p. 189-94.
25. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(7): p. 508-19.
26. Li, H., et al., *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium*. *Arterioscler Thromb*, 1993. **13**(2): p. 197-204.
27. Rosenfeld, M.E., et al., *Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(2): p. 291-300.
28. Clinton, S.K., et al., *Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(2): p. 301-16.
29. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
30. Michelsen, K.S. and M. Arditì, *Toll-like receptor signaling and atherosclerosis*. *Curr Opin Hematol*, 2006. **13**(3): p. 163-8.
31. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 677-86.
32. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. *Atherosclerosis*, 1999. **145**(1): p. 33-43.
33. Caligiuri, G., et al., *Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice*. *Mol Med*, 2003. **9**(1-2): p. 10-7.
34. Mallat, Z., et al., *Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice*. *Circ Res*, 2001. **89**(10): p. 930-4.
35. Caligiuri, G., et al., *Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(6): p. 745-53.
36. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
37. Katsuda, S. and T. Kaji, *Atherosclerosis and extracellular matrix*. *J Atheroscler Thromb*, 2003. **10**(5): p. 267-74.
38. Betsholtz, C., et al., *Role of platelet-derived growth factor in mesangium development and vasculopathies: lessons from platelet-derived growth factor and*

- platelet-derived growth factor receptor mutations in mice*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004. **13**(1): p. 45-52.
39. Newby, A.C., *Molecular and cell biology of native coronary and vein-graft atherosclerosis: regulation of plaque stability and vessel-wall remodelling by growth factors and cell-extracellular matrix interactions*. *Coron Artery Dis*, 1997. **8**(3-4): p. 213-24.
40. Llorente-Cortes, V. and L. Badimon, *LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(3): p. 497-504.
41. Llorente-Cortes, V., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon, *LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(6): p. 1572-9.
42. Aoyama, T., et al., *LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells*. *FEBS Lett*, 2000. **467**(2-3): p. 217-20.
43. Schwartz, S.M., R. Virmani, and M.E. Rosenfeld, *The good smooth muscle cells in atherosclerosis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2000. **2**(5): p. 422-9.
44. Dickson, B.C. and A.I. Gotlieb, *Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques*. *Cardiovasc Pathol*, 2003. **12**(5): p. 237-48.
45. Iqbal, J. and M.M. Hussain, *Intestinal lipid absorption*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **296**(6): p. E1183-94.
46. Dallinga-Thie, G.M., et al., *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*. *Atherosclerosis*. **211**(1): p. 1-8.
47. Stein, Y. and O. Stein, *Lipoprotein lipase and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2003. **170**(1): p. 1-9.
48. Su, X. and N.A. Abumrad, *Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction*. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. **20**(2): p. 72-7.
49. Schaffer, J.E., *Fatty acid transport: the roads taken*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **282**(2): p. E239-46.
50. Berk, P.D. and D.D. Stump, *Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids*. *Mol Cell Biochem*, 1999. **192**(1-2): p. 17-31.
51. Havel, R.J. and R.L. Hamilton, *Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(2): p. 213-5.
52. Willnow, T.E., *Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance*. *Diabet Med*, 1997. **14 Suppl 3**: p. S75-80.
53. Williams, K.J. and K. Chen, *Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake*. *Curr Opin Lipidol*. **21**(3): p. 218-28.
54. Santamarina-Fojo, S., et al., *Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(10): p. 1750-4.
55. Mahley, R.W. and Z.S. Ji, *Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E*. *J Lipid Res*, 1999. **40**(1): p. 1-16.
56. Williams, K.J., *Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(10): p. 3247-59.
57. Out, R., et al., *Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 18401-6.
58. Bassendine, M.F., et al., *HCV and the hepatic lipid pathway as a potential treatment target*. *J Hepatol*. **55**(6): p. 1428-40.
59. Gibbons, G.F., et al., *Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 1): p. 59-64.

BIBLIOGRAFÍA

60. Rader, D.J. and A. Daugherty, *Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 904-13.
61. Chappell, D.A. and J.D. Medh, *Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant catabolism*. Prog Lipid Res, 1998. **37**(6): p. 393-422.
62. Slater, H.R., et al., *Contribution of the receptor pathway to low density lipoprotein catabolism in humans. New methods for quantitation*. Arteriosclerosis, 1984. **4**(6): p. 604-13.
63. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(4): p. 431-8.
64. Alwaili, K., et al., *High-density lipoproteins and cardiovascular disease: 2010 update*. Expert Rev Cardiovasc Ther. **8**(3): p. 413-23.
65. Trigatti, B.L., *Hepatic high-density lipoprotein receptors: roles in lipoprotein metabolism and potential for therapeutic modulation*. Curr Atheroscler Rep, 2005. **7**(5): p. 344-50.
66. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
67. Kita, T., et al., *Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2268-72.
68. Amemiya-Kudo, M., et al., *Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes*. J Lipid Res, 2002. **43**(8): p. 1220-35.
69. Vernia, S., et al., *A rare missense mutation in a type 2 diabetes patient decreases the transcriptional activity of human sterol regulatory element binding protein-1*. Hum Mutat, 2006. **27**(2): p. 212.
70. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
71. Repa, J.J., et al., *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta*. Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2819-30.
72. Llorente-Cortes, V., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription*. J Mol Biol, 2006. **359**(4): p. 950-60.
73. Llorente-Cortes, V., et al., *Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(1): p. 117-23.
74. Chait, A. and T.N. Wight, *Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix*. Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(5): p. 457-63.
75. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
76. Camejo, G., et al., *Modifications of low-density lipoprotein induced by arterial proteoglycans and chondroitin-6-sulfate*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1096**(3): p. 253-61.
77. Hurt-Camejo, E., et al., *Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(6): p. 1011-7.
78. Itabe, H., *Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2009. **37**(1): p. 4-11.

79. Tirziu, D., et al., *The effects of low density lipoproteins modified by incubation with chondroitin 6-sulfate on human aortic smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 1999. **147**(1): p. 155-66.
80. Llorente-Cortes, V., et al., *Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(3): p. 387-93.
81. Llorente-Cortes, V., et al., *Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism*. *Circulation*, 2002. **106**(24): p. 3104-10.
82. Hurt-Camejo, E., et al., *Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(5): p. 569-83.
83. Llorente-Cortes, V., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon, *Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(5): p. 738-46.
84. Silverstein, R.L., et al., *Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis*. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. **121**: p. 206-20.
85. Abumrad, N.A., et al., *Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(24): p. 17665-8.
86. Bharadwaj, K.G., et al., *Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake*. *J Biol Chem*. **285**(49): p. 37976-86.
87. Mwaikambo, B.R., et al., *Hypoxia up-regulates CD36 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(39): p. 26695-707.
88. Perman, J.C., et al., *The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction*. *J Clin Invest*. **121**(7): p. 2625-40.
89. Podrez, E.A., et al., *A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38517-23.
90. Han, J., et al., *Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 21654-9.
91. Chen, K., et al., *A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein*. *Circ Res*, 2008. **102**(12): p. 1512-9.
92. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(1): p. 136-45.
93. Zibara, K., E. Malaud, and J.L. McGregor, *CD36 mRNA and Protein Expression Levels Are Significantly Increased in the Heart and Testis of apoE Deficient Mice in Comparison to Wild Type (C57BL/6)*. *J Biomed Biotechnol*, 2002. **2**(1): p. 14-21.

BIBLIOGRAFÍA

94. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986. **232**(4746): p. 34-47.
95. Hussain, M.M., D.K. Strickland, and A. Bakillah, *The mammalian low-density lipoprotein receptor family*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 141-72.
96. Li, Y., J. Cam, and G. Bu, *Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction*. Mol Neurobiol, 2001. **23**(1): p. 53-67.
97. Cam, J.A. and G. Bu, *Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family*. Mol Neurodegener, 2006. **1**: p. 8.
98. Niemeier, A., et al., *VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro*. J Lipid Res, 1996. **37**(8): p. 1733-42.
99. Takahashi, S., et al., *The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor*. J Atheroscler Thromb, 2004. **11**(4): p. 200-8.
100. Mulhaupt, H.A., et al., *Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall. Analysis of human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry*. Am J Pathol, 1996. **148**(6): p. 1985-97.
101. Kosaka, S., et al., *Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor: interferon-gamma inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages*. Circulation, 2001. **103**(8): p. 1142-7.
102. Qu, S., et al., *Role of VLDL receptor in the process of foam cell formation*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2004. **24**(1): p. 1-4, 8.
103. Eck, M.V., et al., *Role of the macrophage very-low-density lipoprotein receptor in atherosclerotic lesion development*. Atherosclerosis, 2005. **183**(2): p. 230-7.
104. Lillis, A.P., et al., *LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies*. Physiol Rev, 2008. **88**(3): p. 887-918.
105. Herz, J., et al., *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor*. EMBO J, 1988. **7**(13): p. 4119-27.
106. Gotthardt, M., et al., *Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25616-24.
107. Herz, J., et al., *Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment*. EMBO J, 1990. **9**(6): p. 1769-76.
108. Herz, J., et al., *39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(31): p. 21232-8.
109. Herz, J. and D.K. Strickland, *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 779-84.
110. Zhang, H., et al., *Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 2221-30.
111. Zhang, H., et al., *Mutational analysis of the FXNPXY motif within LDL receptor-related protein 1 (LRP1) reveals the functional importance of the tyrosine residues in cell growth regulation and signal transduction*. Biochem J, 2008. **409**(1): p. 53-64.

112. Hiltunen, T.P., et al., *Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development*. *Circulation*, 1998. **97**(11): p. 1079-86.
113. Luoma, J., et al., *Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(5): p. 2014-21.
114. Moestrup, S.K., J. Gliemann, and G. Pallesen, *Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues*. *Cell Tissue Res*, 1992. **269**(3): p. 375-82.
115. Llorente-Cortes, V., et al., *Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries*. *Eur J Clin Invest*, 2004. **34**(3): p. 182-90.
116. Costales, P., et al., *Selective role of sterol regulatory element binding protein isoforms in aggregated LDL-induced vascular low density lipoprotein receptor-related protein-1 expression*. *Atherosclerosis*. **213**(2): p. 458-68.
117. Camino-Lopez, S., et al., *Tissue factor induction by aggregated LDL depends on LDL receptor-related protein expression (LRP1) and Rho A translocation in human vascular smooth muscle cells*. *Cardiovasc Res*, 2007. **73**(1): p. 208-16.
118. Llorente-Cortes, V., et al., *Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 2004. **110**(4): p. 452-9.
119. Toschi, V., et al., *Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques*. *Circulation*, 1997. **95**(3): p. 594-9.
120. Sendra, J., et al., *Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension*. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**(3): p. 581-9.
121. Boucher, P., et al., *LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis*. *Science*, 2003. **300**(5617): p. 329-32.
122. Overton, C.D., et al., *Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse*. *Circ Res*, 2007. **100**(5): p. 670-7.
123. Hu, L., et al., *Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(12): p. 2710-5.
124. Huang, S.S., et al., *Cellular growth inhibition by IGFBP-3 and TGF-beta1 requires LRP-1*. *FASEB J*, 2003. **17**(14): p. 2068-81.
125. Espirito Santo, S.M., et al., *Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3777-82.
126. van Veen, A.A., H.V. van Rijen, and T. Opthof, *Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties*. *Cardiovasc Res*, 2001. **51**(2): p. 217-29.
127. Jalife, J., G.E. Morley, and D. Vaidya, *Connexins and impulse propagation in the mouse heart*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999. **10**(12): p. 1649-63.
128. Morel, S. and B.R. Kwak, *Roles of connexins in atherosclerosis and ischemia-reperfusion injury*. *Curr Pharm Biotechnol*. **13**(1): p. 17-26.
129. Vozzi, C., et al., *Chamber-related differences in connexin expression in the human heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(5): p. 991-1003.

BIBLIOGRAFÍA

130. Hadri, L. and R.J. Hajjar, *Calcium cycling proteins and their association with heart failure*. Clin Pharmacol Ther. **90**(4): p. 620-4.
131. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
132. Bers, D.M., *Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction*. Circ Res, 2000. **87**(4): p. 275-81.
133. Kawase, Y. and R.J. Hajjar, *The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008. **5**(9): p. 554-65.
134. Arai, M., H. Matsui, and M. Periasamy, *Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure*. Circ Res, 1994. **74**(4): p. 555-64.
135. Mercadier, J.J., et al., *Altered sarcoplasmic reticulum Ca₂(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure*. J Clin Invest, 1990. **85**(1): p. 305-9.
136. Nagai, R., et al., *Regulation of myocardial Ca₂⁺-ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2966-70.
137. de la Bastie, D., et al., *Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca₂(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat*. Circ Res, 1990. **66**(2): p. 554-64.
138. Flesch, M., et al., *Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na(+)-Ca₂⁺ exchanger in failing human myocardium*. Circulation, 1996. **94**(5): p. 992-1002.
139. Hasenfuss, G., *Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 279-89.
140. Studer, R., et al., *Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca₂⁺ exchanger in end-stage human heart failure*. Circ Res, 1994. **75**(3): p. 443-53.
141. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 566-77.
142. Peterson, B.Z., et al., *Calmodulin is the Ca₂⁺ sensor for Ca₂⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels*. Neuron, 1999. **22**(3): p. 549-58.
143. Zuhlke, R.D., et al., *Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels*. Nature, 1999. **399**(6732): p. 159-62.
144. Scriven, D.R., P. Dan, and E.D. Moore, *Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes*. Biophys J, 2000. **79**(5): p. 2682-91.
145. Sham, J.S., et al., *Termination of Ca₂⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 15096-101.
146. Sipido, K.R., G. Callewaert, and E. Carmeliet, *Inhibition and rapid recovery of Ca₂⁺ current during Ca₂⁺ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes*. Circ Res, 1995. **76**(1): p. 102-9.
147. Shaw, R.M. and Y. Rudy, *The vulnerable window for unidirectional block in cardiac tissue: characterization and dependence on membrane excitability and intercellular coupling*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1995. **6**(2): p. 115-31.
148. Spach, M.S. and J.F. Heidlage, *The stochastic nature of cardiac propagation at a microscopic level. Electrical description of myocardial architecture and its application to conduction*. Circ Res, 1995. **76**(3): p. 366-80.

149. Severs, N.J., et al., *Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system*. Microsc Res Tech, 2001. **52**(3): p. 301-22.
150. White, T.W. and R. Bruzzone, *Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences*. J Bioenerg Biomembr, 1996. **28**(4): p. 339-50.
151. Peters, N.S., et al., *Cardiac arrhythmogenesis and the gap junction*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 37-44.
152. van der Velden, H.M., et al., *Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1998. **9**(6): p. 596-607.
153. Kirchhoff, S., et al., *Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice*. Curr Biol, 1998. **8**(5): p. 299-302.
154. van der Vusse, G.J., M. van Bilsen, and J.F. Glatz, *Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 279-93.
155. Yagyu, H., et al., *Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 419-26.
156. Augustus, A.S., et al., *Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8716-23.
157. Weinstock, P.H., et al., *Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2555-68.
158. Osono, Y., et al., *Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1124-32.
159. Niu, Y.G., D. Hauton, and R.D. Evans, *Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates*. J Physiol, 2004. **558**(Pt 1): p. 225-37.
160. Fielding, C.J., *Metabolism of cholesterol-rich chylomicrons. Mechanism of binding and uptake of cholesteryl esters by the vascular bed of the perfused rat heart*. J Clin Invest, 1978. **62**(1): p. 141-51.
161. Merkel, M., et al., *Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13841-6.
162. Zhou, Y.T., et al., *Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1784-9.
163. Finck, B.N., et al., *The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 121-30.
164. Sharma, S., et al., *Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1692-700.
165. McGavock, J.M., et al., *Adiposity of the heart, revisited*. Ann Intern Med, 2006. **144**(7): p. 517-24.
166. Bergmann, S.R., et al., *Characterization of altered myocardial fatty acid metabolism in patients with inherited cardiomyopathy*. J Inherit Metab Dis, 2001. **24**(6): p. 657-74.

BIBLIOGRAFÍA

167. Greve, G., et al., *Early morphologic changes in cat heart muscle cells after acute coronary artery occlusion*. Am J Pathol, 1990. **136**(2): p. 273-83.
168. Jodalen, H., et al., *Lipid accumulation in the myocardium during acute regional ischaemia in cats*. J Mol Cell Cardiol, 1985. **17**(10): p. 973-80.
169. Yang, R. and L.A. Barouch, *Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences*. Circ Res, 2007. **101**(6): p. 545-59.
170. Bugger, H. and E.D. Abel, *Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(3): p. 195-210.
171. Unger, R.H. and L. Orci, *Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1585**(2-3): p. 202-12.
172. Borradaile, N.M., et al., *Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death*. J Lipid Res, 2006. **47**(12): p. 2726-37.
173. Buchanan, J., et al., *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5341-9.
174. Wende, A.R. and E.D. Abel, *Lipotoxicity in the heart*. Biochim Biophys Acta. **1801**(3): p. 311-9.
175. Wende, A.R., J.D. Symons, and E.D. Abel, *Mechanisms of lipotoxicity in the cardiovascular system*. Curr Hypertens Rep. **14**(6): p. 517-31.
176. Iozzo, P., *Myocardial, perivascular, and epicardial fat*. Diabetes Care. **34 Suppl 2**: p. S371-9.
177. Pillutla, P., et al., *Perfusion of hearts with triglyceride-rich particles reproduces the metabolic abnormalities in lipotoxic cardiomyopathy*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(6): p. E1229-35.
178. Huang, Y., et al., *Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 97-102.
179. Luo, T.Y., et al., *Effect of hypercholesterolemia on myocardial function in New Zealand white rabbits*. J Biomed Sci, 2004. **11**(6): p. 829-37.
180. Walshe, T.E. and P.A. D'Amore, *The role of hypoxia in vascular injury and repair*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 615-43.
181. Cassavaugh, J. and K.M. Lounsbury, *Hypoxia-mediated biological control*. J Cell Biochem. **112**(3): p. 735-44.
182. Taylor, C.T., *Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway*. Biochem J, 2008. **409**(1): p. 19-26.
183. Simon, M.C. and B. Keith, *The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(4): p. 285-96.
184. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
185. Carmeliet, P., *Basic Concepts of (Myocardial) Angiogenesis: Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin*. Curr Interv Cardiol Rep, 1999. **1**(4): p. 322-335.
186. Habib, G.B., et al., *Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators*. Circulation, 1991. **83**(3): p. 739-46.
187. Sabia, P.J., et al., *An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction*. N Engl J Med, 1992. **327**(26): p. 1825-31.

188. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology*. Trends Mol Med, 2001. **7**(8): p. 345-50.
189. Choi, D., et al., *Ischemic heart diseases: current treatments and future*. J Control Release, 2009. **140**(3): p. 194-202.
190. Kang, P.M., et al., *Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation*. Circ Res, 2000. **87**(2): p. 118-25.
191. Nakaya, H., S. Kimura, and M. Kanno, *Intracellular K⁺ and Na⁺ activities under hypoxia, acidosis, and no glucose in dog hearts*. Am J Physiol, 1985. **249**(6 Pt 2): p. H1078-85.
192. Lee, S.H., et al., *Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction*. N Engl J Med, 2000. **342**(9): p. 626-33.
193. Silter, M., et al., *Impaired Ca(2+)-handling in HIF-1alpha(+/-) mice as a consequence of pressure overload*. Pflugers Arch. **459**(4): p. 569-77.
194. Eckle, T., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning*. Circulation, 2008. **118**(2): p. 166-75.
195. Gourdin, M.J., B. Bree, and M. De Kock, *The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel*. Eur J Anaesthesiol, 2009. **26**(7): p. 537-47.
196. Hyvarinen, J., et al., *Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury*. J Biol Chem. **285**(18): p. 13646-57.
197. Sawada, N., et al., *Involvement of hypoxia-triggered endoplasmic reticulum stress in outlet obstruction-induced apoptosis in the urinary bladder*. Lab Invest, 2008. **88**(5): p. 553-63.
198. Salvaterra, C.G. and W.F. Goldman, *Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes*. Am J Physiol, 1993. **264**(3 Pt 1): p. L323-8.
199. Hool, L.C., *Hypoxia increases the sensitivity of the L-type Ca(2+) current to beta-adrenergic receptor stimulation via a C2 region-containing protein kinase C isoform*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1164-71.
200. Chen, S.J., M.E. Bradley, and T.C. Lee, *Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases*. Mol Cell Biochem, 1998. **178**(1-2): p. 141-9.
201. Meynier, A., et al., *Involvement of oxygen free radicals in the respiratory uncoupling induced by free calcium and ADP-magnesium in isolated cardiac mitochondria: comparing reoxygenation in cultured cardiomyocytes*. Mol Cell Biochem, 2003. **243**(1-2): p. 55-64.
202. Frank, J.S., et al., *Structure of the freeze-fractured sarcolemma in the normal and anoxic rabbit myocardium*. Circ Res, 1980. **47**(1): p. 131-43.
203. Ronkainen, V.P., R. Skoumal, and P. Tavi, *Hypoxia and HIF-1 suppress SERCA2a expression in embryonic cardiac myocytes through two interdependent hypoxia response elements*. J Mol Cell Cardiol. **50**(6): p. 1008-16.
204. Lounsbury, K.M., Q. Hu, and R.C. Ziegelstein, *Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(9): p. 1362-9.
205. Clabough, G.F., et al., *Fatty change of the myocardium in early experimental infarction*. AMA Arch Pathol, 1956. **62**(4): p. 318-23.
206. Bilheimer, D.W., et al., *Fatty acid accumulation and abnormal lipid deposition in peripheral and border zones of experimental myocardial infarcts*. J Nucl Med, 1978. **19**(3): p. 276-83.

207. Goldfarb, J.W., M. Roth, and J. Han, *Myocardial fat deposition after left ventricular myocardial infarction: assessment by using MR water-fat separation imaging*. Radiology, 2009. **253**(1): p. 65-73.
208. Osipov, R.M., et al., *Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion*. Circulation, 2009. **120**(11 Suppl): p. S22-30.
209. Kim, E., et al., *CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury*. J Neurosci, 2008. **28**(18): p. 4661-70.
210. Abdel-Aleem, S., et al., *Metabolic changes in the normal and hypoxic neonatal myocardium*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **874**: p. 254-61.
211. Puliniikunnil, T., et al., *Ischemia-reperfusion alters cardiac lipoprotein lipase*. Biochim Biophys Acta. **1801**(2): p. 171-5.
212. Toeda, K., et al., *Versican is induced in infiltrating monocytes in myocardial infarction*. Mol Cell Biochem, 2005. **280**(1-2): p. 47-56.
213. Asplund, A., et al., *Hypoxic regulation of secreted proteoglycans in macrophages*. Glycobiology. **20**(1): p. 33-40.
214. Leonardo, C.C., et al., *Versican and brevican are expressed with distinct pathology in neonatal hypoxic-ischemic injury*. J Neurosci Res, 2008. **86**(5): p. 1106-14.
215. Listenberger, L.L., et al., *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3077-82.
216. Barba, I., et al., *Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia-reperfusion injury in cardiomyocytes*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 6): p. 1331-41.
217. Claycomb, W.C., et al., *HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2979-84.
218. White, S.M., P.E. Constantin, and W.C. Claycomb, *Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(3): p. H823-9.
219. Vilahur, G., et al., *Short-term myocardial ischemia induces cardiac modified C-reactive protein expression and proinflammatory gene (cyclo-oxygenase-2, monocyte chemoattractant protein-1, and tissue factor) upregulation in peripheral blood mononuclear cells*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(3): p. 485-93.
220. Vilahur, G., et al., *Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol. **50**(3): p. 522-33.
221. Swedberg, K., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2005. **26**(11): p. 1115-40.
222. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. J Clin Invest, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
223. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
224. Guyton, J.R., K.F. Klemp, and M.P. Mims, *Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles*. J Lipid Res, 1991. **32**(6): p. 953-62.

225. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
226. Huber, L.A., et al., *Correlation of lymphocyte lipid composition membrane microviscosity and mitogen response in the aged*. Eur J Immunol, 1991. **21**(11): p. 2761-5.
227. Merkel, M., R.H. Eckel, and I.J. Goldberg, *Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 1997-2006.
228. Castellano, J., et al., *Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **31**(6): p. 1411-20.
229. Goldstein, J.L., et al., *Overloading human aortic smooth muscle cells with low density lipoprotein-cholesteryl esters reproduces features of atherosclerosis in vitro*. J Clin Invest, 1977. **59**(6): p. 1196-202.
230. Feuvray, D. and A. Darmellah, *Diabetes-related metabolic perturbations in cardiac myocyte*. Diabetes Metab, 2008. **34 Suppl 1**: p. S3-9.
231. Glenn, D.J., et al., *A murine model of isolated cardiac steatosis leads to cardiomyopathy*. Hypertension. **57**(2): p. 216-22.
232. Balschi, J.A., et al., *¹H NMR measurement of triacylglycerol accumulation in the post-ischemic canine heart after transient increase of plasma lipids*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(2): p. 471-80.
233. Straeter-Knowlen, I.M., et al., *¹H NMR spectroscopic imaging of myocardial triglycerides in excised dog hearts subjected to 24 hours of coronary occlusion*. Circulation, 1996. **93**(7): p. 1464-70.
234. Schaffer, J.E., *Lipotoxicity: when tissues overeat*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(3): p. 281-7.
235. Castellano, J., et al., *Hypoxia exacerbates Ca(2+)-handling disturbances induced by very low density lipoproteins (VLDL) in neonatal rat cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol. **50**(5): p. 894-902.
236. Carvajal, K. and R. Moreno-Sanchez, *Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases*. Arch Med Res, 2003. **34**(2): p. 89-99.
237. Taegtmeier, H., *Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications*. Curr Probl Cardiol, 1994. **19**(2): p. 59-113.
238. Hultin, M., et al., *Intravenous lipid emulsions: removal mechanisms as compared to chylomicrons*. J Lipid Res, 1995. **36**(10): p. 2174-84.
239. Swarnakar, S., et al., *The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21121-8.
240. Wu, L. and S.L. Gonias, *The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts*. J Cell Biochem, 2005. **96**(5): p. 1021-33.
241. Llorente-Cortes, V., M. Otero-Vinas, and L. Badimon, *Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1905-11.
242. Liu, L., et al., *Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1679-89.

243. Hamilton, J.A. and F. Kamp, *How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?* Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2255-69.
244. Augustus, A.S., et al., *Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(2): p. E331-9.
245. Merkel, M., et al., *Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake.* J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7405-11.
246. Koliwad, S.K., et al., *DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation.* J Clin Invest. **120**(3): p. 756-67.
247. Christoffersen, C., et al., *Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice.* Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3483-90.
248. Rijzewijk, L.J., et al., *Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus.* J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(22): p. 1793-9.
249. Chabowski, A., et al., *Hypoxia-induced fatty acid transporter translocation increases fatty acid transport and contributes to lipid accumulation in the heart.* FEBS Lett, 2006. **580**(15): p. 3617-23.
250. van Herpen, N.A. and V.B. Schrauwen-Hinderling, *Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity.* Physiol Behav, 2008. **94**(2): p. 231-41.
251. Zipes, D.P. and H.J. Wellens, *Sudden cardiac death.* Circulation, 1998. **98**(21): p. 2334-51.
252. Young, M.E., et al., *Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart.* Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2587-95.
253. Fujita, S., et al., *Markedly increased intracellular lipid droplets and disruption of intercellular junctions in biopsied myocardium from a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.* Heart Vessels, 2008. **23**(6): p. 440-4.
254. Pogwizd, S.M., *Increased Na(+)-Ca(2+) exchanger in the failing heart.* Circ Res, 2000. **87**(8): p. 641-3.
255. Van Wagoner, D.R., et al., *Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation.* Circ Res, 1999. **85**(5): p. 428-36.
256. Van Wagoner, D.R., et al., *Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation.* Circ Res, 1997. **80**(6): p. 772-81.
257. Hove-Madsen, L., et al., *Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes.* Circulation, 2004. **110**(11): p. 1358-63.
258. Llach, A., et al., *Sarcoplasmic reticulum and L-type Ca(2+)(+) channel activity regulate the beat-to-beat stability of calcium handling in human atrial myocytes.* J Physiol. **589**(Pt 13): p. 3247-62.
259. Mackenzie, L., et al., *The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca(2+) signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes.* J Physiol, 2002. **541**(Pt 2): p. 395-409.
260. Wehrens, X.H., et al., *Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2.* Science, 2004. **304**(5668): p. 292-6.
261. van der Velden, H.M. and H.J. Jongsma, *Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets.* Cardiovasc Res, 2002. **54**(2): p. 270-9.

262. Liu, Y.B., et al., *Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling, and increased vulnerability to ventricular fibrillation in hypercholesterolemic rabbits*. *Circ Res*, 2003. **92**(10): p. 1145-52.
263. Bacova, B., et al., *Omega-3 fatty acids and atorvastatin suppress ventricular fibrillation inducibility in hypertriglyceridemic rat hearts: implication of intracellular coupling protein, connexin-43*. *J Physiol Pharmacol*. **61**(6): p. 717-23.
264. Lin, L.C., et al., *Downregulated myocardial connexin 43 and suppressed contractility in rabbits subjected to a cholesterol-enriched diet*. *Lab Invest*, 2005. **85**(10): p. 1224-37.
265. Osadchii, O.E., E. Soltysinska, and S.P. Olesen, *Na⁺ channel distribution and electrophysiological heterogeneities in guinea pig ventricular wall*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **300**(3): p. H989-1002.
266. de Groot, J.R., et al., *Conduction slowing by the gap junctional uncoupler carbenoxolone*. *Cardiovasc Res*, 2003. **60**(2): p. 288-97.
267. Draeger, A., et al., *Statin therapy and the expression of genes that regulate calcium homeostasis and membrane repair in skeletal muscle*. *Am J Pathol*. **177**(1): p. 291-9.
268. Gourdie, R.G., et al., *The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system*. *J Cell Sci*, 1993. **105** (Pt 4): p. 985-91.
269. Yeh, H.I., et al., *Reduced expression of endothelial connexin37 and connexin40 in hyperlipidemic mice: recovery of connexin37 after 7-day simvastatin treatment*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(8): p. 1391-7.
270. Hagedorff, A., et al., *Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation*. *Circulation*, 1999. **99**(11): p. 1508-15.
271. Verheule, S., et al., *Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999. **10**(10): p. 1380-9.
272. Gutstein, D.E., et al., *Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43*. *Circ Res*, 2001. **88**(3): p. 333-9.
273. Thomas, S.A., et al., *Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction*. *Circulation*, 1998. **97**(7): p. 686-91.
274. Bacskai, B.J., et al., *The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(21): p. 11551-6.
275. Goonasekara, C.L., et al., *Cholesterol and cardiac arrhythmias*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. **8**(7): p. 965-79.
276. Katz, A. M. et al., *Physiology of the heart*. Philadelphia, Lippincott, 2001, Williams & Wilkins XVI.