

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

El estrés oxidativo mitocondrial media las consecuencias cardiovasculares asociadas a la obesidad y a la isquemia miocárdica mediante la activación del estrés de retículo endoplásmico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco das Chagas Vasconcelos de Souza Neto

DIRIGIDA POR

Victoria Cachafeiro Ramos  
Ernesto Martínez Martínez

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**



**TESIS DOCTORAL**

**EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL MEDIA LAS CONSECUENCIAS  
CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD Y A LA ISQUEMIA  
MIOCÁRDICA MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DEL ESTRÉS DE RETÍCULO  
ENDOPLÁSMICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco das Chagas Vasconcelos de Souza Neto

DIRECTORES

Dra. Victoria Cachofeiro Ramos  
Dr. Ernesto Martínez Martínez

“Ninguna persona ignora todo. Nadie lo sabe todo.  
Todos sabemos algo. Todos ignoramos algo.  
Por eso aprendemos siempre”

Paulo Freire

# DEDICATORIA

## DEDICATORIA

A todas las personas que no me dejaron desistir  
y a mí por no haber desistido.

# AGRADECIMENTOS

“La gratitud se da cuando la memoria se almacena en el corazón y no en la mente” - Lionel Hampton

Con esta frase, empiezo mis más sinceros agradecimientos. Destaco que de toda esta tesis este apartado es lo más importante para mí, es lo más orgánico y personal. Aquí queda reflejado mi intento de materializar todos mis sentimientos y mi gratitud sincera y desinteresada. En este apartado no hay lugar para rigor científico ni para normativas académicas. Muchos de estos agradecimientos van direccionados a personas que a simple vista puede parecer que no tienen nada que ver con el labor científico que ha sido necesario para llevar a cabo este trabajo. Sin embargo, para mí es de crucial importancia destacarlas, ya que cada una de estas personas ha contribuido de algún modo para que yo pudiera llegar hasta aquí. Así que estas son las pocas palabras de estas tesis escritas con el corazón.

En primer lugar, agradezco a **Dios** por hacer de mi vida un gran milagro. Desgraciadamente sólo yo puedo tener dimensión de esta realidad.

A **mi familia**, a **mis padres** y **hermanos** que a pesar de todo no resta duda que ellos están siempre deseando que yo realice mis sueños y sea feliz.

**En especial agradezco a mis abuelos**, *in memoria*, por haberme educado, enseñado mucho sobre la vida y principalmente por haber participado de manera tan cercana en la construcción de mi carácter y principios, a los cuales me aferro fuertemente cada día y no suelto por nada ni por nadie, ya que es la única manera que me hace estar conectado con ellos. *Os amo muito e sempre os amarei. Todos meus méritos sempre serão seus. Obrigado por me guiar e me proteger.*

A *mon petit bout*, por ser un sol, por ser lo más importante y lo más presente en mi vida, por ser quien me ha dado más fuerza para soportar todas las dificultades encontradas en estos 5 años de tesis. Gracias por hacerme

levantar la cabeza miles de veces y hacerme ver el lado positivo aun que me resultase imposible. Muchas gracias por todo **Thomas**, este mérito también es tuyo. *Je t'aime*.

**A mis directores de tesis**, por trabajar tanto para tener posibilidades de llevar a cabo la investigación en esta universidad y por ser responsables, viabilizar un espacio de formación al cual me siento privilegiado haber podido disfrutar de ello. Gracias por haberme dado la oportunidad de hacer mi estancia en el laboratorio en 2012, que después de los 9 meses que formé parte del grupo he trabajado incansablemente para hacer posible volver para hacer esta tesis. Gracias por vuestro trabajo, por todas las correcciones que me hicieron madurar y crecer científicamente. Gracias por vuestra implicación en el laboratorio, nunca me habéis dejado con una duda sin resolver. Muchas gracias por haberme apoyado también a nivel personal. Gracias a Victoria por contratar mis clases de deporte, y a Ernesto por las insulinas de tu madre que me trajiste cuando iba muy justo de dinero. Todo eso me ha ayudado a hacer el primer año del doctorado sin ninguna financiación. De verdad que soy profundamente agradecido.

Agradezco al **Instituto de Salud Carlos III - Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)** por financiar esta investigación (PI18/00257; PI21/00431), a la **Universidad Complutense de Madrid y al Banco Santander** por el contrato de investigador en formación que he podido disfrutar (CT42/18-CT43/18). Además, agradezco a la Universidad Complutense de Madrid por la oportunidad de formar parte del profesorado del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina disfrutando de un contrato de Profesional docente e Investigador (Ayudante de departamento).

Gracias **a todos los miembros del grupo** de Investigación en Fisiopatología Cardiovascular y Metabólica por estar juntos en esta caminata. Gracias a todos que pasaron por el laboratorio y que con su labor han aportado para esta tesis. Gracias a todos los colaboradores que han hecho posible la

realización de esta tesis, un agradecimiento especial a la **Dra. Maria Luaces**, al **Dr. Bunt Ramchandani** y al **Dr. Fabian Islas** por vuestro trabajo y disponibilidad.

Gracias a todos los **animales y pacientes** que han hecho posible la realización de este estudio.

Gracias a **Gema** y a **Raquel** por vuestro trabajo, por vuestra amistad y por los momentos vividos fuera de la Universidad.

Aiii **Yacondraaa**, muchas gracias por ser increíblemente humana, tierna, empática. Gracias por todo el apoyo en esta dura etapa de mi vida que simplemente por exhalar buenas vibras me ha ayudado a llegar hasta aquí.

Gracias a **todos los profesores del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina** que me han acogido con los brazos abiertos y por haber sido siempre muy respetuosos conmigo. Muchas a gracias a todos los que han aportado en mi formación docente, por haberme enseñado mucho y por haber permitido que yo, aunque con muchísima menos experiencia también pudiera enseñaros algo. Agradezco en especial a **Teresa Priego**, por contagiarme su entusiasmo por la docencia, a **Soni López-Calderón** por ser tan amable y estar siempre dispuesta a ayudarme, a **Anabel Martin** que me ha emocionado con su manera única de enseñar y siempre ha sido muy amable conmigo, a **Natalia de las Heras** que, aunque digas que eres como un cactus y te gusta mantener las distancias, me has transmitido mucha confianza y cercanía en los momentos que he tenido el placer de trabajar contigo. Muchas gracias a **Ricardo Gredilla** y **Gregorio Segovia** que junto con **Natalia** me han propuesto de manera muy amable y desinteresada probar mi propuesta de innovación docente en sus clases. Vuestra actitud ha sido muy importante para coger fuerzas y ánimos para llegar hasta aquí.

Muchas gracias a **Verónica Hurtado** y **Elena Nebot**. Ahora mismo me llena los ojos de lágrimas al pensar en las bonitas palabras sobre mi trabajo que siempre han venido de vosotras. Me siento afortunado de poder trabajar con vosotras. No tenéis ni idea del significado de vuestras palabras, ellas también me hicieron llegar hasta aquí.

Gracias a **todos los alumnos** que he tenido el privilegio de enseñar. Gracias por fomentar mi pasión por la docencia.

Agradezco al **Dr. Vicente Lahera**, por las conversaciones muy interesantes y sus consejos, siempre de una manera leve y graciosa.

Gracias al **Dr. Sergio Parades**, por ser siempre tan respetuoso hacia mí como director del Departamento. Gracias por tenerme en cuenta a pesar de contar con poca experiencia y ocupar el primer escalón de la carrera docente de la universidad.

Muchísimas gracias a **Roció Flores**, por siempre recibirme tan bien cada vez que he necesitado ir a la secretaria del departamento, ya sea por conseguir información o materiales de papelería.

Muchas gracias a los técnicos del departamento de Fisiología **Virginia, Avelina, Sandra y Dani** por todo el apoyo en los experimentos y en la manutención del laboratorio. Gracias por todos los geles que incontables veces me habéis preparado vosotras. Gracias por siempre haber ayudado con la organización de los laboratorios de prácticas y por siempre solucionar los problemas que hemos tenido de la mejor manera.

A **Marisa**, por su trabajo, por su atención y por su autenticidad, que en algunos casos es un poco pesadilla (hehehe). Muchas gracias por alegrar mis días de trabajo, sobre todo durante esta última etapa de escritura de la tesis.

## AGRADECIMENTOS

A **Marivi** que desde 2012 me ha tratado super bien y que a pesar de haber coincidido muy poco en estos últimos 5 años, siempre me he sentido respetado y privilegiado con nuestras conversaciones.

A **Elvira López** que, por poco coincidimos en el curso de formación docente y la vida ha tratado de rectificar este fallo. Muchas gracias por los ánimos, por el gran entusiasmo y ganas de ayudar a transformar la sociedad en la que vivimos a partir del conocimiento, eres inspiradora.

Muchas gracias, **Marina Martín**, por ser mi compañera, Ayudante de Departamento, y por haberme acompañado en esta etapa, sólo nosotros sabemos el desafío de ser una figura desconocida (hehehe).

Muchas gracias a la Coordinadora del programa de Doctorado de Investigación Biomédica, por contestar todos mis correos de manera tan rápida, educada y siempre muy resolutiva. Muchas gracias, **Dra. María Ángeles Vicente López**.

*Muito obrigado a **Dra. Silva Guatimozim** por me receber tão bem no seu grupo de Sinalização Cardíaca e por viabilizar realização dos experimentos. Muito obrigado a todos os membros do grupo, em especial ao **Dr. Sergio Scalzo** e ao **Ms. Victor Moura**, sem vocês nenhum experimento seria possível. Obrigado ao pessoal do Laboratório Biofísica de Sistemas Nanoestruturados por toda ajuda.*

*Muito obrigado por todo a mis amigos **Karilane, Taylena, Ana Luisa, Alan y Paolo**.*

Muchas gracias a **Kukita, Adele, Yara, Paula y Laura** que han visto de cerca el estrés oxidativo mitocondrial (heheheh).

Muchas gracias a **Purificación Rio**, mi amada Puri. Es que no puedo describir la importancia que tienes en mi vida y para el cierre de este ciclo. Gracias por

## AGRADECIMENTOS

ocupar el puesto de mi amiga más mayor, y por seguir dando lecciones a la gente a los 96 años de vida. Gracias por ser un ejemplo de solidaridad, empatía y bondad. Eres un sol, un cielo y todo lo más grande este mundo. Gracias por adoptarme como nieto y por salvar mi vida, si hoy puedo terminar este ciclo es por ti. Muchas gracias a sus hijos **Paloma, Angelines, Puri y Julián**, por darme una familia madrileña.

Gracias a mis amigos COSITAS, más conocido como la ONU (**Arthur, Esteban, Daniela, Vanessa, Gabriela**) por hacerme sentir en casa, por ser literalmente mi familia con todos los rollos y líos incluidos. Sois lo mejor que me podría haber pasado. Gracias por darme fuerza para continuar, sin vosotros tampoco habría llegado hasta aquí.

Muchas gracias a mis amigos de la cuarentena, que me han ayudado mucho a tranquilizarme y relajarme del estrés que tenía con las copitas en el balcón después de los aplausos. Muchas gracias, **Nico, Tati, Javi, Agus y Ga**. Sois lo mejor de esta pandemia MUNDIAAL, como decía Javi (hehehehe).

Gracias a todos mis amigos **Lucía M., Asunción, Isabel, Carlos, Lucía, Paul, Neta y Pera** por la amistad y por los ánimos.

A parte de los *Homo sapiens sapiens*, no podría dejar de dar las gracias a *mes Petits chats*, **Boulette y Brioche Macaron**, por haber tenido un papel fundamental en mi salud mental durante esta etapa de mi vida, gracias por haberme hecho pensar en las cosas simples de la vida, las que realmente valen la pena. A mis plantas **Manolo, Carmen y Encarna**, que puede incluso parecer broma, pero me han entretenido mucho y con su belleza han alegrado los días difíciles.

Es posible que yo cometa algún despiste y olvide mencionar a alguien que ha sido importante en esta etapa. Por ello, incluyo en mis agradecimientos a

**TODOS aquellos que sienten haber tenido un papel verdaderamente importante para que yo consiguiese llegar hasta aquí.**

Por último y no menos importante, escribo los agradecimientos direccionados **a mí**, por mi trayectoria, por mi historia de vida, por mis limitaciones, por mi insistencia, por mis dolores, por mis cicatrices, por mis dudas, por mis fragilidades, por mi carácter, por mi educación, por mi lealtad, por mi bondad, por mi creatividad, por mis lágrimas, por mi coherencia, por mi osadía, por mi criticidad, por mi alegría, por mis errores, por mi entusiasmo y decepciones. Gracias a todo lo bueno y a todo lo malo, que me ha posibilitado construir mi trayectoria y sacar fuerzas para continuar y llegar hasta aquí

# ABREVIATURAS

4-PBA	Ácido 4-Fenilbutírico
$\alpha$ -SMA	Alfa Actina de Músculo Liso
Ang II	Angiotensina II
ASK1	Quinasa 1 Reguladora de la Señal de Apoptosis
ATF4	Factor de Transcripción Activador 4
ATF6	Factor de Transcripción Activador 6
ATF6 $\alpha$	Factor de Transcripción Activador 6 Alfa
BiP	Proteína de unión a la inmunoglobulina
BNP	Péptido Natriurético Tipo B
CALRT	Calreticulina
CHOP	Proteína Homóloga de Unión al Potenciador de CCAAT
CMLV	Células de Músculo Liso Vascular
CTGF	Fator de Crecimiento de Tejido Conectivo
cTn	Troponina Cardíaca
E/A	Relación de las Ondas E y A
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECG	Electrocardiograma
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
eIF2 $\alpha$	Factor de Iniciación Eucariota 2 Alfa
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial

ERAD	Degradación de Proteínas Asociada al Retículo Endoplásmico
ERK	Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares
ERNs	Especies Reactivas de Nitrógeno
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FEVI	Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo
FA	Fracción de Acortamiento
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogeno
HOMA-IR	Índice de Resistencia a la Acción de la Insulina
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Masa Corporal
IRE1 $\alpha$	Proteína 1 Alfa dependiente de inositol
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1
MDA	Malondialdehído
MEC	Matriz Extracelular
MitoQ	Mitoquinol mesilato
MMPs	Metaloproteinasas de Matriz
MnSOD	Superóxido Dismutasa de Manganeso
MPO	Mieloperoxidasa

NFκB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
Nrf-2	Fator Nuclear Derivado de Eritróide 2
NSTEMI	Síndrome Coronario Aterotrombótico Agudo sin Elevación del Segmento ST
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión Superóxido
•OH	Radicales Libres Hidroxilos
OMS	Organización Mundial de la Salud
ox-LDL	Lipoproteína de Baja Densidad Oxidada
PERK	Proteína Cinasa del RNA Unida a una Cinasa del Retículo Endoplásmico
PTPm	Poros de Transición de Permeabilidad mitocondrial
RE	Retículo Endoplásmico
SOD	Superóxido Dismutasa
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
STEMI	Síndrome Coronario Aterotrombótico Agudo con Elevación del Segmento ST
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante-Beta
TIMPs	Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TTP	Catión Lipídico Trifenilfosfonio

## ABREVIATURAS

TUDCA	Ácido Ursodesoxicólico Conjugado con Taurina
UPR	Respuesta a Proteínas Mal Plegadas
VD	Ventrículo Derecho
VI	Ventrículo Izquierdo
XBP-1	Proteína de unión X-box 1

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>23</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>29</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>34</b>
1. <b>OBESIDAD</b> .....	35
1.1. <i>Definición y clasificación</i> .....	35
1.2. <i>Prevalencia de la obesidad</i> .....	38
1.3. <i>Tejido adiposo como un órgano endocrino</i> .....	39
1.4. <i>Consecuencias cardiovasculares de la obesidad</i> .....	42
2. <b>INFARTO DE MIOCARDIO</b> .....	51
2.1. <i>Definición y clasificación</i> .....	51
2.2. <i>Prevalencia del Infarto de miocardio</i> .....	56
2.3. <i>Consecuencias cardíacas del Infarto de Miocardio</i> .....	57
3. <b>MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS CONSECUENCIAS CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD Y AL INFARTO DE MIOCARDIO</b> .....	59
3.1. <i>Fibrosis cardiovascular</i> .....	60
3.2. <i>Lipotoxicidad</i> .....	65
3.3. <i>Estrés del retículo endoplásmico</i> .....	69
3.4. <i>Estrés oxidativo</i> .....	77
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>85</b>
<b>PUBLICACIONES</b> .....	<b>88</b>
<i>Trabajo nº 1: The Interplay of Mitochondrial Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Fibrosis in Obese Rats.</i> .....	89
<i>Trabajo nº 2: Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Cardiac Remodeling in Myocardial Infarction through the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress.</i> .....	114

<i>Trabajo nº 3 (no publicado): The role of mitochondrial oxidative stress in cardiac damage induced by obesity associated with myocardial infarction in rats. ....</i>	136
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>193</b>

# RESUMEN

**Introducción:** La obesidad se caracteriza por un exceso de grasa corporal, y representa uno de los problemas de salud más importante a nivel mundial. El exceso de peso genera cambios metabólicos y cardíacos que aumentan drásticamente el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, como el infarto de miocardio (IM). Tanto la obesidad como el IM generan cambios hemodinámicos y celulares que conducen a un remodelado cardíaco patológico y a alteraciones en el funcionamiento del corazón, que pueden resultar en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Además, la presencia conjunta de obesidad y de IM puede resultar un complejo contexto patológico que favorece y agrava el daño cardíaco.

El estrés oxidativo puede jugar un papel central en el daño cardiovascular asociado a estos contextos patológicos. Considerando que la mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno, el objetivo del presente estudio fue evaluar el posible papel del estrés oxidativo mitocondrial en las alteraciones cardiovasculares inducidas por la obesidad, en el daño cardíaco asociado al IM y en el contexto patológico en el que ambas patologías son concomitantes, así como la implicación del estrés de retículo endoplásmico (RE) en estos cambios.

**Métodos:** Se desarrolló un modelo de obesidad inducido por dieta mediante la administración de una dieta rica en grasas (HFD, 35 % de grasa; n=16) en ratas macho Wistar de 6 semanas de edad durante 6 semanas. Animales que recibieron una dieta de control (CT, 3,5 % de grasa; n=16) fueron utilizados como grupo de referencia. La mitad de los animales de cada grupo recibieron el antioxidante mitocondrial MitoQ (200  $\mu$ M) en el agua de bebida durante todo el período de evolución.

Se desarrolló también un modelo de IM mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratas macho Wistar de 12 semanas de edad (IM; n=20). Animales con operación simulada, a los que no se ligó la arteria coronaria, fueron utilizados como animales controles (CT; n=20). La mitad de los animales de cada grupo recibieron el antioxidante mitocondrial MitoQ (200  $\mu$ M) en el agua de bebida. El tratamiento se inició en el momento que se hizo la cirugía y se extendió durante 4 semanas.

Finalmente, se realizó un modelo experimental de IM y obesidad donde ratas macho Wistar de 6 semanas de edad fueron alimentados con una dieta rica en grasa (HFD) durante 10 semanas. En la sexta semana se indujo el IM (HFD+IM; n=18). Ratas alimentadas con dieta control y cirugía simulada fueron utilizadas como grupo control (CT; n=16). La mitad de los animales recibió MitoQ del mismo modo que en los modelos anteriores.

El peso corporal de los animales fue medido semanalmente y la presión arterial sistólica fue evaluada mediante pletismografía en la cola al final del periodo de evolución. La función y la estructura cardíaca fueron evaluadas mediante un estudio ecocardiográfico y de resonancia magnética cardíaca al final del periodo de evolución. Se realizó un análisis histológico y un estudio de biología molecular de los mediadores fibróticos y marcadores del estrés de RE y del daño mitocondrial mediante la técnica de Western blot. También se analizó una cohorte de pacientes ingresados con un primer episodio de IM a los que se les realizó un estudio de resonancia magnética cardíaca durante el ingreso en el hospital y a los 12 meses de seguimiento. Se midió la fracción de volumen extracelular (VEC), un marcador subrogado de fibrosis, y los niveles séricos de mieloperoxidasa (MPO), un marcador del estrés oxidativo en pacientes. El contenido de BiP y de colágeno fueron medidos en muestras de necropsia cardíaca de pacientes que habían sufrido o no un IM.

Con objeto de investigar la participación del estrés oxidativo mitocondrial y del estrés del RE en el desarrollo de la fibrosis, se llevó a cabo estudios de cultivo celulares con células de musculo liso vascular (CMLV) y fibroblastos cardiacos estimuladas con angiotensina II (Ang II,  $10^{-6}$  M) en presencia o ausencia del antioxidante mitocondrial MitoQ (5 nM) o del inhibidor farmacológico del estrés RE, el ácido 4-fenilbutírico (4PBA; 4  $\mu$ M). Con el objeto de conocer los posibles efectos del estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE sobre la función contráctil del corazón, se realizó un estudio de la contractilidad celular en cardiomiocitos de rata neonatal estimulados con tunicamicina (100 nM), durante 24 horas en presencia o ausencia del antioxidante mitocondrial, MitoTiempo (10  $\mu$ M).

**Resultados:** En los animales obesos no se observaron alteraciones ni en la función cardíaca ni en la morfología de la arteria aorta. Se observó un aumento del peso corporal, así como del índice de adiposidad en animales obesos. Los animales obesos presentaron hipertrofia cardíaca y fibrosis cardiovascular acompañada de niveles elevados de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno I y mediadores profibróticos como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y factor de crecimiento transformante-Beta (TGF- $\beta$ ). Estas alteraciones se asociaron con la activación del estrés de RE caracterizada por niveles cardíacos y aórticos elevados de la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), la proteína disulfuro-isomerasa A6 (PDIA6) y la proteína homóloga de unión al potenciador de CCAAT (CHOP). El tratamiento con MitoQ fue capaz de prevenir todas estas modificaciones a nivel cardíaco y aórtico. Además, se observó una asociación positiva entre la fibrosis cardíaca y los niveles de colágeno I con proteínas implicadas en el estrés del RE.

Animales con IM presentaron una reducción en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y en la relación de las ondas E y A (E/A) en comparación con los controles, además presentaron hipertrofia y fibrosis cardíaca. La fibrosis cardíaca observada en ratas infartadas fue acompañada con el aumento de proteínas de matriz extracelular como colágeno I, de mediadores profibróticos (CTGF y TGF- $\beta$ ), de estrés oxidativo, de la activación del estrés del RE y un aumento de los niveles de proteínas que están asociadas a daño mitocondrial. Se observó una correlación positiva entre los niveles cardíacos del marcador del estrés del RE, BiP, con los niveles proteicos de colágeno I. MitoQ redujo el estrés oxidativo y previno todos estos cambios sin modificar el tamaño del infarto que fue de  $32.1 \pm 14.9\%$  en el grupo MI+MQ comparado a  $25,2 \pm 11,7\%$  en animales IM.

Finalmente, en el modelo de IM en presencia de obesidad se observó una fibrosis cardíaca, la activación del estrés del RE y daño mitocondrial, cambios que mejoraron con el antioxidante mitocondrial MitoQ aunque no fue capaz de prevenir el aumento del mediador profibrótico CTGF. Todos estos cambios

observados en los diferentes modelos experimentales fueron independientes de alteraciones en la presión arterial sistólica.

Los estudios *in vitro* mostraron que la presencia de MitoQ (5 nM) y el inhibidor del estrés RE, el 4PBA (4  $\mu$ M), fueron capaces de bloquear los efectos prooxidantes y profibróticos de la angiotensina II (Ang II,  $10^{-6}$  M) en fibroblastos cardíacos y en CMLV. Además, el tratamiento de cardiomiocitos con el antioxidante mitocondrial (MitoTempo) previno la disminución de la frecuencia del ciclo de contracción-relajación, la velocidad y el tiempo de relajación de los cardiomiocitos inducida por el activador farmacológico del estrés del RE, la tunicamicina.

En un grupo de pacientes que han sufrido un primer IM se observó que la FEVI y la relación E/A fue de  $57,6 \pm 7,9$  % y  $0,96 \pm 0,34$ , respectivamente. Los niveles de MPO, marcador de estrés oxidativo, se asociaron de manera directa con la VEC. No se observaron cambios importantes en la función cardíaca, ni en la VEC o en la masa del VI durante el seguimiento de 12 meses tras el IM. En muestras cardíacas de necropsia de pacientes que habían sufrido un IM se observó mayor contenido de BiP y de colágeno que en aquellos pacientes que habían muerto por causas distintas de origen cardiovascular. Asimismo, se observó una asociación directa entre los niveles de BiP y los de colágeno.

**Conclusiones:** Los datos de los diferentes estudios respaldan el papel del estrés oxidativo mitocondrial en las consecuencias cardiovasculares asociadas a la obesidad y al daño cardíaco inducido por el IM y por la asociación de ambas patologías. El estrés oxidativo mitocondrial podría mediar, en parte, sus efectos a través de la activación del estrés del RE. Además, el estudio *in vitro* con fibroblastos y CMLV sugiere la existencia de una interacción entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE, que parece participar en el remodelado de la MEC que conlleva al desarrollo de la fibrosis cardiovascular. El estudio *in vitro* con cardiomiocitos sugiere la participación del estrés oxidativo mitocondrial y del estrés del RE en las alteraciones en la contractilidad celular.

La asociación entre el VEC y los niveles plasmáticos de MPO de pacientes infartados, así como la asociación entre los niveles de BiP y el contenido de colágeno en muestras cardíacas de necrópsica de pacientes con IM respalda nuestros hallazgos en el modelo animal que sugieren la participación del estrés oxidativo mitocondrial y del estrés de RE en la fibrosis cardíaca inducida por el IM.

En conjunto, estos resultados muestran al estrés oxidativo mitocondrial y al estrés de RE como posibles dianas terapéuticas en los diferentes contextos patológicos estudiados, lo que sugiere nuevos enfoques terapéuticos para prevenir/tratar las alteraciones cardiovasculares asociadas a la obesidad y al IM.

**Palabras clave:** Daño cardiovascular. Estrés del retículo endoplásmico.  
Estrés oxidativo mitocondrial. Infarto de miocardio. Obesidad.

# SUMMARY

**Introduction:** Obesity is characterized by an excess of body fat and represents one of the most important health problems worldwide. Excess weight causes metabolic and cardiac changes that drastically increase the risk of cardiovascular disease, such as myocardial infarction (MI). Both obesity and MI generate hemodynamic and cellular changes that lead to pathological cardiac remodeling and alterations in heart function, which can result in the development of heart failure. In addition, the joint presence of obesity and MI can result in a complex pathological context that favors and aggravates cardiac damage.

Oxidative stress may play a central role in the cardiovascular damage associated with these pathological contexts. Considering that mitochondria is the main source of reactive oxygen species, the objective of the present study was to evaluate the possible role of mitochondrial oxidative stress in cardiovascular disorders induced by obesity, in cardiac damage associated with MI, and in the pathological context in which both pathologies are concomitant, as well as the involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in these changes.

**Methods:** A diet-induced model of obesity was developed by administering a high-fat diet (HFD, 35% fat; n=16) in 12-week-old male Wistar rats for 6 weeks. Animals receiving a control diet (CT, 3.5% fat; n=16) were used as the reference group. Half of the animals in each group received the mitochondrial antioxidant MitoQ (200  $\mu$ M) in the drinking water throughout the evolution period.

A model of MI was also developed by ligation of the left anterior descending coronary artery in male Wistar rats (MI; n=20). Sham-operated animals, in which the coronary artery was not ligated, were used as animal controls (CT; n=20). Half of the animals in each group received the mitochondrial antioxidant MitoQ (200  $\mu$ M) in their drinking water. Treatment was started immediately after surgery and continued for 4 weeks.

Finally, an experimental model of MI and obesity was performed in which male Wistar rats were fed a high-fat diet (HFD) for 10 weeks. In the sixth week, MI was induced (HFD+IM; n=18). Rats fed a control diet and undergoing sham

surgery were used as control group (CT; n=16). Half of the animals received MitoQ in the same way as in the previous models.

The body weight of the animals was measured on a weekly basis, and the systolic blood pressure was evaluated by tail plethysmography at the end of the evolution period. Cardiac function and structure were evaluated by an echocardiographic and cardiac magnetic resonance study at the end of the evolution period. A histological analysis and a molecular biology study of fibrotic mediators and markers of ER stress and mitochondrial damage were performed using the Western blot technique. We also analyzed a cohort of patients admitted with a first episode of MI who underwent cardiac magnetic resonance imaging on arrival at the hospital and during a 12-month follow-up. Extracellular volume fraction (ECV), a surrogate marker of fibrosis, and serum myeloperoxidase (MPO) levels, a marker of oxidative stress, were measured in patients. BiP and collagen content were measured in cardiac necropsy samples from patients who had or had not undergone MI.

In order to investigate the role of mitochondrial oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the development of fibrosis, cell culture studies were carried out with vascular smooth muscle cells (VSMC) and cardiac fibroblasts stimulated with angiotensin II (Ang II,  $10^{-6}$  M) in the presence or absence of the mitochondrial antioxidant MitoQ (5 nM) or the pharmacological inhibitor of ER stress, 4-phenylbutyric acid (4PBA; 4  $\mu$ M). In order to know the possible effects of mitochondrial oxidative stress and ER stress on the contractile function of the heart, a study of cell contractility was performed in neonatal rat cardiomyocytes stimulated with tunicamycin (100 nM) for 24 hours in the presence or absence of the mitochondrial antioxidant, MitoTiempo (10  $\mu$ M).

**Results:** In obese animals, no changes in cardiac function or aortic artery morphology were observed. An increase in body weight was observed, as well as in the adiposity index in obese animals. Obese animals presented cardiac hypertrophy and cardiovascular fibrosis accompanied by elevated levels of extracellular matrix proteins such as collagen I and profibrotic mediators such as connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor-

Beta (TGF- $\beta$ ). These alterations were associated with ER stress activation characterized by elevated cardiac and aortic levels of immunoglobulin-binding protein (BiP), protein disulfide isomerase A6 (PDIA6), and CCAAT enhancer-binding homologous protein (CHOP). Treatment with MitoQ was able to prevent all these changes at cardiac and aortic level. In addition, a positive association was observed between cardiac fibrosis and collagen I levels with proteins involved in ER stress.

Animals with MI presented a reduction in left ventricular ejection fraction (LVEF) and in the ratio of E and A waves (E/A) compared to controls. In addition, they presented hypertrophy and cardiac fibrosis. The cardiac fibrosis observed in infarcted rats was accompanied by an increase in extracellular matrix proteins such as collagen I, profibrotic mediators (CTGF and TGF- $\beta$ ), oxidative stress, ER stress activation, and increased levels of proteins that are associated with mitochondrial damages. A positive correlation was observed between the cardiac levels of the ER stress marker, BiP, with collagen I protein levels. MitoQ reduced oxidative stress and prevented all these changes without modifying infarct size, which was  $32.1 \pm 14.9\%$  in the MI+MQ group compared to  $25.2 \pm 11.7\%$  in IM animals.

Finally, in the model of MI in the presence of obesity, cardiac fibrosis, ER stress activation, and mitochondrial damage were observed. These changes were improved with the mitochondrial antioxidant MitoQ, although it was not able to prevent the increase in the profibrotic mediator CTGF. All these changes observed in the different experimental models were independent of changes in systolic blood pressure.

In vitro studies showed that the presence of MitoQ (5 nM) and the ER stress inhibitor, 4PBA (4  $\mu$ M), were able to block the prooxidant and profibrotic effects of angiotensin II (Ang II,  $10^{-6}$  M) in cardiac fibroblasts and in VSMC. In addition, treatment of cardiomyocytes with the mitochondrial antioxidant (MitoTempo) prevented the decrease in contraction-relaxation cycle frequency, velocity, and relaxation time of cardiomyocytes induced by the pharmacological ER stress activator, tunicamycin.

In a group of patients who had suffered a first MI, it was observed that the LVEF and the E/A ratio were  $57.6 \pm 7.9\%$  and  $0.96 \pm 0.34$ , respectively. MPO levels, a marker of oxidative stress, were directly associated with ECV. No significant changes in cardiac function, ECV, or LV mass were observed during the 12-month follow-up after MI. Higher BiP and collagen content were observed in necropsy cardiac samples from patients who had suffered an MI than in those patients who had died from other causes of other than cardiovascular origin. In addition, a direct association was observed between BiP and collagen levels.

**Conclusions:** The data from the different studies support the role of mitochondrial oxidative stress in the cardiovascular consequences associated with obesity and heart damages induced by MI and the association of both pathologies. Mitochondrial oxidative stress could partly mediate its effects through ER stress activation. In addition, the in vitro study with fibroblasts and VSMC suggests the existence of an interaction between mitochondrial oxidative stress and ER stress, which seems to participate in ECM remodeling that leads to cardiovascular fibrosis development.

The in vitro study with cardiomyocytes suggests the involvement of mitochondrial oxidative stress and ER stress in cell contractility alterations.

The association between ECV and plasma MPO levels of infarcted patients, as well as the association between BiP levels and collagen content in necropsy cardiac samples from patients with MI, supports our findings in the animal model that suggest the involvement of mitochondrial oxidative stress and ER stress in MI-induced cardiac fibrosis.

Taken together, these results show mitochondrial oxidative stress and ER stress as potential therapeutic targets in the different pathological contexts studied, suggesting new therapeutic approaches to prevent/treat cardiovascular disorders associated with obesity and MI.

**Keywords:** Cardiovascular damage. Endoplasmic reticulum stress. Mitochondrial oxidative stress. Myocardial infarction. Obesity.

# INTRODUCCIÓN

## 1. OBESIDAD

### 1.1. *Definición y clasificación*

La obesidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud <sup>(1)</sup>. Es considerada un grave problema de salud pública de etiología multifactorial, que incluye causas de origen genéticas y ambientales <sup>(2)</sup>.

La principal etiología de la obesidad es el ambiente obesogénico determinado por factores importantes como el entorno social, económico y cultural, que favorecen un patrón alimentario no saludable y el sedentarismo. Éstos favorecen, a su vez, un desequilibrio entre el consumo calórico y el gasto energético desencadenando una ganancia significativa del peso corporal debido a un aumento de masa grasa <sup>(3, 4, 5)</sup>.

El indicador antropométrico más empleado para el diagnóstico y clasificación de la obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC). El IMC corresponde a la relación entre el peso expresado en kilos y la altura al cuadrado expresada en metros del individuo. De esta manera, las personas cuyo IMC sea igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> se consideran obesas (Tabla 1). Este simple indicador es utilizado para la clasificación de personas adultas, independientemente del sexo. Sin embargo, para la población en edades de crecimiento y desarrollo, los resultados deben ser clasificados según los percentiles, indicadores específicos de los patrones de crecimiento que tienen en cuenta la edad y el sexo del individuo pudiendo reflejar exceso de peso. El aumento del IMC está relacionado a un mayor riesgo de desarrollar diferentes enfermedades entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares (ECV) y metabólicas <sup>(1, 6, 7)</sup>.

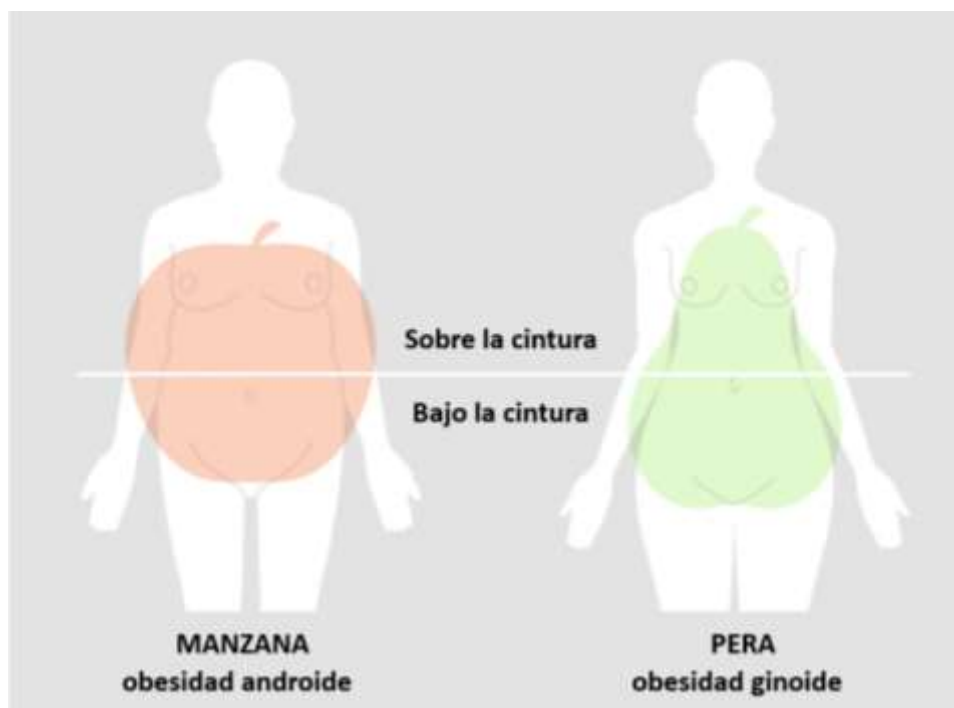
**Tabla 1:** Clasificación del IMC. Fuente: (Organización Mundial de la Salud - OMS) <sup>(8)</sup>, adaptado por el autor.

<b>Clasificación</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>
Normopeso	18.5 – 24.9
Sobrepeso	25 – 29.9
Obesidad grado I	30 – 34.9
Obesidad grado II	35 – 39.9
Obesidad grado III	Más de 40

El IMC, a pesar de ser el indicador antropométrico más utilizado, presenta algunas limitaciones ya que no permite distinguir entre la cantidad de los componentes grasos y la masa libre de grasa, además de no ser capaz de identificar la distribución de la grasa corporal. Dichas limitaciones pueden conllevar a una clasificación errónea de personas con una alta proporción de masa muscular y ser definidas como personas con sobrepeso u obesidad. Además, algunos factores como la edad, el sexo, el estado de hidratación y el origen étnico pueden afectar al IMC <sup>(9)</sup>. En este sentido, se recomienda utilizar el IMC junto a otros indicadores antropométricos adicionales como la circunferencia de la cintura y el índice cintura-cadera <sup>(10)</sup>.

La circunferencia de la cintura es un método simple y económico ampliamente utilizado para la estimación de la grasa abdominal. Se ha correlacionado la circunferencia de la cintura con la cantidad de grasa intraabdominal valorada por métodos complejos y precisos como la tomografía computarizada <sup>(11)</sup> y la absorciometría de rayos X de energía dual <sup>(12)</sup> tanto en adultos como en niños. Por otro lado, el índice cintura-cadera es utilizado para determinar el patrón de acumulación de grasa corporal, siendo útil para la clasificación anatómica

de la obesidad tipo androide o ginoide, además de ser un parámetro predictivo del riesgo cardiometabólico <sup>(13, 14)</sup>. La obesidad androide también denominada obesidad central o abdominal se produce cuando hay un exceso de grasa visceral o grasa intraabdominal entre los órganos internos que resulta en una protrusión del abdomen, presentando un perfil similar al de una manzana (Figura 1). Esta obesidad está ampliamente asociada a ECVs y metabólicas, como el infarto de miocardio (IM) y la diabetes mellitus tipo II. En la obesidad ginoide o periférica, el acumulo de grasa ocurre básicamente en la región de la cadera y en los muslos, presentando un perfil corporal similar al de una pera (Figura 1). Este tipo de distribución de la grasa se relaciona principalmente con problemas circulatorios como disminución del retorno venoso y aparición de varices en las extremidades inferiores. Del mismo modo, el acumulo excesivo de grasa también puede estar distribuido de manera difusa, sin predominancia en una zona específica del cuerpo, siendo en este caso la obesidad clasificada como obesidad de distribución homogénea o difusa <sup>(15, 16)</sup>.



**Figura 1: Tipo de obesidad según el criterio de acumulación de la grasa anatómicamente.** Fuente: (González H, 2016) <sup>(4)</sup>, adaptado por el autor.

Otros indicadores antropométricos han sido propuestos para clasificar la obesidad de manera cuantitativa, reflejando la distribución de la adiposidad corporal. Entre los índices antropométricos ampliamente utilizados se incluyen el índice de adiposidad corporal, que refleja el porcentaje de grasa corporal a partir de la altura y circunferencia de la cadera <sup>(17)</sup> y el índice de conicidad, que clasifica la adiposidad abdominal usando variables como el peso corporal, la altura y la circunferencia de la cintura <sup>(18, 19)</sup>.

### 1.2. Prevalencia de la obesidad

Los datos epidemiológicos indican que la presencia de obesidad en la población mundial ha incrementado drásticamente, ya que su prevalencia se ha triplicado en las últimas cuatro décadas llegando a haber más de 680 millones de personas con obesidad a nivel mundial <sup>(1)</sup>. Para 2030, se prevé que 1 de cada 5 mujeres y 1 de cada 7 hombres desarrollarán obesidad (IMC  $\geq 30\text{kg/m}^2$ ), lo que equivale a más de 1000 millones de personas obesas en el mundo <sup>(20)</sup>.

En España, la prevalencia de la obesidad en personas en edades comprendidas entre 20 y 65 años, también aumentó del 14,5% al 21,6% del año 2000 al 2015 <sup>(21, 22)</sup>. Los datos más recientes de la Encuesta Europea de Salud en España del año 2020 <sup>(23)</sup> muestran prevalencias alarmantes tanto de sobrepeso: 37,6% (44,9% en hombres; 30,6% en mujeres) como de obesidad: 16,0% (16,5% en hombres; 15,5% en mujeres).

Debido al incremento de obesidad en la población mundial y a sus complicaciones, esta patología se ha convertido en un grave problema de salud pública y una gran amenaza a la salud de la población de casi todos los continentes del mundo. En las últimas 4 décadas también se ha observado un incremento sostenido de la morbimortalidad, alcanzando 2,8 millones de fallecimientos al año, por patologías asociadas a la obesidad como son la diabetes, la hipertensión, la enfermedad cerebrovascular, la depresión y/o el

cáncer <sup>(1, 24)</sup>. Este aumento en la mortalidad es proporcional al incremento del IMC, y al número de comorbilidades asociadas a la obesidad <sup>(5)</sup>.

Según la OMS, las ECV son la principal causa de muerte en el mundo, con una tasa de 17,9 millones de muertes por año. Debido a su compleja fisiopatología y a sus efectos deletéreos, la obesidad es considerada un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ECV y se asocia con una alta tasa de mortalidad <sup>(25, 26, 27, 28)</sup>.

### 1.3. *Tejido adiposo como un órgano endocrino*

El tejido adiposo es un importante órgano endocrino con múltiples funciones metabólicas. Estas funciones están mediadas por diferentes sustancias de diversa naturaleza, denominadas adipocinas. El aumento de tejido adiposo que ocurre en la obesidad genera modificaciones estructurales y funcionales en las células del tejido adiposo representando un factor crítico para la aparición de comorbilidades. Este aumento de tejido adiposo puede ser consecuencia de procesos de hiperplasia y/o hipertrofia de las células adiposas.

La hiperplasia es el término utilizado para describir el aumento de grasa como resultado del aumento del número de los adipocitos a partir de una célula precursora (preadipocito) hasta un adipocito maduro. Muchos factores regulan esta proliferación como la exposición a una dieta alta en grasa <sup>(29)</sup>. El crecimiento hiperplásico ocurre en etapas tempranas del desarrollo del tejido adiposo debido a que en estas etapas de la vida los adipocitos alcanzan su tamaño crítico frente al acumulo de lípidos, por lo tanto, es considerado un proceso exclusivo de niños y adolescentes <sup>(30, 31)</sup>. Una vez alcanzado su tamaño crítico, se estimula la adipogénesis para la formación de nuevas células adiposas con objeto de seguir con su capacidad de almacenamiento de grasa <sup>(29)</sup>. Este proceso resulta en un incremento del número de adipocitos, sin conllevar necesariamente un aumento en el tamaño celular, generando hiperplasia adipocitaria.

Independientemente del aumento en el número de adipocitos, un acumulo excesivo de grasa puede conllevar a un aumento en el tamaño celular generando hipertrofia adipocitaria. Este aumento del área de los adipocitos genera un ambiente inflamatorio <sup>(32, 33)</sup>, una vascularización y suministro de oxígeno reducidos <sup>(34, 35)</sup> y cambios importantes en el perfil secretor de las adipocinas <sup>(36, 37)</sup> que se relaciona con la obesidad central y, por lo tanto, con complicaciones metabólicas <sup>(38)</sup>. Dicha modificación del perfil secretor de adipocinas favorece la disminución de la sensibilidad a la insulina y genera un ambiente inflamatorio producido principalmente por monocitos y macrófagos <sup>(32, 33)</sup>.

Debido a todo ello, en las últimas décadas, el tejido adiposo ya no se considera únicamente un depósito de energía, sino que actualmente es considerado un tejido metabólicamente activo complejo con función endocrina, es decir, con capacidad de secretar diferentes adipocinas que intervienen en la regulación de la ingesta de alimentos, del metabolismo de la glucosa y de lípidos, la termogénesis, la inmunidad, funciones neuroendocrinas y cardiovasculares, entre otras <sup>(39)</sup>.

Hay más de 50 tipos de adipocinas identificadas. Muchas de estas moléculas juegan un papel importante en el riesgo cardiovascular, incluyendo:

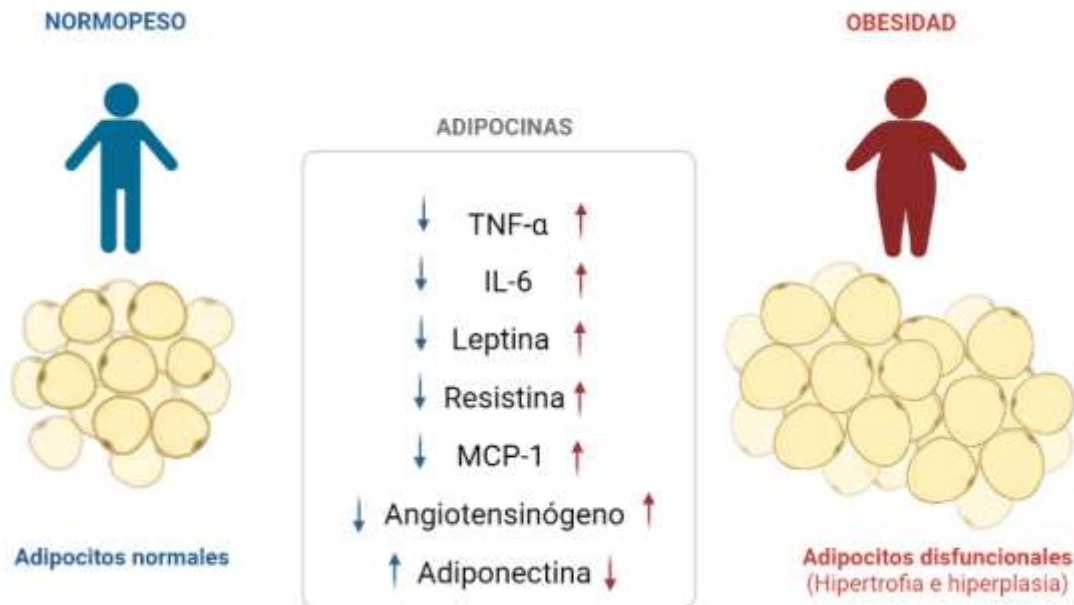
- Factores moduladores de la inflamación: adipocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral-Alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-6 (IL-6) o la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) <sup>(40, 41, 42, 43)</sup>, entre otros. Sin embargo, los adipocitos también son capaces de producir adipocinas que tienen efectos antiinflamatorios y por ello son consideradas moléculas cardioprotectoras, como es el caso de la adiponectina que además de sus propiedades antiinflamatorias, participa en la regulación del metabolismo y genera efectos antiapoptóticos <sup>(44, 45, 46)</sup>.
- Factores moduladores del balance energético: entre otros cabe destacar la leptina, que participa en el control de la ingesta de alimentos y, por tanto,

del balance energético, además de ejercer acciones prooxidantes y profibróticas a nivel cardiovascular <sup>(47, 48)</sup>.

- Factores implicados en el metabolismo glucémico: en este sentido, es importante mencionar la resistina <sup>(49, 50)</sup>, un polipéptido secretado por los macrófagos residentes en el tejido adiposo. Sus niveles están aumentados en la obesidad e involucrados en el desarrollo de la resistencia a la acción de la insulina además de jugar un papel regulador en la respuesta inflamatoria <sup>(51, 52)</sup>.
- Factores vasoactivos como la Angiotensina II (Ang II) que juega un papel importante en la regulación de la presión arterial. Además, la Ang II ejerce efectos proinflamatorios, prooxidantes y profibróticos a nivel cardiovascular <sup>(53, 54, 55)</sup>.

En relación a las modificaciones del perfil secretor de adipocinas en el contexto de obesidad se ha visto un aumento en el ratio leptina/adiponectina, como consecuencia de una secreción aumentada de leptina acompañada de una secreción disminuida de adiponectina. Es por ello que este perfil secretor modificado en la obesidad podría explicar, en parte, algunas complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad, como la resistencia a la acción de la insulina, así como el estado inflamatorio <sup>(56, 57, 58)</sup>. Por lo tanto, la hiperleptinemia representa un importante factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares <sup>(48, 59, 60, 61)</sup>.

Además de las modificaciones del perfil secretor de múltiples adipocinas, cuando se supera la capacidad de almacenaje de grasa por parte de los adipocitos, los triglicéridos se depositan ectópicamente en diferentes tejidos generando lipotoxicidad que favorece la aparición de alteraciones en el metabolismo glucídico <sup>(62, 63, 64)</sup>. Por lo tanto, la expansión masiva y el remodelado del tejido adiposo durante la obesidad afectan a la homeostasis de diferentes sistemas fisiológicos, entre ellos el sistema cardiovascular.



**Figura 2: Representación esquemática del tejido adiposo como órgano endocrino.**  
 Fuente: (Rada CR y col., 2021) <sup>(65)</sup>, adaptado por el autor.

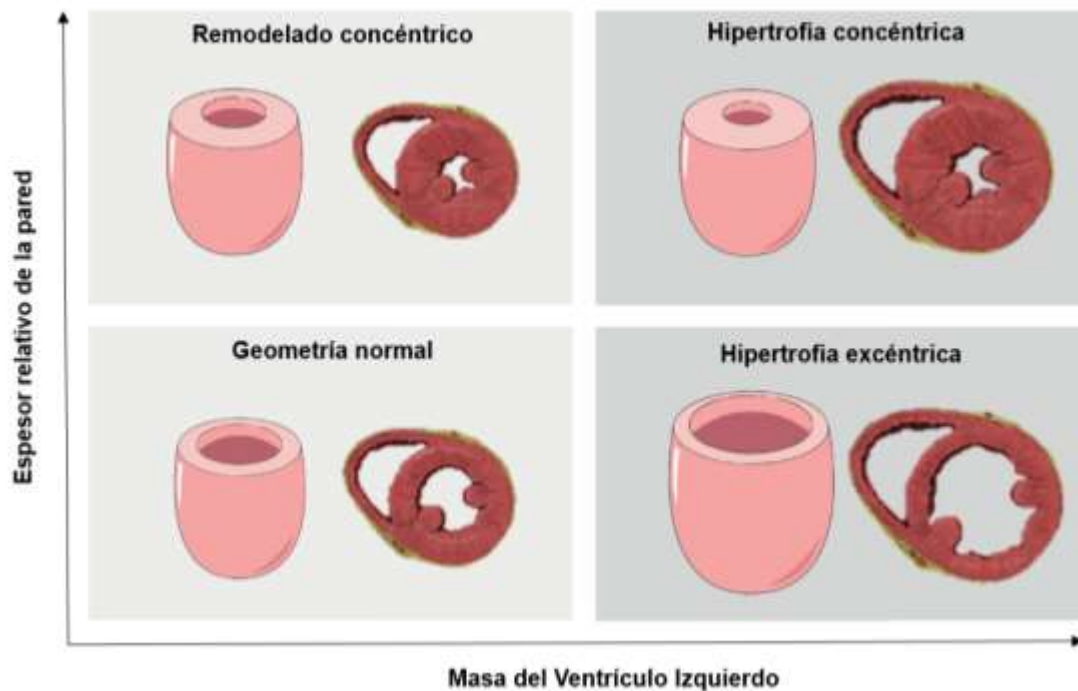
#### 1.4. Consecuencias cardiovasculares de la obesidad

La expansión del tejido adiposo determina una mayor demanda metabólica. Para atender a esta necesidad, el organismo del individuo obeso desarrolla múltiples adaptaciones como el aumento de la volemia, la hiperactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y/o un aumento de la actividad simpática, entre otros procesos. Estos mecanismos adaptativos resultan en un aumento de la frecuencia cardíaca, del volumen sistólico y, por lo tanto, del gasto cardíaco <sup>(66, 67)</sup>. La exposición permanente del corazón a esta sobrecarga hemodinámica favorece la hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI) pudiendo generar un remodelado cardíaco y el deterioro de la función cardíaca <sup>(66, 68)</sup>.

El remodelado cardíaco es definido como alteraciones en el tamaño, la forma o la estructura de una o más cavidades cardíacas <sup>(68)</sup>. Una producción excesiva de componentes de la MEC, especialmente de colágeno por parte

de los fibroblastos residentes en el miocardio, favorece el desarrollo de fibrosis. Este proceso puede conducir a la alteración de la estructura cardíaca aumentando su rigidez y, pudiendo deteriorar la función sistólica y/o diastólica en la obesidad <sup>(69)</sup>, que se si mantiene en el tiempo puede progresar al desarrollo de insuficiencia cardíaca <sup>(70)</sup>.

El remodelado cardíaco puede ser clasificado como remodelado concéntrico, hipertrofia concéntrica o hipertrofia excéntrica (Figura 3). El remodelado concéntrico se caracteriza por un aumento del grosor de la pared del VI que se acompaña con una disminución de la luz de la cámara ventricular izquierda sin cambios en la masa del ventrículo. Un aumento de la masa del corazón define la presencia de hipertrofia <sup>(71, 72)</sup>. Si la hipertrofia ventricular se acompaña de un aumento de la pared del VI determina la hipertrofia concéntrica, mientras que si no se produce un aumento del grosor de la pared se produce hipertrofia excéntrica. En este sentido se ha observado que individuos obesos muestran un aumento en la masa del VI <sup>(68, 73)</sup>, junto con un aumento del grosor de la pared y una disminución del volumen de la cámara ventricular, en consecuencia, presentan un patrón geométrico de hipertrofia concéntrica <sup>(74)</sup> que se asocia con un elevado riesgo cardiovascular y la aparición de eventos isquémicos <sup>(75)</sup>. Estas alteraciones en la estructura del VI pueden ser consecuencia de diferentes factores neurohormonales, metabólicos <sup>(76)</sup> y hemodinámicos que, a su vez, puede conllevar a modificaciones en la función cardíaca, tanto sistólica como diastólica.



**Figura 3: Representación esquemática de los diferentes patrones de geometría ventricular.** Fuente: (Nauta JF y col., 2020; Vakili BA, Okin PM y Devereux RB, 2001) <sup>(77, 78)</sup>, adaptado por el autor.

Además de los cambios estructurales, la presencia de obesidad predispone a la aparición de cambios funcionales a nivel cardíaco. Según la Asociación Europea de Imagen Cardiovascular, la disfunción sistólica se caracteriza por una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida. La FEVI se expresa en porcentaje e indica el porcentaje de la sangre expulsada en la sístole ventricular frente a la acumulada al final de la diástole en el VI. Los valores de referencia mínimos para considerar la FEVI normal han ido variando. La Asociación Europea de Imagen Cardiovascular establece una FEVI normal cuando es  $\geq 52\%$  para varones y  $\geq 54\%$  para mujeres <sup>(79)</sup>. Debido a la complejidad de los estudios ecocardiográficos y las dificultades para su interpretación, además de las variaciones relacionadas con el sexo, edad y etnia <sup>(80)</sup>, la guía del año 2021 para el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca de la Sociedad Europea de Cardiología establece una

FEVI > 50% como un valor de corte para determinar la presencia de disfunción sistólica <sup>(81)</sup>.

La disfunción diastólica del VI se define por una relajación alterada del miocardio debido al aumento de la rigidez de la cámara ventricular izquierda, incapacitando el llenado normal del VI sin necesidad de conllevar un aumento anormal en la presión diastólica final del VI <sup>(82, 83)</sup>. Las alteraciones en la función diastólica del VI se valoran mediante ecocardiografía con Doppler tisular que permite medir el flujo sanguíneo en la válvula mitral tanto durante la diástole auricular, representado por la onda de llenado pasivo E (onda E), como en la sístole auricular, representado por la onda de llenado activo (onda A). Debido a que el llenado ventricular se produce fundamentalmente de manera pasiva, es decir, sin contracción auricular, el patrón de llenado del VI en un corazón normal es caracterizado por la presencia de una onda E predominante con aceleración rápida y por la presencia de una onda A menos predominante, debido al menor volumen de sangre que entra en la aurícula tras la fase de llenado pasivo <sup>(84, 85)</sup>. Por lo tanto, la relación E/A es un parámetro ampliamente utilizado en la práctica clínica para diagnosticar la disfunción diastólica, siendo clasificada como normal cuando los valores del ratio E/A están entre 0.8 y 2 <sup>(85)</sup>.

En el contexto de la obesidad, diferentes estudios muestran que los pacientes obesos presentan una reducción de la relación E/A, que se asocia inversamente con el IMC <sup>(86, 87)</sup>. Además, se ha descrito que la reducción de la relación E/A observada en niños y adultos obesos mejoró después de someterse a una cirugía bariátrica, confirmando el impacto negativo del exceso de grasa corporal sobre la función diastólica <sup>(88, 89)</sup>.

Los vasos sanguíneos, al igual que el corazón, sufren un proceso de remodelado frente al estrés mecánico y hemodinámico asociados a la obesidad. Este remodelado vascular es un proceso activo que puede implicar alteraciones celulares como la hipertrofia y la proliferación de las células, la migración, la muerte, la organización del citoesqueleto y el cambio de fenotipo

celular <sup>(90, 91, 92, 93, 94)</sup>. Al igual que ocurre a nivel cardíaco, los cambios estructurales a nivel vascular también pueden favorecer alteraciones funcionales <sup>(93)</sup> que predisponen a un mayor riesgo cardiovascular.

Las consecuencias vasculares asociadas a la obesidad pueden afectar a las diferentes capas vasculares: la capa íntima o endotelial, la capa media y la capa exterior o adventicia.

La capa íntima de los vasos sanguíneos está formada por células endoteliales ancladas a una lámina basal, que recubren la pared luminal de las arterias, de los capilares y de las venas<sup>(95)</sup>. El endotelio tiene un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis vascular a través de la síntesis y la liberación de diferentes sustancias vasoactivas (vasodilatadoras/antitrombóticas y vasoconstrictoras/protrombóticas) <sup>(96, 97)</sup> regulando la presión arterial y el flujo sanguíneo local. Además de la regulación del tono vascular, estas sustancias derivadas del endotelio pueden participar en procesos importantes como la coagulación, la fibrinólisis y las reacciones inflamatorias e inmunológicas; la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) <sup>(98, 99)</sup>. Una de las consecuencias de la obesidad a nivel vascular es la disfunción endotelial, una condición en la cual las células endoteliales que forman la capa íntima adquieren un fenotipo proaterosclerótico <sup>(96)</sup> caracterizado por una biodisponibilidad reducida de óxido nítrico (NO), el principal compuesto regulador de la homeostasis vascular <sup>(100)</sup> y/o por una generación predominante de sustancias vasoconstrictoras, proateroscleróticas, protrombóticas y proinflamatorias <sup>(96)</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2: Factores vasoactivos que regulan el tono vascular.** Fuente: (Martinez-Martinez E y col., 2021) <sup>(101)</sup>, adaptado por el autor.

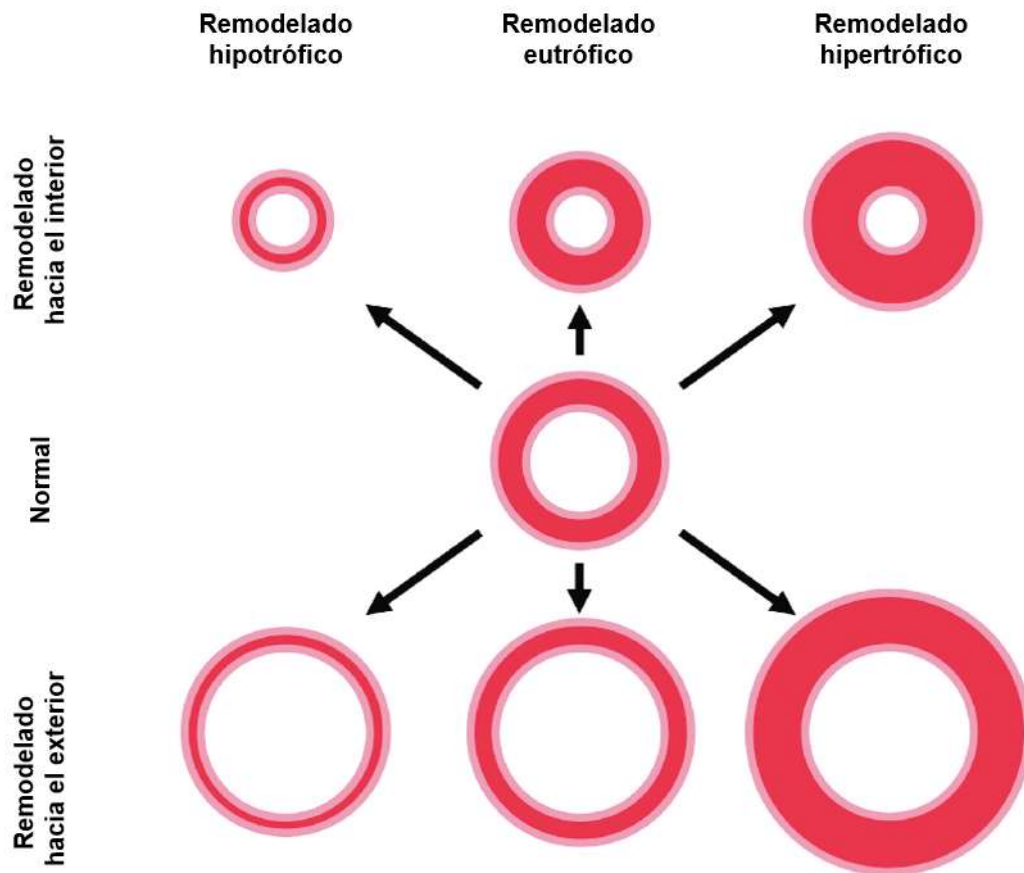
SUBSTANCIAS BIOACTIVAS	EFEECTO
Acetilcolina	Vasodilatador
Óxido Nítrico	Vasodilatador
Bradicinina	Vasodilatador
Prostaciclina	Vasodilatador
Factor Hiperpolarizante del Endotelio	Vasodilatador
Endotelina-1	Vasoconstrictor
Tromboxano A <sub>2</sub>	Vasoconstrictor
Angiotensina II	Vasoconstrictor

Otra estructura vascular que también se puede ver afectada en el contexto de la obesidad es la capa media, que constituye una unidad funcional formada principalmente de células de músculo liso vascular (CMLV) y por elastina que confieren la capacidad de distensibilidad y elasticidad a los vasos, pudiendo expandirse y retraerse durante el ciclo cardíaco <sup>(102)</sup>. Esa estructura vascular puede sufrir modificaciones importantes frente al estrés mecánico y hemodinámico inducidos por la obesidad, resultando principalmente en un engrosamiento de la capa media, como consecuencia del aumento de la deposición excesiva de MEC, proceso conocido como fibrosis vascular. La disminución de elastina, o la desorganización de la misma, en la capa media es otra alteración vascular que conduce a una pérdida de la capacidad elástica de la arteria, favoreciendo la rigidez vascular <sup>(48, 91, 103)</sup>. Estas alteraciones pueden resultar en la disminución de la luz del vaso y consecuentemente del flujo sanguíneo, pudiendo comprometer el aporte sanguíneo a los órganos, incluido el corazón favoreciendo de esta manera la aparición de eventos isquémicos.

La obesidad también puede afectar a la capa adventicia, la capa más externa de la pared vascular que está compuesta principalmente por fibroblastos y que

además incluye los *vasa vasorum* y vasos linfáticos, los nervios, las células progenitoras y células inmunitarias. Además de proporcionar soporte estructural y protección al vaso, las células de la capa adventicia son capaces de detectar y generar respuestas a diferentes estímulos a través de la comunicación entre ellas, así como con las células de los tejidos vecinos. Estas características convierten la adventicia en un compartimento con funciones complejas sobre la regulación de la función vascular <sup>(101, 104)</sup>. En respuesta al estrés hormonal, inflamatorio y ambiental como la hipoxia, las células de la adventicia residentes (fibroblastos, células inmunitarias y células progenitoras) son activadas favoreciendo procesos como el aumento de la proliferación celular, modulación de los componentes de la MEC y la secreción de quimiocinas y citocinas que afectan a otras células de la pared vascular. Por lo tanto, la capa adventicia es capaz de regular la estructura y la función vascular <sup>(104)</sup>.

Las modificaciones en la estructura vascular, como son los cambios en el diámetro de la luz, en el grosor de la pared y en la composición de la pared, reflejan un remodelado vascular. Mulvany y col., describieron los tipos de remodelado vascular y sugirieron una representación gráfica útil para la clasificación de los diferentes tipos de remodelado <sup>(105)</sup> (Figura 4). Según los autores, el remodelado puede ser clasificado como remodelado eutrófico, hipertrófico e hipotrófico. El remodelado eutrófico ocurre cuando los cambios en el diámetro de la pared del vaso sanguíneo no modifican la relación entre el grosor de la pared y su lumen (pared/lumen). En el remodelado hipertrófico hay un aumento del grosor de la túnica media y por ello, el ratio túnica media/lumen está aumentado. El remodelado de tipo hipotrófico es caracterizado por una disminución en el espesor de la túnica media, aumentando por ello el área del lumen y disminuyendo la relación túnica media/lumen. Además, en función del diámetro de la luz del vaso, estos tipos de remodelado se pueden clasificar en remodelado “hacia el interior” cuando la luz del vaso disminuye o en remodelado “hacia el exterior” cuando la luz del vaso aumenta <sup>(105)</sup>.



**Figura 4: Representación esquemática de los tipos de remodelado vascular.** Fuente: (Van Varik BJ y col., 2012) <sup>(106)</sup>, adaptado por el autor.

En general, el remodelado vascular asociado a las enfermedades cardiometabólicas en pequeñas arterias tiende a ser hipertrófico y acompañado de un mayor depósito de MEC <sup>(107, 108)</sup>. El remodelado de las arterias de conducción suele ser caracterizado por un aumento del grosor de la capa media o de las capas íntima-media, que contribuye al engrosamiento de las paredes, aumentando su rigidez y disminuyendo su distensibilidad <sup>(48, 109)</sup>.

Las diferentes y complejas alteraciones cardiovasculares asociadas a la obesidad, tales como la sobrecarga hemodinámica, el aumento de la contractilidad miocárdica, de la frecuencia cardíaca o de la vasoconstricción, entre otros, contribuyen a un desajuste entre la demanda y el aporte de

oxígeno al miocardio (Figura 5). Es por ello que los pacientes obesos tienen un mayor riesgo de sufrir un evento isquémico <sup>(68, 110, 111, 112)</sup>. Esta asociación entre la obesidad y eventos isquémicos fue descrita en diferentes estudios que muestran que pacientes con IMC mayor de 30 kg/m<sup>2</sup> presentaron un mayor riesgo de sufrir un IM en comparación con sujetos normopeso <sup>(113, 114, 115)</sup>. Este hecho se confirma en estudios que han mostrado que la disminución del peso corporal en pacientes obesos y consecuentemente su IMC, disminuye el riesgo de sufrir un IM <sup>(116, 117)</sup>.

La resistencia a la insulina, común en pacientes obesos, favorece además una mala adaptación metabólica cardíaca, caracterizada por una disminución de la oxidación de glucosa como fuente energética y como consecuencia, un aumento de la oxidación de ácidos grasos. Este cambio favorece el acumulo de lípidos en el corazón y en las mitocondrias, generando una lipotoxicidad cardíaca, aumentando el estrés oxidativo y disminuyendo la eficiencia cardíaca <sup>(62, 118)</sup>.

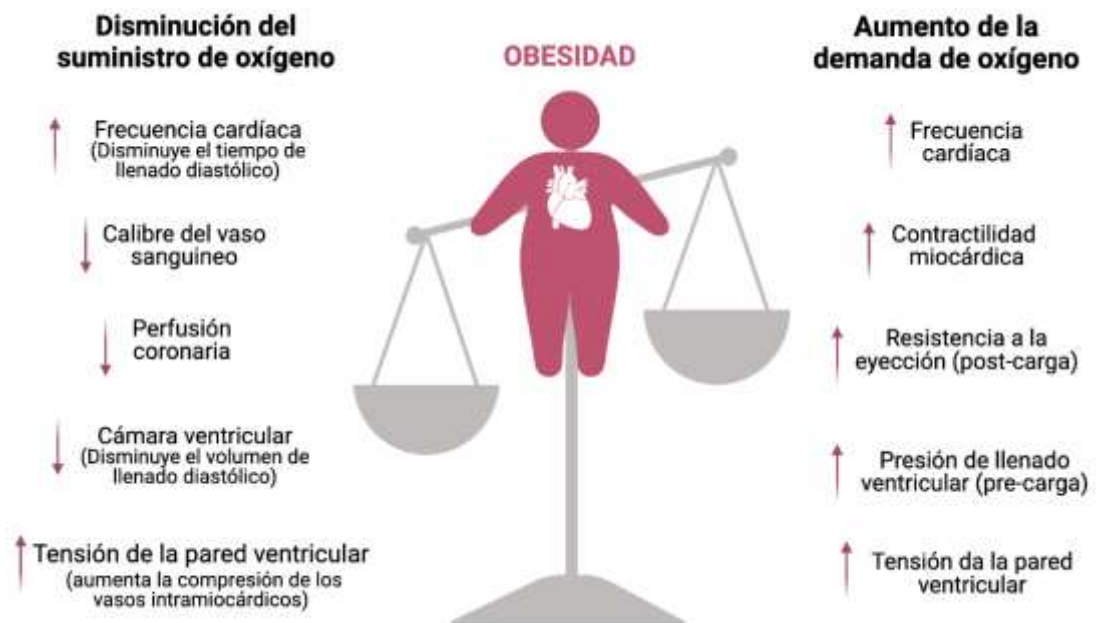


Figura 5: Factores que pueden afectar el suministro y la demanda de oxígeno del miocardio en el contexto de la obesidad.

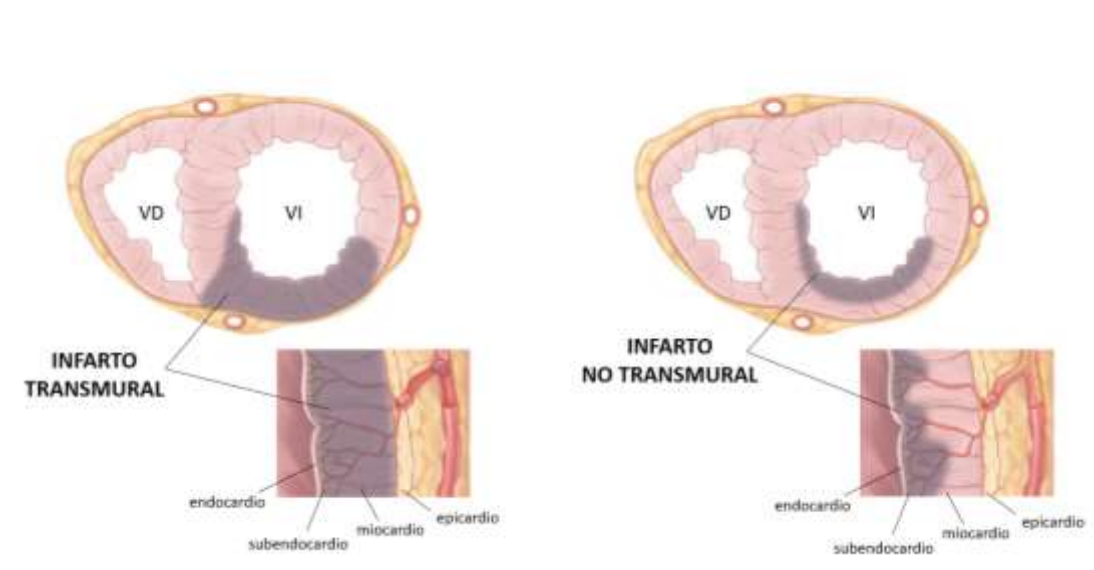
## 2. INFARTO DE MIOCARDIO

### 2.1. *Definición y clasificación*

Según la 4ª definición universal, el IM es una condición patológica definida como la muerte de cardiomiocitos que conlleva a una necrosis celular secundaria debido a una isquemia miocárdica prolongada que genera desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno en el corazón <sup>(119)</sup>.

Para obtener una correcta evaluación del daño miocárdico y realizar un diagnóstico preciso y un tratamiento específico del IM, la Sociedad Europea de Cardiología y la Asociación Estadounidense del Corazón recomiendan técnicas de imagen avanzadas <sup>(120, 121)</sup>. Actualmente la resonancia magnética nuclear cardíaca (RMN) con contraste (Gadolinio) es la técnica más utilizada debido a su elevada sensibilidad y precisión para detectar el IM y delimitar el área de extensión del infarto y su transmuralidad <sup>(122, 123)</sup>.

A partir de la evaluación de la extensión de tejido necrosado es posible clasificar el IM en transmural o no transmural (subendocárdico) (Figura 6). En el caso del infarto transmural, se produce una oclusión coronaria prolongada y/o total que afecta la pared miocárdica por completo. Por otro lado, el IM no transmural o subendocárdico, afecta solamente las capas más internas del tejido cardíaco y suele generar un área de necrosis más pequeña, ya que el tiempo de la oclusión coronaria es corto y la obstrucción arterial es parcial. Los IM del tipo transmurales suelen tener mayores consecuencias cardíacas que los no transmurales, ya que en los IM no transmurales el epicardio no afectado suele conservar su función contráctil. Por lo tanto, pacientes con IM de etiología isquémica pueden presentar realce con gadolinio a nivel transmural o subendocárdico, sin embargo, el infarto subepicárdico es característico de otras etiologías <sup>(124, 125, 126)</sup>.



**Figura 6: Representación de la clasificación del infarto de miocardio en cuanto a la extensión del tejido necrosado.** VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo. Fuente: (OnlineMEEdEd) <sup>(127)</sup>.

Tradicionalmente el diagnóstico de IM estuvo centrado en las alteraciones en la conducción eléctrica observadas mediante estudios electrocardiográficos (ECG). Actualmente, además de los estudios de ECG se utilizan diferentes métodos de diagnóstico y de evaluación del IM como pruebas de imágenes invasivas y no invasivas, la evaluación patológica clínica y análisis bioquímicos llevados a cabo principalmente a través de la evaluación de los niveles circulantes de troponina cardíaca (cTn) <sup>(128, 129)</sup>.

La cTn es un complejo intracelular compuesto por 3 subunidades (I, T y C) que forma parte de la maquinaria contráctil de los miocitos cardíacos <sup>(130)</sup>. En presencia de isquemia miocárdica se produce una elevación de los niveles plasmáticos de cTn secundaria a una degradación de los complejos de cTn y alteración en la permeabilidad de la membrana del cardiomiocito, que conduce a la difusión pasiva de cTn desde la célula al espacio extracelular <sup>(131)</sup>. Este hecho respalda su utilización como un biomarcador específico de valoración de presencia de daño cardíaco en la práctica clínica. Cuando los valores

séricos de cTn superan el límite del percentil 99 en diferentes determinaciones consecutivas, indica la existencia de daño o lesión miocárdica aguda. Además, los valores de cTn también son útiles para clasificar algunos de los diferentes tipos de IM. Según la definición universal más reciente, el IM puede ser clasificado en 5 tipos diferentes según su etiología <sup>(119, 132)</sup> (Figura 7):

- **El infarto de miocardio tipo 1** es una lesión miocárdica relacionada con la enfermedad arterial coronaria aterotrombótica aguda. Ésta es ocasionada por una ruptura de la placa aterosclerótica, lo que reduce o interrumpe el suministro de sangre al miocardio.
- **El infarto de miocardio tipo 2** está relacionado con un desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno del miocardio. Este desequilibrio es producido por la exposición a estímulos estresantes que no están relacionados con la aterotrombosis coronaria aguda.
- **El infarto de miocardio tipo 3** clasifica pacientes que presentan síntomas sugestivos de isquemia miocárdica acompañada de alteraciones en el ECG o fibrilación ventricular, pero mueren antes de que se pueda medir los niveles de los biomarcadores cardíacos o antes de que aumenten en la circulación.
- **El infarto de miocardio tipo 4** está relacionado con una intervención coronaria percutánea y puede estar dividido en tres diferentes subtipos, tipo 4a, 4b y 4c. El tipo 4a presenta un aumento de los valores de cTn 5 veces por encima del límite de referencia del percentil 99, antes de la cirugía. El IM tipo 4b y tipo 4c están asociados a la trombosis de *stent* y a la reestenosis focal o difusa, respectivamente.
- **En el infarto de miocardio tipo 5** el daño cardíaco está asociado con la cirugía de revascularización miocárdica. Para ser clasificado como IM tipo 5 se debe observar un aumento de los niveles de cTn 10 veces superior del percentil 99 antes de la cirugía.

## TIPOS DE INFARTO DE MIOCARDIO

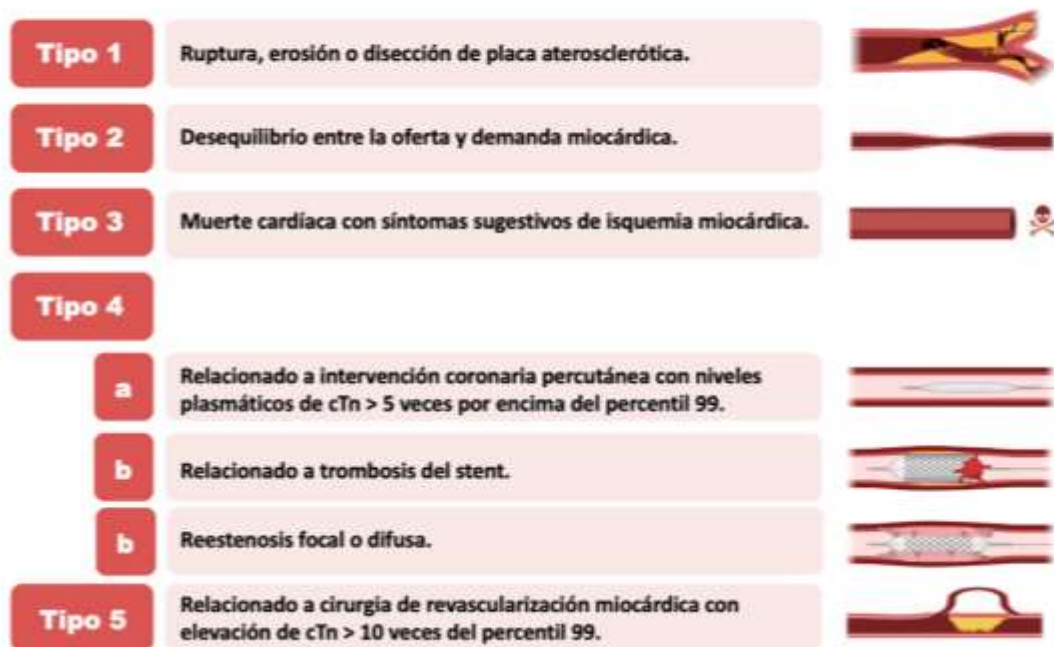


Figura 7: Esquema representativo de los tipos de infarto de miocardio.

Frecuentemente el mecanismo predictivo para el IM es la formación y la ruptura de una placa aterosclerótica coronaria generando la oclusión parcial o total de la arteria, lo que resulta en un síndrome coronario aterotrombótico agudo sin elevación del segmento ST (NSTEMI del inglés, *Non-ST-elevation myocardial infarction*) o con elevación del segmento ST (STEMI del inglés, *ST segment elevation myocardial infarction*) en el ECG, respectivamente <sup>(121)</sup>.

Debido a las manifestaciones clínicas indistinguibles, así como el manejo terapéutico similar, el NSTEMI es comúnmente agrupado con el diagnóstico de angina inestable (sin cambios en los biomarcadores cardíacos) como síndromes coronarios agudos sin cambios en el segmento ST. Sin embargo, pacientes con NSTEMI tienen una mayor sensibilidad a las pruebas de troponina, por lo que, la proporción de pacientes con síndrome coronario agudo con biomarcadores negativos (angina inestable) ha disminuido (menos del 10% de los casos) resultando en un aumento del diagnóstico de IM <sup>(133)</sup>.

Del mismo modo, aproximadamente el 10% de todos los casos de isquemia miocárdica se producen en ausencia de enfermedad coronaria epicárdica <sup>(121)</sup>. Además de la mayor incidencia, el IM tipo I se manifiesta típicamente con los niveles de biomarcadores más elevados que en el caso del IM tipo II. Asimismo, ambos tipos de infarto tiene una tasa de mortalidad similar <sup>(134)</sup>.

En relación con los factores de riesgo para el IM tipo I se ha visto que enfermedades preexistentes como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la hiperlipidemia y la obesidad aumentan el riesgo aterotrombótico. Además, se ha descrito que un estilo de vida poco saludable como poca actividad física y/o consumo de drogas de abuso son importantes factores de riesgo. Los problemas emergentes como la angustia psicológica y menos de seis horas de sueño por noche también contribuyen al desarrollo de cardiopatía isquémica. Los factores de riesgo para el IM tipo II suelen ser más complejos y multifactoriales, ya que su etiología es un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno al tejido cardíaco que puede surgir de cualquier proceso agudo que conduzca a la taquicardia, la hipoxia o la hipotensión sostenidas <sup>(135, 136, 137)</sup>. Además de ser condiciones predictivas para el IM, otros factores de riesgo también conducen a peores pronósticos clínicos y a una elevada mortalidad. En este sentido, el envejecimiento <sup>(138)</sup>, la hiperglucemia y/o la presencia de diabetes <sup>(139, 140)</sup>, una función renal disminuida <sup>(138)</sup> o la presencia de obesidad <sup>(141, 142)</sup> han mostrado una elevada asociación con la aparición de eventos isquémicos. Esta asociación entre obesidad y cardiopatía isquémica puede ser explicada por la existencia de múltiples mecanismos fisiopatológicos en común además de la presencia de otras comorbilidades asociadas a la obesidad <sup>(143)</sup>.

Diversos estudios han mostrado que los pacientes obesos con IM tienen peor pronóstico, principalmente cuando la obesidad está asociada a otras patologías como la diabetes tipo 2, la dislipidemia, la hipertensión y la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, siendo importante priorizar el control intensivo de los factores de riesgo y la reducción de peso corporal <sup>(144)</sup>.

Se ha observado una asociación entre la presencia de IM y la obesidad evaluada por la relación cintura-talla y la circunferencia de la cintura, así como niveles séricos elevados de colesterol total <sup>(145)</sup>. Esta asociación se confirma en otros estudios en los que el 62,4% de los pacientes que sufrieron un IM tenían sobrepeso u obesidad. Del mismo modo, se observó una correlación entre el IMC y las alteraciones estructurales en el VI, indicando que personas obesas con IM tiene un remodelado ventricular más severo caracterizado por la presencia de hipertrofia cardíaca <sup>(146)</sup>. Además, se observó que pacientes obesos con cardiopatía isquémica tienen las funciones contráctiles y de reserva de la aurícula izquierda empeorada en comparación con pacientes normopeso <sup>(147)</sup>. Además de las consecuencia hemodinámicas y metabólicas de la obesidad que favorecen la isquemia miocárdica, se ha descrito que el exceso de adiposidad abdominal, en casos de obesidad grave, puede inducir el IM tipo 2 por compresión de la vena cava <sup>(141)</sup>.

## 2.2. Prevalencia del Infarto de miocardio

El IM tiene un impacto relevante en la salud mundial afectando a más de 7 millones de personas cada año y es responsable de más de un tercio de las muertes anuales en los países desarrollados <sup>(148)</sup>. Entre los pacientes que sufren un IM, el 70% de los eventos fatales se deben a la oclusión por placas ateroscleróticas (IM de tipo 1) <sup>(129)</sup>. Además, el IM responsable por la mayor tasa de mortalidad es predominantemente el que no presenta elevación del segmento ST en los estudios de ECG <sup>(149)</sup>.

En España, el IM es una de las principales causas de muerte <sup>(150)</sup>. Esta situación es consecuencia de la elevada prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares en la población española. Según los datos del año 2021 de la Encuesta de Salud de la Fundación Española del Corazón (ESFEC), el 57,3% de los españoles presentan dos o más factores de riesgo cardiovascular <sup>(151)</sup>.

A pesar de la reducción importante a nivel mundial en la mortalidad por enfermedad coronaria en las últimas décadas como consecuencia de tratamientos farmacológicos más eficaces y la mejora de la rapidez en la respuesta médica, el IM sigue representando un grave problema de salud pública con una incidencia alarmante <sup>(152, 153)</sup>. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE, 2021) <sup>(23)</sup>, las cifras de mortalidad por IM siguen aumentando en España donde en 2020 se observó un aumento del 1,86% en la mortalidad por IM en relación con el año anterior. Las cifras más actuales indican que en el año 2021 hubo más de 13 mil muertes en España por IM. Además de las cifras actuales preocupantes, las proyecciones epidemiológicas también son alarmantes. Se estima un aumento considerable de la incidencia del síndrome coronario agudo y un incremento de la mortalidad por esta enfermedad en España durante las próximas décadas como consecuencia del envejecimiento poblacional <sup>(154, 155)</sup>.

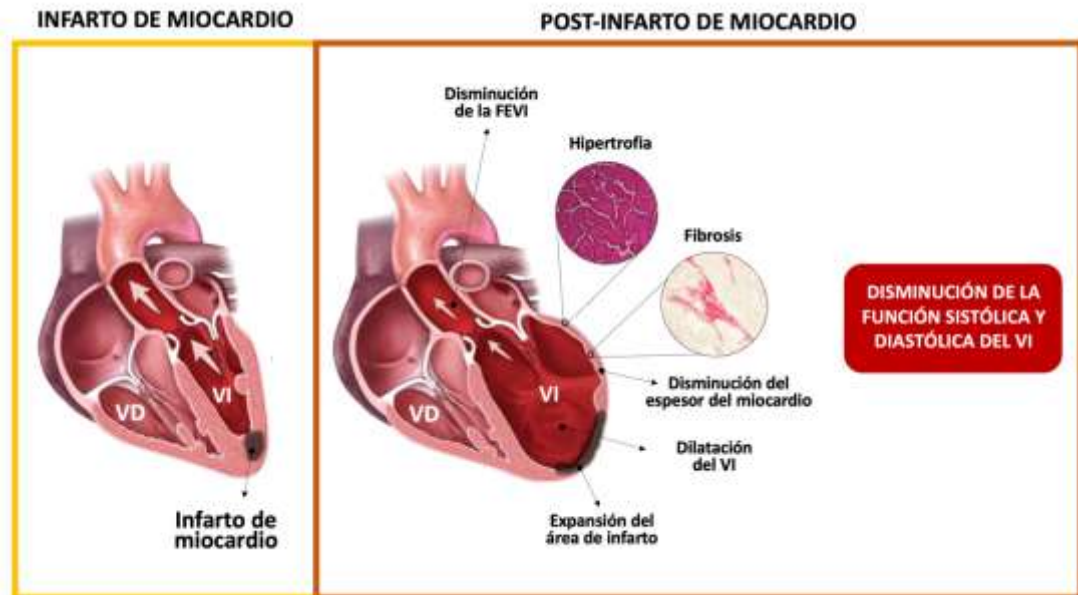
En este contexto es necesario además de un control de los factores de riesgo modificables y de un diagnóstico precoz, alternativas farmacológicas eficaces para prevenir eventos isquémicos y mejorar la morbimortalidad de pacientes con IM. Para ello es importante investigar los diferentes mecanismos que pueden estar implicados en las complicaciones cardíacas asociadas a las ECV.

### 2.3. *Consecuencias cardíacas del Infarto de Miocardio*

La muerte de los cardiomiocitos inducida por la falta de oxígeno durante un IM activa una secuencia de procesos para preservar las células restantes y reemplazar las células muertas, evitando la ruptura de la pared ventricular y el agravamiento del daño cardíaco. En un corazón adulto, la capacidad de regeneración del tejido necrosado es muy limitada por lo que las células muertas son reemplazadas por una cicatriz fibrótica permanente con objeto de intentar preservar la integridad anatómica de los ventrículos. Dicha fibrosis que ocurre en el área de necrosis del miocardio para substituir las células muertas por la isquemia es conocida como fibrosis reparativa <sup>(156, 157, 158)</sup>.

Además de la zona de necrosis, el estrés mecánico, hemodinámico y metabólico post-IM estimula la expansión de la fibrosis en el miocardio remoto, no lesionado, proceso denominado como fibrosis reactiva. Aunque sea un mecanismo adaptativo contra el estrés parietal elevado, la fibrosis reactiva conduce a una alteración de la distensibilidad de la cámara y a un aumento de la rigidez ventricular, lo que compromete la función cardíaca sistólica y diastólica, pudiendo estar asociado a la generación y propagación de arritmias <sup>(159, 160, 161)</sup>. Éstas se pueden producir por la sustitución de células contráctiles por la fibrosis cicatricial que forma un área no excitable aislada en el tejido cardíaco que puede dar lugar también a taquicardia ventricular <sup>(69, 162)</sup>. Además, la red de fibras de colágeno no conductora entre los cardiomiocitos podría promover la taquicardia de reentrada al inducir actividad ectópica focal y al relentecer o bloquear la conducción eléctrica <sup>(163, 164)</sup>. En este contexto, la fibrosis cardíaca se acepta como una condición determinante para el desarrollo de insuficiencia cardíaca <sup>(165)</sup>. Otras consecuencias cardíacas presentes en este contexto patológico que también se asocian a la insuficiencia cardíaca son la hipertrofia miocárdica, desencadenada por la activación de diferentes vías moleculares prohipertroóficas <sup>(166, 167)</sup>, la dilatación del VI y la disminución del espesor del miocardio, que conlleva a un remodelado hipertroífico excéntrico (Figura 3). Además, las alteraciones moleculares tras el IM también pueden conducir a un aumento del área de la lesión miocárdica <sup>(168)</sup> que juntamente a las demás alteraciones podría comprometer a la función cardíaca (Figura 8).

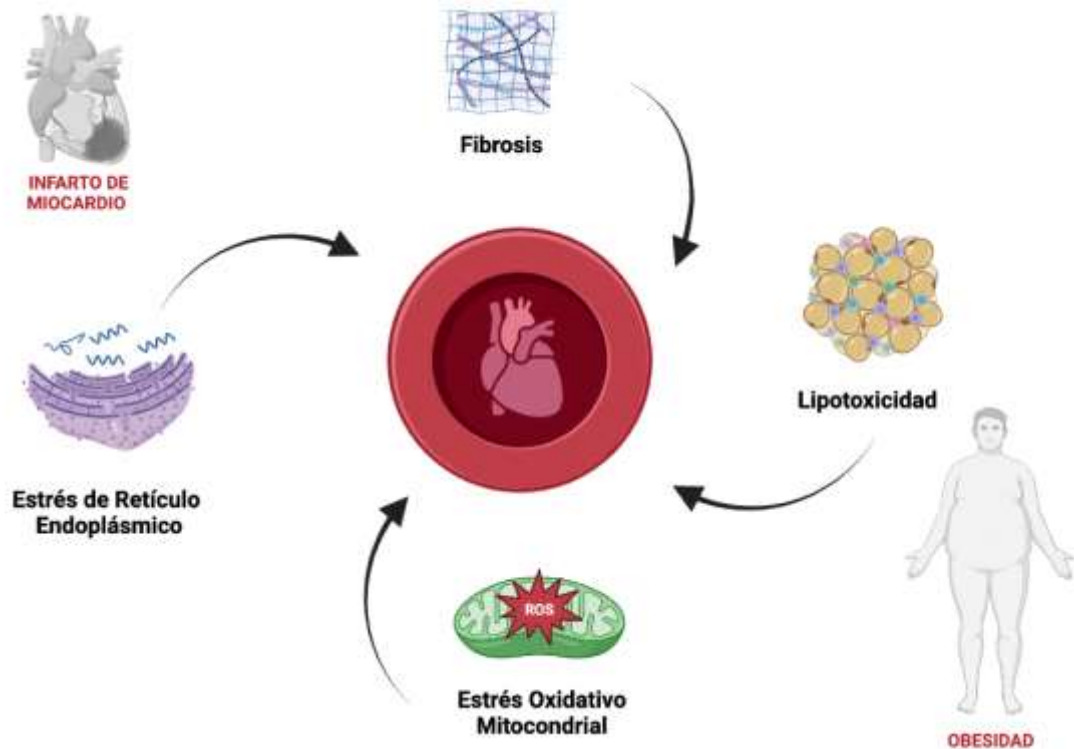
Es importante destacar que en la clínica, los pacientes que sobreviven a un infarto agudo de miocardio pueden presentar alteraciones cardíacas muy diferentes, no siempre dependientes de la extensión de la lesión causada por el IM <sup>(169)</sup>. Además, son múltiples los mecanismos que pueden estar implicados en dichas alteraciones cardíacas.



**Figura 8: Consecuencias cardíacas del IM.** VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo.

### 3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS CONSECUENCIAS CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD Y AL INFARTO DE MIOCARDIO

Debido a la gran complejidad de la fisiopatología tanto de la obesidad como del IM se han propuesto múltiples mecanismos que podrían estar involucrados en el desarrollo de las consecuencias cardiovasculares asociadas a dichas patologías. Entre los mecanismos propuestos cabe destacar el desarrollo de fibrosis, la lipotoxicidad, el estrés del retículo endoplásmico (RE) y el estrés oxidativo mitocondrial (Figura 9).



**Figura 9: Mecanismos implicados en el daño cardiovascular asociado a la obesidad y al infarto de miocardio.**

### 3.1. Fibrosis cardiovascular

Un componente importante de los tejidos lo constituye la MEC cuya función principal es el anclaje de las células, así como la comunicación entre ellas. Además, la MEC participa en la regulación de otros procesos celulares, entre los que se incluyen la proliferación, la migración, la diferenciación o la supervivencia celular con objeto de mantener la homeostasis en el tejido <sup>(170)</sup>.

La MEC está formada por una gran variedad de componentes que, en general, son sintetizados por las propias células presentes en los órganos, sin embargo, también pueden ser producidos por otras células y transportados a través del torrente sanguíneo. Los componentes de la MEC pueden ser clasificados en proteínas estructurales (colágeno y elastina), proteínas de adhesión (fibronectina y laminina), proteoglicanos y glucosaminoglicanos.

Los niveles de los diferentes componentes de MEC dependen del balance entre su síntesis y su degradación. Un aumento de los componentes de la MEC, debido a un aumento de la síntesis y/o una reducción de la degradación de los mismos, favorece el desarrollo de fibrosis. La degradación de los componentes de la MEC es mediada por tres grupos de proteinasas extracelulares, las serino proteasas, las cisteína proteasas y las metaloproteinasas de matriz (MMPs) <sup>(171)</sup>. Las MMPs son el principal grupo de proteasas implicadas en la degradación de la MEC y son producidas por diferentes tipos celulares como fibroblastos, CMLV, células endoteliales y células inflamatorias, entre otras. Son muchos los procesos fisiológicos y patológicos en que las MMPs están involucradas, incluido el desarrollo embrionario, la angiogénesis, la ovulación, la remodelación del tejido óseo, la cicatrización de las heridas, la apoptosis o la remodelación cardiovascular, por mencionar algunos <sup>(172, 173)</sup>.

En el ser humano existe una grande variedad de MMPs que pueden ser clasificadas según la especificidad de su sustrato en cinco grandes grupos. Los grupos de las MMPs y sus principales enzimas son: colagenasas (MMP1, MMP8 e MMP13), gelatinasas (MMP2 e MMP9), estromelinas (MMP3, MMP7, MMP10, MMP11 e MMP26), MMPs de membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 e MMP25) y otras (matrilisinas y metaloelastasas) <sup>(172, 174)</sup>. La actividad de las MMPs está regulada, entre otros factores, por inhibidores tisulares endógenos de las metaloproteinasas (TIMPs), que actúan inhibiendo la actividad de las MMPs participando, por ello, en el equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC. Este control es importante para prevenir la degradación o el acumulo excesivo de los componentes de la MEC y el consiguiente desarrollo de fibrosis <sup>(175)</sup>.

Inicialmente el depósito de componentes de la MEC en los tejidos funciona como un mecanismo de protección, pudiendo ser beneficioso en diferentes procesos, como los de cicatrización de heridas y los de reparación tisular. Sin embargo, los procesos de fibrosis mantenidos en el tiempo se asocian con

alteraciones estructurales que pueden conllevar alteraciones funcionales en los órganos afectados <sup>(176)</sup>. De hecho, la fibrosis es considerada una causa de elevada morbilidad y mortalidad importante <sup>(177)</sup> ya que puede afectar a la mayoría de los órganos, entre los que se incluye el sistema cardiovascular <sup>(178, 179)</sup>.

A nivel cardíaco, se ha observado desarrollo de fibrosis en contextos patológicos como la cardiopatía hipertensiva <sup>(180)</sup>, la diabética <sup>(181)</sup>, la cardiopatía asociada a la obesidad <sup>(182)</sup>, o la isquemia miocárdica, entre otras. A nivel vascular, el desarrollo de fibrosis está presente principalmente en patologías que generan, entre otros procesos, el aumento de la presión arterial, alteraciones hemodinámicas y la disfunción endotelial <sup>(101, 183, 184)</sup>.

El miocardio está formado por diferentes tipos celulares entre los que se incluyen los fibroblastos, de manera mayoritaria, y los miocitos. Los fibroblastos cardíacos son las principales células responsables de la síntesis de proteínas de la MEC, además de secretar diversas citocinas y factores de crecimiento que pueden actuar de forma autocrina y/o paracrina. Asimismo, estas células poseen una gran variedad de receptores que les confiere la función de sensores con capacidad de detectar diferentes estímulos mecánicos y neuroendocrinos <sup>(185, 186, 187)</sup>. En condiciones de daño cardíaco, los fibroblastos se pueden diferenciar a miofibroblastos en respuesta a diferentes estímulos. Estas células tienen características tanto de fibroblastos como de células de músculo liso siendo minoritarias en el miocardio sano. Las características más destacadas de los miofibroblastos son su fenotipo migratorio, la expresión de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), su capacidad contráctil y un extenso RE que les permite sintetizar y secretar grandes cantidades de proteínas de la MEC <sup>(161)</sup>.

En el contexto de la obesidad, diferentes factores funcionan como mediadores de la fibrosis cardiovascular, incluidos los estímulos mecánicos y hemodinámicos, la secreción de diferentes citocinas y adipocinas proinflamatorias, la resistencia a la acción de la insulina y la disfunción

metabólica, la hiperactivación del SRAA, el estrés oxidativo o la activación del estrés del RE, entre otros (47, 48, 181, 188, 189). Estas condiciones estimulan varias vías fibrogénicas que activan y diferencian los fibroblastos cardíacos residentes a miofibroblastos resultando en el desarrollo de fibrosis cardíaca (189).

De manera similar a lo que ocurre con los fibroblastos en el desarrollo de la fibrosis cardíaca, a nivel vascular la fibrosis también es marcada por modificaciones a nivel celular como la proliferación y diferenciación de las CMLV. Además de su función contráctil importante para la regulación del tono vascular, las CMLV también funcionan como sensores para diferentes estímulos mecánicos y moleculares que favorecen el cambio de su fenotipo contráctil a secretor, lo que determina que adquieran una mayor capacidad proliferativa. De este modo, las CMLV asumen un papel importante en la síntesis de componentes de la MEC, en el remodelado y la disfunción vascular asociadas a la obesidad (90, 93, 106, 190).

Como ya se ha mencionado previamente, existen mecanismos que participan en el desarrollo de fibrosis en el contexto de la obesidad. En estudios desarrollados por el grupo de investigación, se ha observado que la leptina podría estimular el desarrollo de fibrosis que conlleva a un remodelado cardiovascular, a través de un aumento de la producción de colágeno tipo I y de los mediadores profibróticos factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y factor de crecimiento transformante-Beta (TGF- $\beta$ ). En este sentido, se demostró que la fibrosis es mediada por un aumento de estrés oxidativo (47, 48). En pacientes con obesidad mórbida, se observó que la leptina era un factor determinante independiente de la disfunción diastólica presente en los pacientes, en la que juega un papel importante la fibrosis difusa (191). Igualmente, estudios del grupo han demostrado la asociación entre la leptina y el SRAA (192). En este sentido, se ha visto que la inhibición farmacológica de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y el uso de un bloqueador del receptor de Ang II fue capaz de prevenir el aumento tanto de los niveles

plasmáticos de TGF- $\beta$  como de la fibrosis perivascular y cardíaca inducida por la obesidad <sup>(193)</sup>.

Al igual que ocurre en la obesidad, diferentes estudios han demostrado que la fibrosis miocárdica se asocia con alteraciones importantes en la estructura y función cardíaca, tanto en pacientes con IM como en animales <sup>(194, 195, 196, 197, 198)</sup>. Además, a mayor extensión de la fibrosis cardíaca se produce una menor supervivencia de pacientes con insuficiencia cardíaca y con otras ECV <sup>(199, 200)</sup>. La fibrosis en el contexto del IM, inicialmente es un proceso adaptativo cuya finalidad es reparar la zona infartada. Sin embargo, también se produce una acumulación de componentes de la MEC de manera difusa en la zona remota del infarto. Esto es debido a que la pérdida de la integridad estructural y los procesos hipóxicos favorece la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos activando tanto la fibrosis reparativa como la difusa <sup>(161)</sup>. Entre los diversos factores profibróticos que estimulan la producción de colágeno en este contexto patológico, cabe destacar nuevamente el TGF- $\beta$ , el CTGF y la Ang II <sup>(201)</sup>. Estos factores no solo aumentan la producción de los componentes de la MEC, sino que también pueden favorecer la fibrosis al reducir la degradación de la MEC, al disminuir la expresión de MMPs y/o aumentar la síntesis de los TIMPs <sup>(202, 203, 204, 205)</sup>.

Se ha observado recientemente que el tratamiento de ratas diabéticas infartadas con el empagliflozina, un inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2i) con efectos hipoglucemiantes, inhibió la vía profibrótica TGF- $\beta$ 1/Smad3 y redujo la fibrosis miocárdica tanto en el área del infarto como en el corazón remoto <sup>(206)</sup>. De manera similar, la inhibición de los receptores de neprilisina y Ang II fue capaz de disminuir el área de infarto y la fibrosis cardíaca inducida por el IM en ratas hipertensas, que fue acompañada de una mejora en la FEVI y de la fracción de acortamiento (FA). Además, el tratamiento con los inhibidores de los receptores de neprilisina y Ang II previno el aumento de la expresión de factores relacionados con la diferenciación de

fibroblastos y con el remodelado cardíaco, como el péptido natriurético tipo B (BNP),  $\alpha$ -SMA, vimentina y colágeno tipo I <sup>(206)</sup>.

### 3.2. *Lipotoxicidad*

La lipotoxicidad es definida como un proceso en el que la acumulación excesiva de lípidos ectópicos y las alteraciones en el metabolismo lipídico producen disfunción celular. Son muchos los efectos nocivos de la lipotoxicidad, incluidos la resistencia a la acción de la insulina, el daño mitocondrial, la disminución de la eficiencia energética celular, la activación del estrés del RE y, en última instancia, la muerte celular <sup>(207)</sup>.

En condiciones fisiológicas, la oxidación de los ácidos grasos proporciona la mayor parte de la energía para el miocardio. No obstante, el corazón también metaboliza otros sustratos energéticos como la glucosa, los aminoácidos y los cuerpos cetónicos. Esta flexibilidad metabólica ayuda a preservar la función contráctil de manera adecuada para el correcto funcionamiento del corazón <sup>(208)</sup>.

La acumulación excesiva de lípidos en el miocardio ocurre cuando la absorción de ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos supera su oxidación, lo que conduce a una mayor disponibilidad de ácidos grasos para las vías metabólicas no oxidativas (formación de ceramidas, la degradación lisosomal y la generación del estrés del RE) y a la acumulación de metabolitos de los ácidos grasos cardiotóxicos <sup>(209)</sup>.

El acumulo excesivo del tejido adiposo y las alteraciones en el metabolismo lipídico como la alteración de la lipólisis, favorecen la acumulación de triglicéridos en forma de gotas lipídicas en muchos tejidos no adiposos, como el miocardio. Clínicamente, en la obesidad, la resistencia a la acción de la insulina es la principal responsable de las alteraciones en el metabolismo energético del corazón, como el aumento en la utilización de los ácidos grasos como sustrato energético <sup>(207)</sup>. Los mecanismos por los que se genera la

resistencia a la acción de la insulina pueden ser múltiples, incluido el antagonismo a su acción por diferentes adipocinas, como el TNF- $\alpha$  y la leptina; inhibición de la captación, el transporte y la fosforilación de la glucosa por el aumento de ácidos grasos libres circulantes (Ciclo de Randle) y la saturación de los receptores de insulina en situaciones de hiperinsulinemia, entre otros <sup>(210, 211, 212, 213)</sup>. En conjunto, la acumulación intracelular de ácidos grasos puede ejercer efectos tóxicos, inducir a cambios estructurales y comprometer la función cardíaca.

Estudios realizados en modelos animales de obesidad sugieren que la resistencia a la acción de la insulina aumenta la disponibilidad plasmática y la captación miocárdica de ácidos grasos, lo que provoca cambios metabólicos hacia una preferencia por la utilización de ácidos grasos. El aumento de la peroxidación lipídica conduce a un aumento en el consumo de oxígeno por el miocardio, lo que puede disminuir la eficiencia cardíaca <sup>(214, 215, 216, 217)</sup>. En pacientes obesos también se ha sugerido que estos cambios metabólicos pueden desempeñar un papel clave en la disminución de la eficiencia cardíaca <sup>(218)</sup>. Asimismo, se ha visto que la mayor disponibilidad de ácidos grasos en el corazón favorece el aumento del estrés oxidativo, la acumulación de intermediarios de ácidos grasos y una mayor producción de ceramidas, la activación del estrés del RE, la disfunción mitocondrial, el aumento de la respuesta inflamatoria, y en última instancia, puede activar vías proapoptóticas en los cardiomiocitos y generar deterioro de la función cardíaca <sup>(62, 217, 219, 220, 221)</sup>.

Diferentes estudios han mostrado el papel que juega la lipotoxicidad en las consecuencias cardiovasculares asociadas a la obesidad. En estudios previos del grupo de investigación se ha observado que ratas obesas presentaron un aumento de gotas lipídicas en el miocardio, acompañado de un aumento en el contenido de triglicéridos totales a nivel mitocondrial. Además, la obesidad modificó el perfil lipídico mitocondrial, aumentando los niveles de ceramidas (componentes de las membranas celulares). Estas especies lipídicas tienen

efectos negativos sobre la señalización de la insulina. De manera interesante, en el estudio se muestra como el remodelado lipídico mitocondrial se asocia con el desarrollo de fibrosis y de hipertrofia ventricular sugiriendo el efecto deletéreo de la lipotoxicidad sobre la estructura cardíaca. Por otro lado, la obesidad se asoció con una disminución de los niveles de cardiolipinas, principales fosfolípidos de las membranas mitocondriales, que juegan un papel importante en la regulación y preservación de la función mitocondrial <sup>(62)</sup>. De manera similar, en cerdos con obesidad inducida por una dieta hipercalórica, se observó un incremento del colesterol oxidado tanto sérico como cardíaco que se asoció con el aumento de la grasa epicárdica y coronaria, con el desarrollo de hipertrofia miocárdica y con la disfunción cardíaca <sup>(222)</sup>. En pacientes obesos se ha descrito una asociación entre el aumento del depósito ectópico de lípidos en el corazón con el aumento de la masa ventricular izquierda y con la disminución de la función sistólica del VI <sup>(223, 224)</sup>. Asimismo, se ha observado que la esteatosis miocárdica no sólo tiene efectos deletéreos a nivel ventricular, sino que se asocia también con la aparición de fibrilación auricular <sup>(225)</sup>.

La lipotoxicidad no sólo favorece las alteraciones cardíacas, sino que también podría generar daños severos en el sistema vascular incluyendo la resistencia a la acción de la insulina, el aumento de la inflamación, del estrés oxidativo y la aparición de disfunción mitocondrial <sup>(226)</sup>. Diferentes estudios muestran que el exceso de lípidos tanto en las CMLV de ratones como en células endoteliales humanas indujo un fenotipo proinflamatorio que podría favorecer el desarrollo de aterosclerosis y la aparición de la resistencia a la acción de la insulina <sup>(227, 228)</sup>. Además, se ha visto que la lipotoxicidad puede modular negativamente la expresión génica de la enzima NO sintasa endotelial (eNOS) y su actividad catalítica, lo que conduce a la disfunción endotelial debido a una reducción en la biodisponibilidad del NO <sup>(208)</sup>.

De manera interesante, se ha visto que la lipotoxicidad cardíaca no es una condición exclusiva de la obesidad. Se ha observado que la acumulación de

lípidos en el corazón también ocurre en otros contextos fisiopatológicos, como la isquemia miocárdica <sup>(229, 230)</sup>. En la isquemia miocárdica hay un aumento de la captación de lípidos exógenos y alteraciones en el metabolismo lipídico que favorecen la acumulación intracelular y ectópica de lípidos. Dicho acumulo puede conducir al depósito de metabolitos lipídicos bioactivos, como las ceramidas que puede causar disfunción celular. Del mismo modo, se ha visto que la acumulación de lípidos en el corazón se correlaciona con la disminución de la función cardíaca en el contexto del IM <sup>(196, 230, 231)</sup>.

En un estudio realizado en ratas infartadas no obesas se ha visto una acumulación de lípidos en el corazón incluso en ausencia de cambios en los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos o cambios en la resistencia a la acción de la insulina. Los datos, por tanto, sugieren que el IM puede inducir el acumulo de lípidos en el corazón y generar la lipotoxicidad cardíaca independientemente del peso corporal <sup>(196)</sup>. De manera similar, en un modelo porcino de isquemia/reperfusión, se ha visto un aumento del depósito de lípidos tanto en el área del infarto como en el miocardio remoto. Dicho aumento fue acompañado de un acumulo de ceramidas en el área infartada, de la respuesta inflamatoria y de la activación del estrés del RE caracterizado por niveles elevados de la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) y de la proteína homóloga de unión al potenciador de CCAAT (CHOP) <sup>(229)</sup>.

Como se ha mencionado previamente, se han descrito diferentes mecanismos que podrían participar en las alteraciones funcionales a nivel cardíaco incluidos el aumento del contenido de lípidos intracelulares en el corazón, la inflamación, la apoptosis, la activación del estrés del RE y el estrés oxidativo, entre otros <sup>(196, 232, 233)</sup>. Estos datos muestran una posible interrelación entre la lipotoxicidad y los diferentes mecanismos que participan en el desarrollo de fibrosis y el consecuente daño cardiovascular.

### 3.3. Estrés del retículo endoplásmico

El RE es un orgánulo presente en las células eucariotas, formado por una red de túbulos ramificados interconectados entre sí a través de un compartimento intraluminal. Este orgánulo es delimitado por una membrana bilipídica que controla el paso de moléculas entre el lumen y el citoplasma celular. Además de sus funciones esenciales de almacenaje y de regulación de la homeostasis del calcio, el RE juega un papel importante en la síntesis, plegamiento y maduración estructural de más de un tercio del proteoma, incluidas casi todas las proteínas de membrana y las que son secretadas <sup>(234, 235)</sup>.

En el lumen del RE los polipéptidos recién sintetizados son plegados en sus formas tridimensionales y sufren modificaciones importantes para garantizar sus conformaciones y funciones específicas a partir de procesos como la glicosilación y la formación de enlaces disulfuro. Estos procesos son llevados a cabo por diferentes enzimas chaperonas, glicosilantes y oxidorreductasas residentes en el RE <sup>(234, 235, 236)</sup>.

A pesar de que el RE es un orgánulo eficiente en el proceso del plegamiento de proteínas en condiciones fisiológicas, cerca de un tercio de todos los polipéptidos que llegan al RE no logran plegarse correctamente <sup>(234)</sup>. Del mismo modo, diferentes contextos patológicos marcados por una síntesis proteica excesiva, alteraciones en la homeostasis del calcio, la sobrecarga lipídica, la hipoxia o el estrés oxidativo, entre otros factores, conducen al acumulo de proteínas mal plegadas en el lumen del RE <sup>(237, 238, 239)</sup>. Este acumulo de proteínas mal plegadas es una condición conocida como estrés del RE, que causa deficiencias de proteínas importantes y como consecuencia, una alteración de las funciones que realizan. Por lo tanto, el estrés del RE puede comprometer la función y la supervivencia celular <sup>(234, 235)</sup>.

En respuestas al estrés del RE, diferentes mecanismos adaptativos son activados con objeto de restaurar la homeostasis del RE, como es el caso de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, de sus siglas en inglés, *Unfolded*

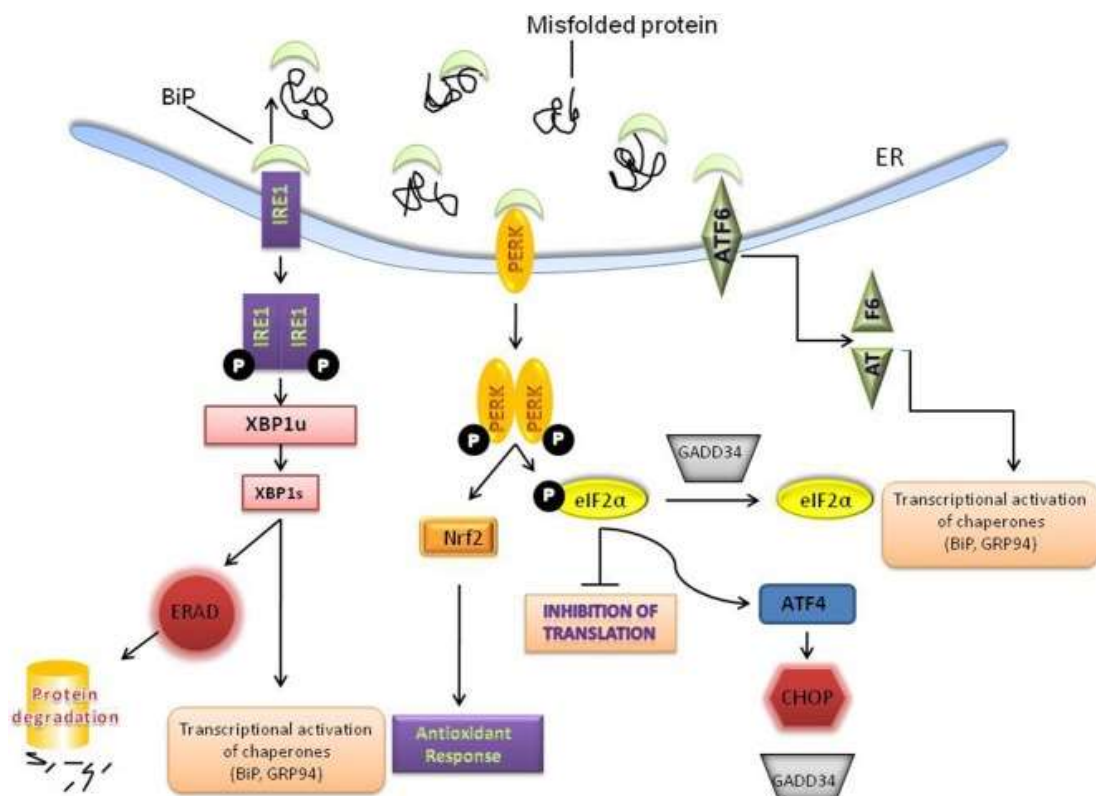
*Protein Response*). La respuesta UPR juega un papel clave en el control del acumulo de proteínas mal plegadas activando diferentes vías de señalización que promueven la disminución de la síntesis de proteínas, induce la expresión de genes que codifican chaperonas y enzimas involucradas en el correcto plegamiento de proteínas. Del mismo modo, la eliminación del exceso de proteínas mal plegadas también puede ser estimulada por el proteasoma a través de la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD, de sus siglas en inglés, *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) o degradación lisosomal <sup>(240, 241, 242)</sup>. Otro mecanismo celular adaptativo que puede ser activado frente el estrés del RE es la reticulofagia, un proceso de remodelación y reciclaje selectivo del RE mediante procesos de autofagia, que reduce el estrés del RE al eliminar el exceso de membrana y de proteínas de RE <sup>(243)</sup>.

La UPR funciona a través de la activación de tres sensores transmembrana del RE: proteína 1 alfa dependiente de inositol (IRE1 $\alpha$ ), proteína cinasa del RNA unida a una cinasa del RE (PERK) y el factor de transcripción activador 6 (ATF6), que en condiciones normales se encuentran inactivos y anclados a la chaperona BiP. Cuando hay un acumulo de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, la chaperona BiP detecta grupos sulfhidrilos o residuos hidrofóbicos libres de cadenas polipeptídicas y sufre un cambio conformacional que permite su unión a la cadena polipeptídica, liberando los sensores de estrés (IRE1 $\alpha$ , PERK y ATF6) para su activación. Es por ello, que un aumento de los niveles de BiP indica la activación de estrés del RE y, por lo tanto, BiP es considerado un marcador de estrés del RE <sup>(240, 244)</sup>.

La disociación de BiP de la membrana del RE hace que la proteína PERK homodimerice y fosforile el factor de iniciación eucariota 2 alfa (eIF2 $\alpha$ ) para inhibir la traducción de proteínas. PERK también regula varios factores de transcripción, incluidos el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf-2) para regular la respuesta antioxidante y el factor de transcripción activador 4 (ATF4), que puede conducir tanto a la señalización protectora como

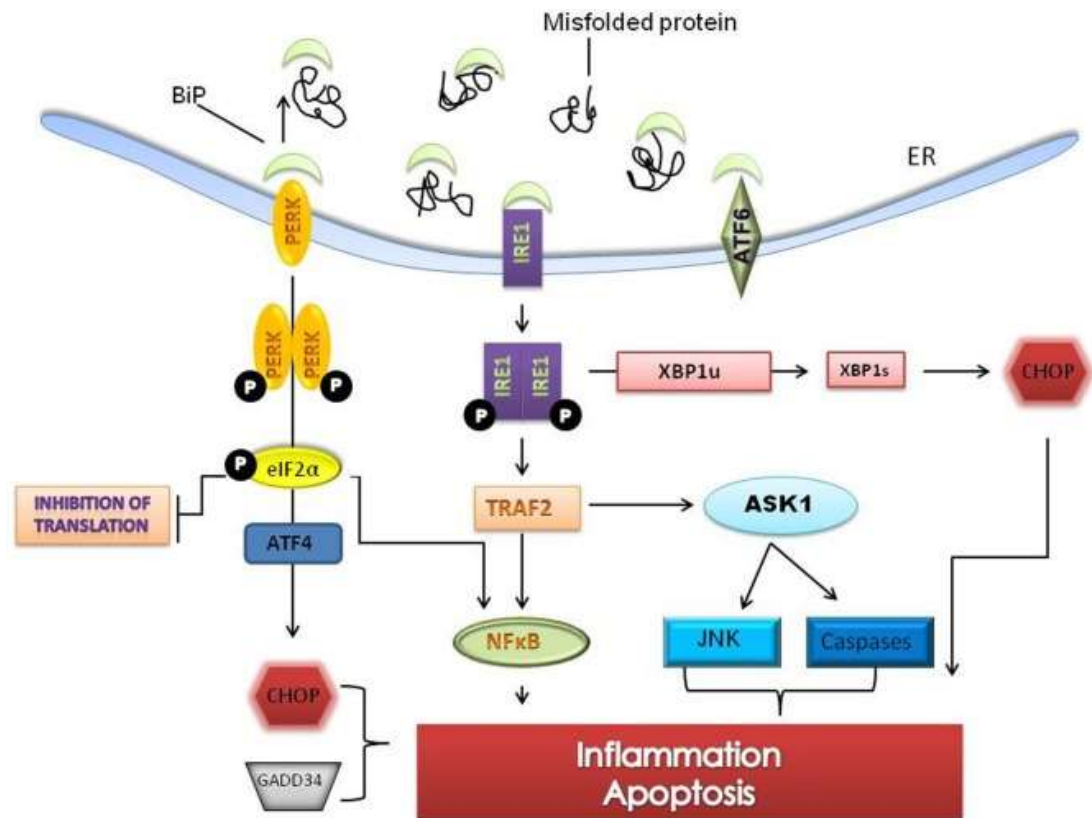
apoptótica. La activación de IRE-1 resulta en modificaciones de la estructura génica de la proteína de unión X-box 1 (XBP-1), que induce la transcripción de varias chaperonas, como el BiP y el GRP94, además de estimular la degradación de proteínas a través de la ERAD. La proteína ATF6 se activa y es modificada con la consiguiente inducción de la transcripción de diferentes chaperonas que forman parte de una respuesta adaptativa protectora que regula el plegamiento de proteínas <sup>(245)</sup> (Figura 10).

Otra proteína residente del RE que juega un papel importante como regulador de la homeostasis de este orgánulo <sup>(246)</sup> y que también puede ser considerada un marcador del estrés de RE es la proteína disulfuro isomerasa A6 (PDIA6). Frente a una situación de estrés de RE, el aumento de PDIA6 atenúa la respuesta UPR al limitar la actividad de IRE1 <sup>(247)</sup>, al catalizar el plegamiento de proteínas mediante la formación y ruptura de puentes disulfuro y al actuar como una chaperona <sup>(248)</sup>.



**Figura 10. Activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).** Fuente: (Brown MK y Naidoo N, 2012) <sup>(245)</sup>.

Una activación prolongada en el tiempo del estrés del RE, en la que la adaptación celular a través de la UPR no es suficiente para impedir el acumulo de proteínas mal plegadas y reestablecer la homeostasis del RE, genera un aumento de las EROs y la activación de vías proinflamatorias y proapoptóticas <sup>(240, 241)</sup>. Las señalizaciones proinflamatorias y proapoptóticas del estrés del RE involucran las vías PERK e IRE1 de la UPR. El complejo IRE1-TRAF2-Quinasa 1 regula la señal de apoptosis (ASK1) que regula, a su vez, las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y las caspasas. Además, la vía IRE1, a través de la modificación de la estructura génica del XBP-1, puede activar la proteína CHOP que actúa como un factor de transcripción proapoptótico. La señalización de PERK, a través de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , puede activar la transcripción de ATF4, lo que resulta en la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) además de aumentar los niveles de CHOP <sup>(245)</sup> (Figura 11). En consecuencia, el aumento en los niveles de CHOP se asocia no sólo con la activación del estrés del RE, sino que también podría asociarse con daño tisular <sup>(245, 249)</sup>.



**Figura 11. El estrés del RE sostenido conduce a la señalización proapoptótica y a la muerte celular.** Fuente: (Brown MK y Naidoo N, 2012) <sup>(245)</sup>.

En el contexto de las ECV, se ha visto que la activación del estrés del RE induce la inflamación, el estrés oxidativo, la apoptosis y la interrupción de la comunicación del RE con otros orgánulos, tanto en cardiomiocitos como en células endoteliales. Estas consecuencias de la activación del estrés del RE pueden favorecer la aparición de los efectos deletéreos de las ECV <sup>(250)</sup>. Se ha demostrado que el estrés del RE juega un papel clave en el remodelado cardiovascular asociado a diferentes ECV, como la diabetes <sup>(251, 252)</sup>, la hipertensión arterial <sup>(253, 254)</sup>, la obesidad <sup>(255, 256, 257)</sup> y la isquemia miocárdica <sup>(258, 259)</sup>.

La activación del estrés del RE en el contexto de obesidad está asociada a niveles elevados de ácidos grasos libres y la alteración en la disponibilidad de sustratos metabólicos <sup>(260)</sup>, la resistencia a la acción de la insulina, la

activación de vías inflamatorias <sup>(252, 261)</sup> y la acumulación de lípidos en tejidos y células ectópicas <sup>(260)</sup>. En este contexto, la inhibición del estrés del RE con el ácido 4-fenilbutírico (4-PBA) o con el ácido ursodesoxicólico conjugado con taurina (TUDCA) además de reducir la activación de la UPR en el hígado y en el tejido adiposo, mejoró la sensibilidad a la acción de la insulina que estaba alterada en un modelo genético de obesidad en ratones <sup>(262)</sup>. Del mismo modo, la sobreexpresión de chaperonas endógenas como BiP en ratones obesos (*ob/ob*) aumentó la sensibilidad a la acción de la insulina <sup>(263)</sup>. Otro estudio demostró que la activación del estrés del RE inducida por niveles elevados de ácidos grasos saturados conduce a la disfunción de las células beta-pancreáticas al activar las vías PERK e IRE1 de la UPR <sup>(264)</sup>. Estos estudios apoyan la participación del estrés del RE como un mecanismo implicado en la resistencia a la acción de la insulina inducida por la obesidad.

En un modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasa se observó la activación del estrés del RE a nivel cardíaco que se acompañó con el desarrollo de fibrosis auricular y la aparición de arritmias. La inhibición del estrés del RE fue capaz de mejorar estas consecuencias cardíacas asociadas a la obesidad <sup>(265)</sup>. De manera similar, la inhibición del estrés del RE con TUDCA en animales obesos, fue capaz de atenuar el remodelado cardíaco, el deterioro en la función cardíaca y el aumento de la presión arterial sistólica asociada a la obesidad. Además, se observó que la obesidad condujo a alteraciones tanto en las propiedades contráctiles de los cardiomiocitos como del calcio intracelular, que fueron atenuadas por TUDCA <sup>(266)</sup>. Del mismo modo, se ha observado un aumento de los niveles de CHOP en el corazón de cerdos alimentados con una dieta rica en grasa, indicando la activación del estrés del RE que se acompañó con fibrosis miocárdica y un aumento de estrés oxidativo, sugiriendo que esta activación podría estar involucrada en la progresión del daño cardíaco en el contexto de la obesidad <sup>(267)</sup>. Estos estudios sugieren al estrés del RE como un mecanismo importante en las complicaciones cardíacas asociadas a la obesidad.

Con relación a las alteraciones vasculares asociadas a la obesidad, diferentes estudios muestran que el estrés del RE también juega un papel importante. Se ha demostrado que los ácidos grasos saturados pueden activar la vía IRE1 $\alpha$ /XBP-1 del estrés del RE, favoreciendo el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, que se reduce al mejorar el estrés del RE con el uso de la chaperona química 4-PBA <sup>(268)</sup>. Además, la inhibición farmacológica de la vía IRE1 $\alpha$ , redujo el tamaño de la placa aterosclerótica y la inflamación vascular en ratones <sup>(269)</sup>. En CMLV aisladas de ratas tratadas con lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL), se observaron niveles elevados de marcadores de estrés del RE como BiP, PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 y CHOP <sup>(270)</sup>. Otros hallazgos han mostrado que además de la exposición a diferentes tipos de colesterol, el estrés mecánico genera un aumento de la expresión de CHOP en CMLV <sup>(271, 272, 273)</sup>.

De manera interesante, se ha demostrado que el estrés del RE también podría afectar a las células endoteliales y desempeñar un papel importante en el desarrollo de la disfunción endotelial. En un modelo de obesidad inducido por dieta rica en grasa en ratones, tanto la disfunción endotelial como el estrés del RE a nivel aórtico fueron revertidos mediante la administración de TUDCA <sup>(274)</sup>. Diferentes estudios apoyan la relación entre el estrés del RE y la disfunción endotelial, como consecuencia de una disminución de la actividad de eNOS en células endoteliales vasculares. Se observó que ratas alimentadas con dieta rica en grasa presentaban niveles elevados de CHOP y BiP en la aorta torácica además de una disminución de la actividad de eNOS. El tratamiento tanto con un hipoglicemiante como con un inhibidor farmacológico del estrés del RE fue capaz de mejorar los niveles de las proteínas implicadas en la UPR y la actividad de eNOS, lo que resultó en una mayor biodisponibilidad de NO y una mejora de la función vascular <sup>(254, 275)</sup>. Otro estudio ha mostrado que la exposición de células endoteliales aórticas humanas a lipoproteínas ricas en triglicéridos activaba el estrés del RE y aumentaba la expresión de moléculas de adhesión endotelial. Además, los niveles sanguíneos elevados de triglicéridos y ácidos grasos libres activaron

las vías IRE1 y ATF6 en células endoteliales de pacientes sanos sometidos a una infusión intravenosa de lípidos <sup>(276)</sup>. Estos resultados apoyan la participación del estrés del RE en el daño vascular asociado a la obesidad.

Otra patología en la que se ha sugerido la implicación del estrés del RE es el IM. La hipoxia y la falta de nutrientes podrían alterar la homeostasis del RE y activar la UPR <sup>(258, 259)</sup>. Wang MX y col., demostraron que el estrés del RE juega un papel clave en la apoptosis de células miocárdicas y en la disfunción sistólica del VI en ratones infartados <sup>(277)</sup>. Del mismo modo el estrés del RE parece ser un mecanismo implicado en la arritmia ventricular en ratas diabéticas con IM <sup>(278)</sup>.

Existen estudios que también apoyan la participación del estrés del RE como un mediador de los efectos deletéreos de diferentes condiciones patológicas como los niveles elevados de Ang II y la hiperactivación  $\beta$ -adrenérgica, entre otros. En un estudio realizado con ratones infartados se observó que la inhibición de la ECA disminuyó la activación del estrés del RE, redujo el desarrollo de fibrosis cardíaca, disminuyó el tamaño del infarto y la apoptosis <sup>(279)</sup>. De manera similar, el bloqueo de los receptores  $\beta_1$  en el corazón de ratas sometidas a isquemia/reperfusión miocárdica generó diferentes efectos cardioprotectores mediante la atenuación del estrés del RE, como: mejora de la función cardíaca, disminución del tamaño del infarto, reducción de la inflamación y de la apoptosis <sup>(280)</sup>.

Diferentes estudios han demostrado que la isquemia miocárdica tanto aguda como crónica es capaz de estimular la activación de distintas vías de la UPR en el corazón <sup>(281)</sup>. Se ha observado que en la isquemia o la hipoxia prolongada produce la activación de la vía PERK resultando en el aumento de la expresión génica y proteica del factor de transcripción proapoptótico, CHOP <sup>(282, 283)</sup>. El estudio de Miyazaki y col., demostró que la deficiencia de CHOP en ratones sometidos a isquemia/reperfusión generó una reducción del tamaño del infarto, de la respuesta inflamatoria y de la apoptosis <sup>(284)</sup>. Estos datos confirman el papel proapoptótico y proinflamatorio de CHOP, así como

su papel en el daño cardíaco asociado a la lesión por isquemia miocárdica. De acuerdo con estos hallazgos, se ha observado un aumento de la proteína CHOP en pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico <sup>(285, 286)</sup>. Además de CHOP, las vías PERK, IRE1 y ATF6 parecen estar implicadas en las consecuencias cardíacas estructurales y funcionales asociadas a la lesión miocárdica por isquemia/reperfusión en ratas <sup>(287)</sup>.

En conjunto, todos estos trabajos confirman que la UPR es activada bajo diferentes estímulos deletéreos que forman parte de la fisiopatología de varias enfermedades, como la obesidad y el IM. La activación del estrés del RE mantenido en el tiempo conduce a la activación de procesos inflamatorios y apoptóticos que podrían jugar un papel clave en la disfunción del sistema cardiovascular. En este contexto, el estrés del RE es comprendido como una posible diana terapéutica para prevenir/mejorar el daño cardiovascular asociado a la obesidad y al IM.

#### 3.4. *Estrés oxidativo*

El estrés oxidativo es definido como un desequilibrio entre la producción de radicales libres en células y tejidos, y la capacidad de los mismos para eliminar estas moléculas a través de mecanismos antioxidantes endógenos <sup>(288)</sup>. Los principales radicales libres producidos en el organismo son las EROs y ERNs. Las EROs incluyen una gran variedad de moléculas como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y los radicales libres hidroxilos ( $\cdot OH$ ) que son generadas como subproductos del metabolismo mitocondrial, además de la producción por la acción de varias enzimas como la hemooxigenasa-1, la xantina oxidasa y una extensa familia de las NADPH oxidasas (NOX). Del mismo modo, la activación de la respuesta inflamatoria conduce a un ambiente prooxidante, principalmente debido a un aumento de radicales libres <sup>(289, 290)</sup>. Sin embargo, es importante destacar que las mitocondrias constituyen la principal fuente de la producción de EROs <sup>(291, 292)</sup>.

En condiciones fisiológicas los niveles de EROs están regulados por los sistemas antioxidantes. Se ha visto que los niveles bajos de EROs juegan un papel clave en la homeostasis celular, participando en las reacciones de señalización redox implicadas en procesos importantes como la activación/inactivación de proteínas, la regulación de la expresión génica, el crecimiento y la muerte celular <sup>(293, 294, 295)</sup>. A pesar de la importancia de las EROs en procesos fisiológicos, su producción excesiva tiene un impacto negativo sobre los sistemas biológicos, en los que pueden actuar como segundo mensajero en la señalización de vías que afectan a importantes componentes celulares como los lípidos, las proteínas y el ADN, entre otros <sup>(296)</sup>.

Múltiples factores pueden conducir a un aumento excesivo de la producción de las EROs, en la que se puede destacar la dislipidemia, la hiperglucemia, la hipoxia o el estrés mecánico, entre otros. La producción aumentada de las EROs puede jugar un papel clave tanto en la patogénesis de diferentes enfermedades como también puede actuar mediando las consecuencias de estas patologías en los diferentes órganos y sistemas fisiológicos. Diferentes evidencias han asociado al estrés oxidativo con una gran variedad de enfermedades metabólicas y cardiovasculares, como la hipertensión arterial, la diabetes, la obesidad o la isquemia miocárdica, entre otras <sup>(297, 298, 299, 300)</sup>.

A nivel cardíaco, se ha observado que la producción excesiva de las EROs se asocia con el desarrollo de hipertrofia cardíaca en diferentes contextos patológicos como la obesidad y el IM. Se ha descrito que la activación de proteínas G por la Ang II, la bradicinina, la endotelina, así como por la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica puede conducir a la generación de EROs que activan vías de señalización hipertróficas en el miocardio <sup>(301)</sup>. De manera interesante, diferentes estudios muestran que las EROs también pueden inducir directamente la activación de la proteína G <sup>(302)</sup>, por lo tanto, las EROs podrían participar en las complicaciones cardíacas asociadas a diferentes enfermedades tanto por mediar los efectos de sustancias bioactivas como

por su acción directa sobre diferentes vías hipertróficas. Además, se ha sugerido que el estrés oxidativo, a través de la activación de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y su inducción de apoptosis a través de la activación de la vía JNK, también se asocia con el desarrollo de hipertrofia <sup>(303)</sup>. Del mismo modo, se ha sugerido que el aumento de las EROs en cardiomiocitos resultó en un fenotipo hipertrófico y apoptótico <sup>(304)</sup>, que condujo al remodelado y a la disfunción miocárdica en el contexto de la insuficiencia cardíaca <sup>(305)</sup>.

Las EROs también juegan un papel importante en el remodelado de la MEC, a través de la inducción de la proliferación y la diferenciación de fibroblastos cardíacos a miofibroblastos, así como la modificación de la actividad de las MMPs. Dicho remodelado de la MEC conduce al desarrollo de fibrosis y al remodelado cardíaco <sup>(301, 306)</sup>.

En el contexto de la obesidad se observa un aumento del estrés oxidativo que ha sido ampliamente asociado, entre otros factores, debido al aumento de la adiposidad y el remodelado del tejido adiposo que conllevan a la liberación de grandes cantidades de adipocinas con acción proinflamatorias y prooxidantes como el TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la Ang II, entre otras <sup>(307)</sup>.

Varios estudios han relacionado diferentes indicadores de obesidad con el aumento del estrés oxidativo. En un estudio realizado con pacientes clasificados como normopeso, sobrepeso y obesos según el IMC, se observó que la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) se correlacionaba negativamente con los valores del IMC. Además, los pacientes con mayor IMC presentaron resistencia a la acción de la insulina valorada por el índice de resistencia a la acción de la insulina (HOMA-IR) <sup>(308)</sup>, sugiriendo la relación existente entre el estrés oxidativo y el desarrollo de diabetes. De manera similar, niños obesos presentaron menor actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), la isoforma de la enzima SOD ubicada en la matriz mitocondrial, respecto a niños con normopeso <sup>(309)</sup>. En concordancia con estos datos, diversos datos indican que

una reducción del peso corporal genera importantes beneficios entre los que se incluye una reducción del estrés oxidativo. Diferentes estudios muestran una reducción importante del estrés oxidativo en pacientes con obesidad mórbida tras someterse a una cirugía bariátrica <sup>(310, 311)</sup>. Debido a ello, en los últimos años se ha puesto de manifiesto el posible uso de antioxidantes como estrategias terapéuticas <sup>(312)</sup>. En este contexto, se ha visto que el tratamiento de pacientes obesos con el antioxidante resveratrol, fue capaz de reducir los niveles séricos de glucosa e insulina, la dislipidemia y los niveles de marcadores proinflamatorios, mejorar la función mitocondrial y disminuir el área de los adipocitos, entre otros efectos protectores <sup>(313)</sup>.

A nivel vascular, el estrés oxidativo también juega un papel central en el remodelado de la pared vascular como consecuencia de las alteraciones en diferentes procesos celulares. Entre estos procesos celulares se puede destacar el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis que pueden generar un ambiente proinflamatorio, cambios en la liberación de sustancias vasoactivas y una acumulación excesiva de colágeno. Estos cambios vasculares asociados a la obesidad pueden conducir a la rigidez vascular y a la disfunción endotelial, comprometiendo sus funciones <sup>(101)</sup>.

Otro contexto patológico en el que se ha descrito un aumento de radicales libres y una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes es el IM <sup>(314)</sup>. El aumento de las EROs producido como consecuencia de un IM podría desempeñar un papel importante en la progresión del remodelado cardíaco, en el desarrollo de la fibrosis miocárdica y en la disfunción del VI que se produce en este contexto patológico <sup>(315)</sup>. Kinugawa S y col., demostraron que el tratamiento con un antioxidante (dimetilurea) fue capaz de mejorar la hipertrofia y el remodelado excéntrico del VI, resultando en una mejora en la función contráctil del VI en ratones infartados <sup>(315)</sup>.

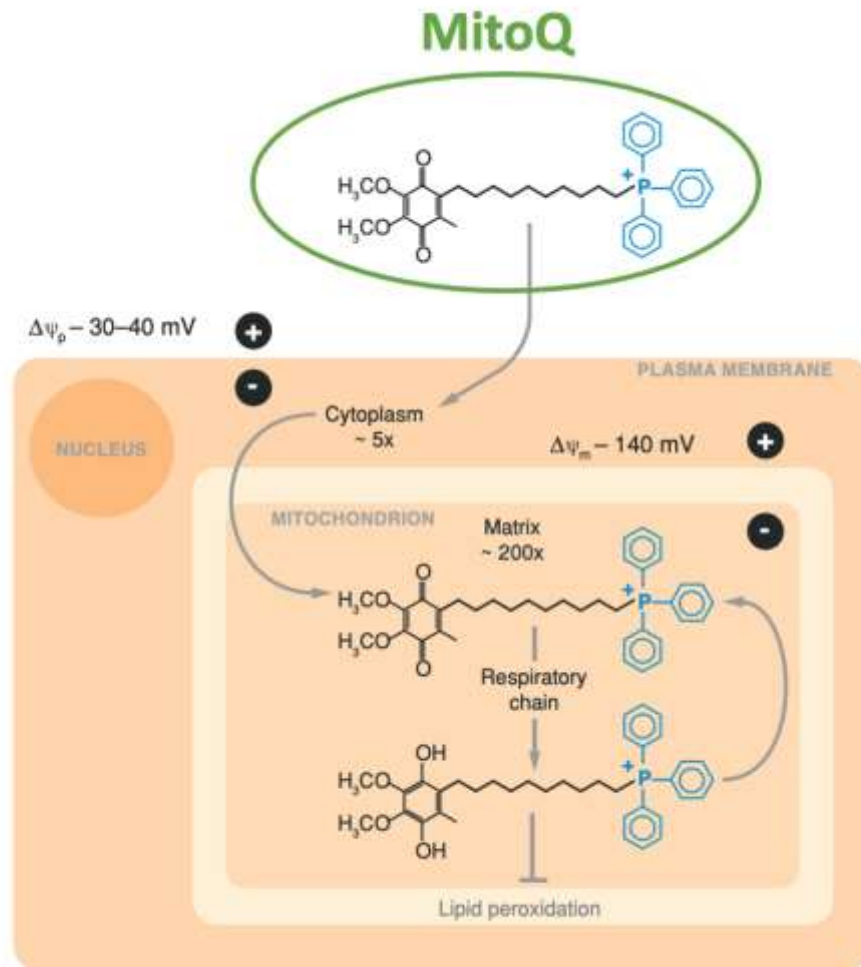
En estudios con animales, tanto en modelos de isquemia/reperfusión como de infarto por ligadura de la arteria coronaria, se observó que el tratamiento con el antioxidante resveratrol disminuyó el tamaño del infarto y la generación de

arritmias y en consecuencia, a una mejora de la función cardíaca <sup>(316, 317, 318, 319)</sup>. Además, el tratamiento con este antioxidante inhibió la agregación plaquetaria, así como el aumento de los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y mejoró la función diastólica en pacientes con IM <sup>(320)</sup>.

Actualmente muchos antioxidantes con buena biodisponibilidad y farmacocinética son usados en ensayos clínicos para tratar diferentes enfermedades, como las ECV <sup>(290, 321, 322, 323)</sup>. Es conocido, que las mitocondrias son la principal fuente de las EROs a nivel celular. Esto es debido a la generación de radicales libres durante el proceso de la fosforilación oxidativa y la respiración celular <sup>(305, 324, 325)</sup>. Las mitocondrias poseen también, un componente antioxidante que forma parte de la cadena respiratoria de electrones localizada dentro de la membrana mitocondrial interna, este componente es conocido como coenzima Q o ubiquinona. Tras recibir los electrones del complejo I y II, la ubiquinona se convierte en su forma reducida, ubiquinol, que actúa como un antioxidante disminuyendo la peroxidación lipídica en la membrana mitocondrial. Estos compuestos son reciclados continuamente manteniendo la capacidad antioxidante mitocondrial <sup>(326, 327)</sup>. En este contexto, se han desarrollado antioxidantes específicos que actúan a nivel mitocondrial como es la mitoquinona (MitoQ) como estrategia terapéutica para reducir el daño oxidativo en las mitocondrias <sup>(328, 329)</sup>. Además, estos antioxidantes pueden ser utilizados como herramientas farmacológicas para investigar el papel del estrés oxidativo de origen mitocondrial en los efectos deletéreos de diferentes patologías, como las consecuencias cardiovasculares asociadas a la obesidad y al IM <sup>(330)</sup>.

Actualmente, el MitoQ es el antioxidante dirigido a las mitocondrias mejor caracterizado. MitoQ está formado por una quinona unida a un catión lipídico trifenílfosfonio (TTP) por un grupo alquilo de 10 carbonos (Figura 12). Esta molécula sufre una modificación estructural en la que se añade el TTP para transformarle en una molécula lipofílica, lo que permite su transporte a través

de la membrana mitocondrial y su acumulación dentro de este orgánulo <sup>(326, 331, 332)</sup>.



**Figura 12. Acumulación de MitoQ en células y mitocondrias.** MitoQ atraviesa la membrana plasmática impulsado por el potencial de membrana plasmática celular ( $\psi_p$ ) y se acumula en el citoplasma. El potencial de membrana mitocondrial ( $\psi_m$ ) impulsa el paso de MitoQ por la membrana mitocondrial. A partir de ahí, el MitoQ se acumula en las mitocondrias, lugar en el que se reduce a ubiquinol y actúa como antioxidante. Fuente: (Murphy MP y Smith RA, 2007) <sup>(326)</sup>.

Se ha demostrado que el uso del MitoQ es capaz de prevenir el remodelado del tejido adiposo y la disfunción metabólica inducida por la obesidad <sup>(333)</sup>. Asimismo, al disminuir la formación de las EROs, MitoQ mejoró la disfunción

mitocondrial y redujo la hipertrofia ventricular derecha en un modelo animal de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión <sup>(334)</sup>. Del mismo modo, el tratamiento con MitoQ en ratones sometidos a una sobrecarga de presión del VI, previno la apoptosis, el remodelado hipertrófico, la fibrosis miocárdica y la disfunción del VI como consecuencia de la mejora en la producción de las EROs, la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) y del TGF- $\beta$  <sup>(335)</sup>.

A nivel vascular también se ha visto que el MitoQ es capaz prevenir la fibrosis aórtica inducida por partículas contaminantes <sup>(336)</sup> y la disfunción endotelial asociada al envejecimiento tanto de ratones <sup>(337)</sup> como de humanos <sup>(29661838)</sup>. La mejora de la función vascular de los pacientes de edad avanzada se acompañó de una menor rigidez arterial y una reducción de los niveles de LDL oxidadas <sup>(338)</sup>. Asimismo, se ha observado que la inhibición del estrés oxidativo mitocondrial a través del tratamiento con MitoQ, es capaz de inducir un aumento de la vascularización a nivel coronario en un modelo animal de obesidad <sup>(339)</sup>. De manera similar, el tratamiento con otro antioxidante mitocondrial, el Mito-Tempo, en un modelo de hipertensión inducido por administración de Ang II, previno la hipertensión arterial, el estrés oxidativo vascular y mejoró la función vascular mediante el aumento de la biodisponibilidad del NO <sup>(340)</sup>.

Diferentes evidencias han sugerido que el estrés oxidativo de origen mitocondrial también parece ser un mecanismo importante en las consecuencias cardíacas asociadas a la isquemia miocárdica. Dare AJ y col., estudiaron el efecto del estrés oxidativo mitocondrial en las alteraciones cardíacas inducidas por la isquemia/reperfusión en un modelo de trasplante de corazón heterotópico murino. Los resultados del estudio mostraron que los corazones mantenidos en una solución que contenía MitoQ presentaron menor producción de las EROs mitocondriales, de marcadores inflamatorios como IL-6 y menores niveles séricos de cTn I después del trasplante <sup>(341)</sup>. Otro estudio mostró que el tratamiento con MitoQ redujo significativamente la

disfunción cardíaca, la apoptosis y el daño mitocondrial después de la isquemia/reperfusión <sup>(342)</sup>.

En conjunto, estas evidencias indican que el aumento del estrés oxidativo y, en particular, el de origen mitocondrial, podría contribuir a la fisiopatología de la obesidad y del IM. Por lo tanto, el estrés oxidativo mitocondrial emerge como una posible diana terapéutica para el tratamiento de las alteraciones cardíacas asociadas a estos contextos patológico.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

El estrés oxidativo mitocondrial y su interacción con el estrés del retículo endoplásmico podría participar en el daño cardiovascular asociado a la obesidad, así como en las consecuencias cardíacas producidas por el infarto de miocardio asociado o no a la obesidad.

### BASES DE LA HIPÓTESIS

1. La obesidad y el infarto de miocardio se asocian con cambios importantes en el patrón geométrico ventricular que pueden desencadenar cambios en la función cardíaca caracterizados por alteración de la función sistólica y/o diastólica. Estos cambios, con el tiempo, pueden favorecer el desarrollo de insuficiencia cardíaca.
2. La obesidad y el infarto de miocardio se asocian con fibrosis miocárdica que favorece el desarrollo de alteraciones en la función cardíaca.
3. La obesidad y el infarto de miocardio se asocian con un aumento de especies reactivas de oxígeno que generan alteraciones en la función cardíaca.
4. La obesidad y el infarto de miocardio generan alteraciones a nivel mitocondrial.
5. Las mitocondrias son la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno.
6. La obesidad y el infarto de miocardio se asocian con la activación del estrés del retículo endoplásmico.
7. Las mitocondrias y el retículo endoplásmico son dos orgánulos que interaccionan a nivel celular.

### **OBJETIVOS**

El objetivo general del presente estudio fue evaluar el posible papel del estrés oxidativo mitocondrial en las alteraciones cardiovasculares asociadas a diferentes contextos patológicos: obesidad; infarto de miocardio y con ambas patologías concomitantes, así como los posibles mecanismos involucrados.

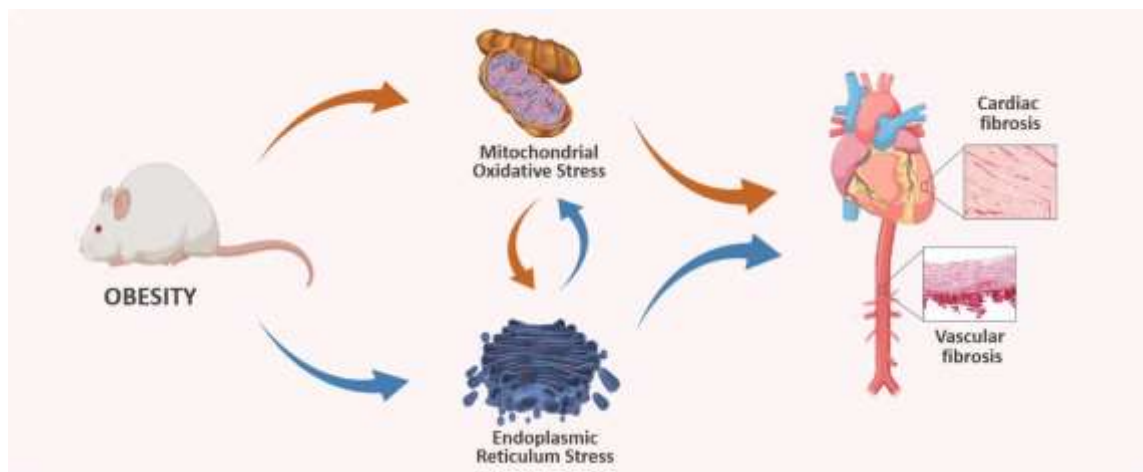
Para alcanzar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos en los diferentes modelos experimentales:

1. Evaluar el papel del estrés oxidativo mitocondrial sobre la estructura y función cardíaca.
2. Evaluar el papel del estrés oxidativo mitocondrial en el desarrollo de la fibrosis cardiovascular.
3. Determinar el papel del estrés del retículo endoplásmico sobre las alteraciones en la función y en la estructura cardíaca.
4. Determinar la interacción entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del retículo endoplásmico.
5. Evaluar el papel del estrés oxidativo mitocondrial y su interacción con el estrés del retículo endoplásmico sobre la contractilidad cardíaca.

# PUBLICACIONES

**Trabajo nº 1:** *The Interplay of Mitochondrial Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Fibrosis in Obese Rats.*

Graphical Abstract



## Article

# The Interplay of Mitochondrial Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Fibrosis in Obese Rats

Francisco V. Souza-Neto <sup>1,†</sup>, Sara Jiménez-González <sup>1,†</sup>, Beatriz Deigado-Valero <sup>1</sup>, Raquel Jurado-López <sup>1</sup>, Marie Genty <sup>1</sup>, Ana Romero-Miranda <sup>1</sup>, Cristina Rodríguez <sup>2,3,4</sup>, María Luisa Nieto <sup>4,5</sup>, Ernesto Martínez-Martínez <sup>1,4,\*,‡</sup> and Victoria Cachofeiro <sup>1,4,\*,‡</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; franvasc@ucm.es (F.V.S.-N.); sara.ji02@ucm.es (S.J.-G.); beadel02@ucm.es (B.D.-V.); rajurado@ucm.es (R.J.-L.); marie.genty@inserm.fr (M.G.); anarom12@ucm.es (A.R.-M.)

<sup>2</sup> Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; crodriguez@santpau.cat

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IB Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Cíber de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Spain; ml.nieto@csic.es

<sup>5</sup> Instituto de Biología y Genética Molecular, CSIC-Universidad de Valladolid, 47002 Valladolid, Spain

\* Correspondence: ermarti@ucm.es (E.M.-M.); vcara@ucm.es (V.C.); Tel.: +34-913941483 (E.M.-M.); +34-913941489 (V.C.)

† These authors contributed equally to this study.

‡ These authors contributed equally to this study.



Citation: Souza-Neto, F.V.;

Jiménez-González, S.; Deigado-Valero, B.; Jurado-López, R.; Genty, M.; Romero-Miranda, A.; Rodríguez, C.; Nieto, M.L.; Martínez-Martínez, E.; Cachofeiro, V. The Interplay of Mitochondrial Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Fibrosis in Obese Rats. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1274. <https://doi.org/10.3390/antiox10081274>

Academic Editor: Judith Haendeler

Received: 1 July 2021

Accepted: 9 August 2021

Published: 11 August 2021

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



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

**Abstract:** We have evaluated the role of mitochondrial oxidative stress and its association with endoplasmic reticulum (ER) stress activation in the progression of obesity-related cardiovascular fibrosis. MitoQ (200  $\mu$ M) was orally administered for 7 weeks to male Wistar rats that were fed a high-fat diet (HFD, 35% fat) or a control diet (CT, 3.5% fat). Obese animals presented cardiovascular fibrosis accompanied by increased levels of extracellular matrix proteins and profibrotic mediators. These alterations were associated with ER stress activation characterized by enhanced levels (in heart and aorta vs. CT group, respectively) of immunoglobulin binding protein (BiP; 2.1- and 2.6-fold, respectively), protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6; 1.9-fold) and CCAAT-enhancer-binding homologous protein (CHOP; 1.5- and 1.8-fold, respectively). MitoQ treatment was able to prevent ( $p < 0.05$ ) these modifications at cardiac and aortic levels. MitoQ (5 nM) and the ER stress inhibitor, 4-phenyl butyric acid (4  $\mu$ M), were able to block the prooxidant and profibrotic effects of angiotensin II (Ang II,  $10^{-6}$  M) in cardiac and vascular cells. Therefore, the data show a crosstalk between mitochondrial oxidative stress and ER stress activation, which mediates the development of cardiovascular fibrosis in the context of obesity and in which Ang II can play a relevant role.

**Keywords:** cardiovascular fibrosis; endoplasmic reticulum stress; mitochondrial oxidative stress; obesity

## 1. Introduction

Cardiovascular fibrosis is a common feature in the context of obesity that occurs due to the imbalance between production and degradation of extracellular matrix components (ECM), mainly collagen type I [1]. This excessive ECM deposit due to an increased number of myofibroblasts, the main cell responsible for fibrosis, can produce an aberrant remodeling that triggers functional alterations by reducing the relaxing capability of the heart, which can in turn increase its filling pressure and contribute to diastolic dysfunction [2]. Vascular fibrosis is associated with arterial stiffness, which is a main determinant of cardiovascular mortality [3].

A variety of factors has been suggested as potential mediators of cardiac fibrosis in the context of obesity, including oxidative stress [4–6]. Mitochondria are the main

source of reactive oxygen species (ROS) in the cell through oxidative phosphorylation (OXPHOS) during the process of ATP synthesis [7]. In normal conditions, ROS levels in the mitochondria are balanced by an effective antioxidant defense. However, an excessive production of ROS can affect mitochondrial function and could lead to functional alterations of the heart [8,9]. In this line, some data have reported the relevance of mitochondrial oxidative stress in the development not only of cardiac fibrosis but also in the metabolic alterations in diet-induced obese rats [10,11]. In our previous study [12], we observed that obese animals presented an increase in body weight, as well as in adiposity index, which was associated with adipose tissue fibrosis and metabolic alterations. At cardiac level, obese animals exhibited hypertrophy, interstitial fibrosis and an increase in superoxide anion levels, as compared to the reference group. These modifications were prevented by treatment with the mitochondrial antioxidant, MitoQ, and were in absence of alterations in cardiac function or in blood pressure [9]. However, the mechanisms through which mitochondrial ROS plays a role in the fibrotic consequences of obesity remain unclear. In the last years, it has been described that obesogenic diets have an impact on the diversity and functionality of the gut microbiota, which plays a central role in the cardiovascular alterations observed in obesity [13,14]. In this sense, alterations in gut microbiota are associated with renal disorders [15] and cardiovascular diseases such as heart failure [16], atherosclerosis [17], hypertension [18] or vascular dysfunction [19]. Systemic inflammation plays a central role in all of these pathologies [20,21]. It has been observed that changes in gut microbiota observed in obese animals are involved in adipose tissue inflammation, oxidative stress and metabolic disorders [22]. In a recent study, we have demonstrated the relevance of oxidative stress in all of these alterations, since treatment with a mitochondrial antioxidant was able to prevent insulin resistance and cardiac fibrosis observed in obese animals. These beneficial effects of the mitochondrial antioxidant were accompanied by a restoration in gut microbiota composition [23], thus showing the link between microbiota dysbiosis, oxidative stress, inflammation and cardiac alterations in the context of obesity. In this study, we would like to go deeper into the cardiac fibrosis associated with obesity, as well as the role of mitochondrial oxidative stress.

The endoplasmic reticulum (ER) is a dynamic cellular organelle with different functions:  $Ca^{2+}$  buffering, lipid and carbohydrate metabolism, as well as protein synthesis, folding and processing, among others. In a physiological state, protein synthesis and folding levels follow a balance so that the folding capacity of the ER is not saturated. However, this balance is perturbed in response to different stimuli, including oxidative stress, and misfolded proteins thus accumulate in the ER lumen. This promotes ER stress and the activation of the unfolded protein response (UPR) to normalize and return the balance in which binding immunoglobulin protein (BiP) plays a central role as a chaperone. BiP is therefore considered to be a marker of ER stress activation. Different studies have demonstrated the participation of ER stress in cardiovascular damage. The contribution of ER stress to cardiac hypertrophy has been demonstrated in transgenic mice, where the genetic ablation of mediators of ER stress reduced cardiac remodeling, as well as cardiac dysfunction, after transverse aortic constriction in mice [24]. In addition, the beneficial effects of ER stress inhibition were confirmed by the pharmacological inhibition of ER stress capability to reduce cardiac hypertrophy induced by a pressure overload model [25]. Ischemic conditions are also associated with impaired protein folding and subsequent activation of ER stress. In prolonged ER stress conditions, ER activates proapoptotic signaling pathways, thereby contributing to the onset of heart failure [26]. At vascular level, preclinical and clinical studies have elucidated the activation of ER stress in atherosclerotic plaques. The apoptosis in vascular smooth muscle cells (VSMCs) derived from prolonged ER stress activation leads to plaque rupture, oxidative stress and enhanced calcification [27,28]. In addition, the role of ER stress has been demonstrated in vascular endothelial dysfunction in hypertension [29]. Different studies have reported the potential participation of ER stress in the development of cardiac fibrosis in obese models [30,31].

The mitochondria and ER can come into contact at different sites, forming the mitochondria-ER associated membranes, through which they can coordinate their functions by participating in the regulation of different processes [32]. However, whether these interactions can be relevant for the development of cardiovascular fibrosis in the context of obesity is not fully established. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether the participation of oxidative stress in the development of cardiovascular fibrosis in the context of obesity is through the activation of ER stress. To address this aim, we evaluated the effect of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in cardiovascular fibrosis in obese rats. In addition, we have studied how MitoQ treatment can affect ER stress activation. We have also analyzed the crosstalk between both processes in cultured cardiac fibroblasts and VSMCs, the main cells involved in ECM synthesis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animal Model

Male Wistar rats of 150 g (6 weeks old; Envigo, Barcelona, Spain) were fed either a high-fat diet (HFD, 35% fat; Envigo Teklad no. TD.03307, Haslett, MI, USA;  $n = 16$ ) or a standard diet (CT, 3.5% fat; Envigo Teklad no. TD.2014, Haslett, MI, USA;  $n = 16$ ) for a period of 7 weeks. The mitochondrial antioxidant MitoQ (200  $\mu$ M) was administered to half of the animals of each group in the drinking water for the same period of time. Animals were sacrificed by decapitation. The dose of MitoQ was based on previous data [33]. MP Murphy from medical Research Council Mitochondrial Biology Unit (Biomedical Campus, Cambridge, UK) provided MitoQ. Animals were weighed once a week. All experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Universidad Complutense de Madrid following the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013 and according the European Union Directive 2010/63/UE. Serum and plasma samples were collected at the end of the study.

### 2.2. Histological Analysis

Samples of aorta and heart were dehydrated, immersed in paraffin and cut into sections 4  $\mu$ m thick. Collagen fibers were detected by the staining of sections with picosirius red. Aorta and coronary artery fibrosis was quantified in the media layer as the ratio of collagen deposition or interstitial fibrosis to the total media area. Ten to fifteen fields for each sample were analyzed with an objective (40 $\times$ ) under microscopy of transmitted light (Leica DM 2000; Leica AG, Wetzlar, Germany). Quantification of the data was performed with an analysis system (Leica LAS 4.3; Leica AG, Wetzlar, Germany).

### 2.3. Cell Isolation and Cell Culture Conditions

Heart and thoracic aorta of adult male Wistar rats (weighing 250–300 g) were used to isolate cardiofibroblasts and VSMCs. Differential centrifugation was performed after enzymatic digestion of the hearts with a mix of collagenase-trypsin for the isolation of cardiac fibroblasts and aorta with a mix of collagenase-elasticase for the isolation of VSMCs, as previously described [5,34]. Cells were used between passages 5 and 6. DMEM medium supplemented with 10% FBS, 10 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 10 mmol/L L-pyruvate and 2 mmol/L HEPES was used for cardiac fibroblasts. VSMCs were maintained in DMEM F-12 supplemented with 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. Cells were grown as monolayer culture in a T-75 tissue culture flask from an initial density of  $0.5 \times 10^6$  cells. Confluent cells were passaged with 0.25% trypsin in 0.01% EDTA. Cells were serum-starved for 12 h, and 6-well plates were used with 90% confluence for each experimental condition. All assays in the present study were done at temperatures of 37  $^{\circ}$ C, 95% sterile air and 5% CO<sub>2</sub> in a saturation humidified incubator. Cells were treated with angiotensin II (Ang II;  $10^{-6}$  M) for 24 h in the presence or absence of the mitochondrial antioxidant, MitoQ (5 nM), or the chemical chaperone, 4-phenyl butyric acid (4-PBA; 4  $\mu$ M). VSMCs were treated with the ER stress inducer, tunicamycin (1–2  $\mu$ g/mL), for 24 h.

#### 2.4. Western Blot

Total proteins from cardiac and aortic homogenates, as well as cellular extracts, were prepared as previously described [9]. Briefly, proteins were separated by SDS-PAGE on polyacrylamide Criterion™ TGX™ Precast Gels (BioRad, Hercules, CA, USA) and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Hybond-P; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Membranes were reused after stripping a maximum of 3 times. This allows for measuring the greatest number of proteins in the same membrane. Membranes were probed with primary antibodies for activating transcription factor 6- $\alpha$  (ATF6 $\alpha$ ; Santa Cruz, TX, USA; dilution 1:250), immunoglobulin binding protein (BiP; BD Biosciences, Madrid, Spain; dilution 1:1500), CCAAT-enhancer-binding homologous protein (CHOP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; dilution 1:500), collagen I (Calbiochem, San Diego, CA, USA; dilution 1:500), connective tissue growth factor (CTGF; Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA; dilution 1:1000), protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6; Abcam plc, Cambridge, UK; dilution 1:500), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ; Abcam plc, Cambridge, UK; dilution 1:250) and  $\alpha$ -tubulin or  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA; dilution 1:5000) as loading controls. Signals were detected using the ECL system (Millipore, Burlington, MA, USA). Results are expressed as an *n*-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units.

#### 2.5. Retrotranscription and Real-Time PCR

Total RNA was isolated using Trizol Reagent (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Quantitative PCR analysis was performed with SYBR green PCR technology (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and specific oligonucleotides (Table S1). Quantification of mRNA levels was performed by real-time PCR using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Data were normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT).

#### 2.6. Measurement of Intracellular Superoxide Anion Production

Cardiomyofibroblasts and VSMCs were seeded into 48-well plates at 70% confluence for experiments measuring O<sub>2</sub><sup>-</sup> production. Cells were exposed for 24 h with either vehicle or Ang II (10<sup>-6</sup> M) for 24 h in the presence or absence of the mitochondrial antioxidant, MitoQ (5 nM), or the chemical chaperone, 4-PBA (4  $\mu$ M). Cells were then exposed with dihydroethidium (DHE; 5  $\times$  10<sup>-3</sup> mmol/L) for 30 min. Cells were washed with warm PBS and analyzed with an objective lens (40 $\times$ ) in a fluorescent laser scanning Leica DMI 3000 microscope. A number of cells (150–200) for each condition was analyzed. The mean fluorescence densities in the nucleus were calculated. Results are expressed as an *n*-fold increase over the data of the control group. The analysis was performed by a single researcher unaware of the experimental groups.

#### 2.7. Statistical Analysis

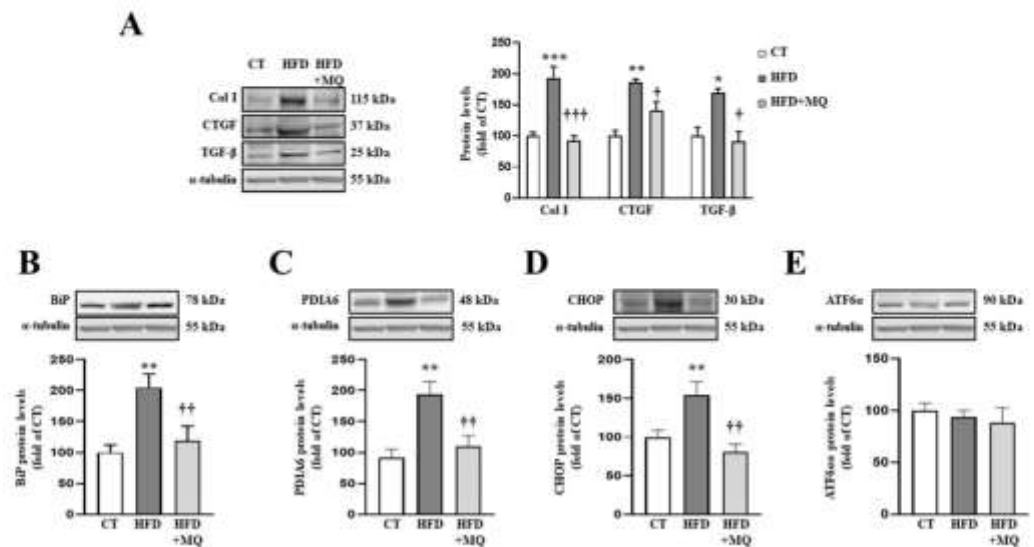
Variables are expressed as mean  $\pm$  SEM. Kolmogorov–Smirnov test was used to verify the normality of distributions. Differences between 2 groups were assessed with Student's *t* test. Differences among several groups were evaluated using one-way ANOVA. Newman–Keuls test was used as a post hoc test for differences in means. A value of *p* < 0.05 was used as the cutoff for defining statistical significance. Data were analyzed using the statistical program GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Mitochondrial Oxidative Stress Promotes ECM Protein Deposition and ER Stress Activation at Cardiac Level in Obesity

HFD animals presented an increase in collagen type I protein levels accompanied by an increase in the profibrotic mediators CTGF and TGF- $\beta$  as compared to control animals

(Figure 1A). The treatment with the mitochondrial antioxidant, MitoQ, was able to prevent the increase in ECM components and profibrotic growth factors observed in HFD (Figure 1A).



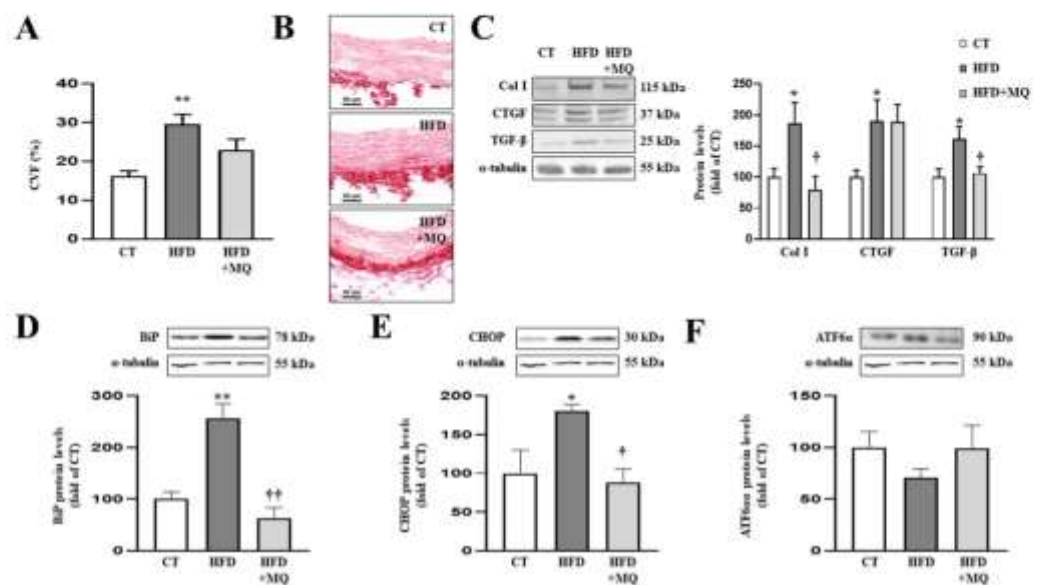
**Figure 1.** Mitochondrial oxidative stress mediates the increase in extracellular matrix proteins and endoplasmic reticulum stress at cardiac level. Protein levels of (A) collagen type I (Col I), connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor-beta (TGF-β); (B) immunoglobulin binding protein (BiP); (C) protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6); (D) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP); (E) activating transcription factor 6-alpha (ATF6α) in heart tissue from control rats fed a normal chow (CT) and rats fed a high-fat diet (HFD) treated with vehicle or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200 μM). Bars graphs represent the mean ± SEM of 6–8 animals normalized for α-tubulin. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control group. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. HFD group.

In order to identify possible mechanisms involved in the development of cardiac alterations in HFD animals and the improvement showed by MitoQ in ECM production, we evaluated ER stress activation. Obese animals presented an increase in two ER stress markers, such as BiP and PDIA6 (Figure 1B,C, respectively). Complementary analyses of different pathways involved in ER stress activation revealed an increase in CHOP protein levels without modifications in ATF6α protein levels (Figure 1D,E, respectively). MitoQ treatment was able to prevent all of these alterations, demonstrating the crosstalk between mitochondria and ER (Figure 1B–D). Interestingly, ER stress markers BiP and PDIA6 (Figure S1A,B) correlated with cardiac interstitial fibrosis in the animals, as well as CHOP correlating with collagen type I protein levels (Figure S1C), thereby showing the possible role of ER stress in ECM production.

### 3.2. MitoQ Treatment Improves Vascular Fibrosis and ER Stress Activation in the Aorta of HFD Animals

Having observed the effects of obesity and participation of mitochondrial oxidative stress in cardiac alterations, we examined whether the inhibition of mitochondrial oxidative stress could improve vascular fibrosis in HFD animals. Diet-induced obese animals showed important modifications at vascular level, characterized by aortic fibrosis (Figure 2A,B) accompanied by collagen type I and the upregulation of profibrotic mediators CTGF and TGF-β (Figure 2C). In addition, obese animals presented an increase in fibrosis in the media of the descending coronary artery, which was partially decreased by MitoQ treatment (Figure S2A,B). As occurs with cardiac interstitial fibrosis, ER stress markers correlated with fibrosis observed in the media of the coronary vessel (Figure S2C,D). All of

these modifications observed in obese animals were in the absence of alterations in aortic morphology, such as those of the media or lumen area (Figure S3A–C). Mitochondrial oxidative stress participates in vascular fibrosis, since treatment with MitoQ was able to prevent aortic fibrosis and increases in collagen type I and TGF- $\beta$  protein levels without modifications in CTGF expression (Figure 2A–C).

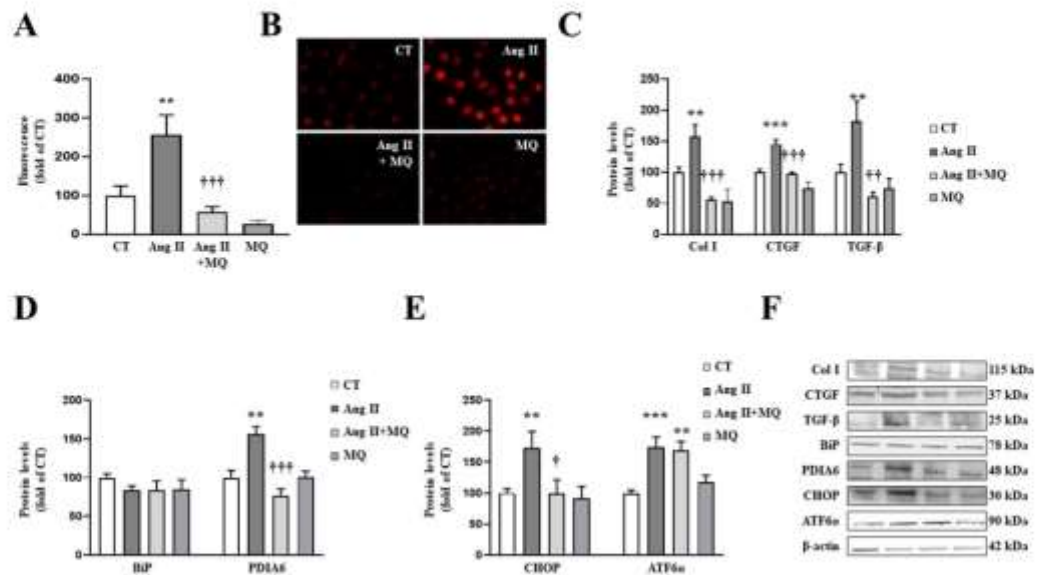


**Figure 2.** Mitochondrial oxidative stress mediates vascular fibrosis and endoplasmic reticulum stress at aortic level. (A) Quantification of collagen volume fraction and (B) representative microphotographs of aortic sections staining with picrosirius red. Protein levels of (C) collagen type I (Col I), connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ); (D) immunoglobulin binding protein (BiP); (E) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP); (F) activating transcription factor 6-alpha (ATF6 $\alpha$ ) in aortic tissue from control rats fed a normal chow (CT) and rats fed a high-fat diet (HFD) treated with vehicle or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Scale bar: 50  $\mu$ m. Bars graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 6–8 animals normalized for  $\alpha$ -tubulin. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. control group. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  vs. HFD group.

As occurs at cardiac level, obese animals presented aortic ER stress activation characterized by an increase in BiP protein levels (Figure 2D) together with CHOP upregulation (Figure 2E), while ATF6 $\alpha$  protein levels remained unchanged (Figure 2F) compared to control rats. Treatment with MitoQ was able to prevent ER stress activation as well as increases in CHOP protein levels in obese animals (Figure 2D,E).

### 3.3. Mitochondrial Oxidative Stress Mediates the Effects of Ang II in Cardiac Fibroblasts

Obese animals presented an increase in Ang II plasma levels, which was prevented by MitoQ treatment (Figure S4). In order to study the direct effects of mitochondrial oxidative stress on ECM production and on Ang II effects, we exposed cardiac fibroblasts to Ang II in presence or absence of the mitochondrial antioxidant MitoQ. Ang II ( $10^{-6}$  M) was able to increase superoxide anion production levels in cardiac fibroblasts (Figure 3A,B). As expected, Ang II-treated cells presented a significant increase in collagen type I protein levels, as well as levels of CTGF and TGF- $\beta$  (Figure 3C). MitoQ (5 nM) prevented the prooxidant effects of Ang II, showing the efficiency of the treatment (Figure 3A,B). In addition, MitoQ treatment blunted the profibrotic effects of Ang II, thus preventing an increase in collagen I, CTGF and TGF- $\beta$  protein levels in cardiac fibroblasts (Figure 3C).



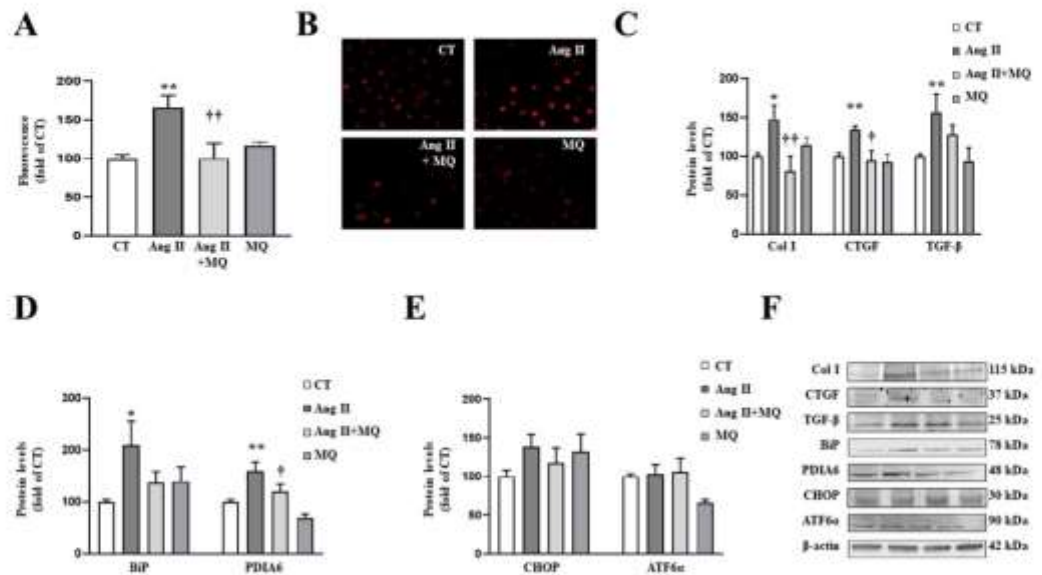
**Figure 3.** Mitochondrial oxidative stress mediates the prooxidant, profibrotic and the endoplasmic reticulum stress activation induced by angiotensin II (Ang II) in cardiac fibroblasts. (A,B) Effect of the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 5 nM) on superoxide anion production. Quantification of cells labelled with the oxidative dye dihydroethidium (A) and representative microphotographs (magnification 40×) (B). Protein levels of (C) collagen type I (Col I), connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor-beta (TGF-β); (D) immunoglobulin binding protein (BiP) and protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6); (E) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) and activating transcription factor 6-alpha (ATF6α) in cardiac fibroblasts treated with Ang II ( $10^{-6}$  M) for 24 h in the presence or in the absence of MQ. (F) Representative blots for protein expressions. Bars graphs represent the mean  $\pm$  SEM of MS four to six assays normalized for  $\beta$ -actin. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control cells. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. Ang II-treated cardiac fibroblasts.

Regarding ER stress, Ang II-treated cardiac cells increased a marker of ER stress activation, such as PDIA6, without modifications in BiP protein levels at 24 h (Figure 3D). The activation of ER stress was confirmed, since Ang II promoted an upregulation of CHOP and ATF6α protein levels in cardiac fibroblasts (Figure 3E). The presence of MitoQ in the culture medium was able to prevent the increase in PDIA6 and CHOP induced by Ang II; however, it was not able to modify the increase in ATF6α protein levels in Ang II-treated cells (Figure 3D,E).

### 3.4. Mitochondrial Oxidative Stress Mediates the Effects of Ang II in Vascular Smooth Muscle Cells

Having observed the beneficial effects of MitoQ at vascular level in obese animals and the effects of Ang II on cardiac fibroblasts, we treated VSMCs with Ang II and MitoQ.

The presence of MitoQ (5 nM) was able to block the prooxidant and profibrotic effects of Ang II ( $10^{-6}$  M) in VSMCs, since it was able to prevent the increase in superoxide anion production (Figure 4A,B), as well as the upregulation in collagen type I, CTGF and TGF-β protein levels (Figure 4C) induced by Ang II.

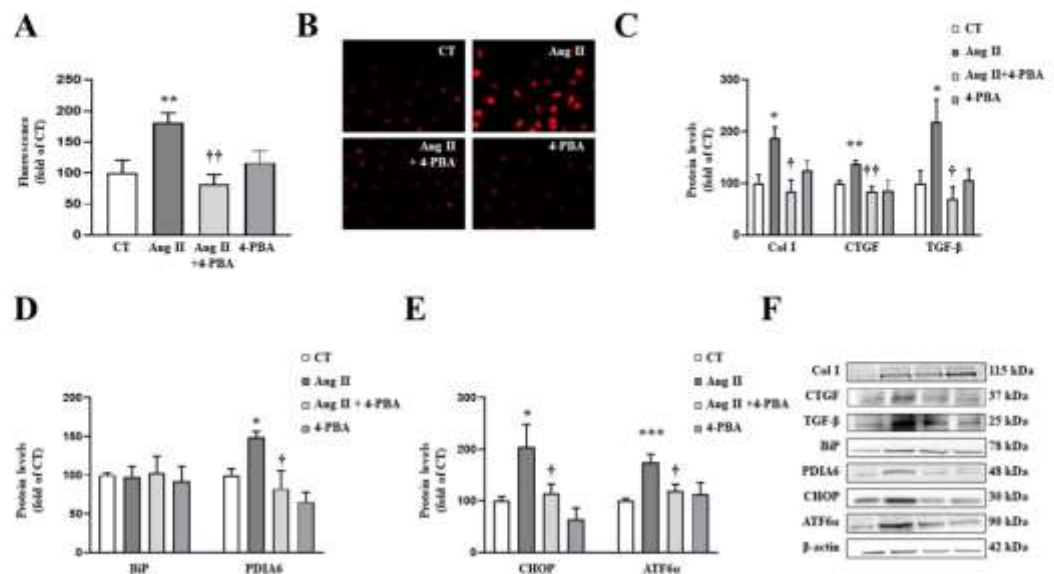


**Figure 4.** Mitochondrial oxidative stress mediates the prooxidant, profibrotic and the endoplasmic reticulum stress activation induced by angiotensin II (Ang II) in vascular smooth muscle cells (VSMCs). (A,B) Effects of the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 5 nM) on superoxide anion production. Quantification of cells labelled with the oxidative dye dihydroethidium (A) and representative microphotographs (magnification 40×) (B). Protein levels of (C) collagen type I (Col I), connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor-beta (TGF-β); (D) immunoglobulin binding protein (BiP) and protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6); (E) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) and activating transcription factor 6-alpha (ATF6α) in VSMCs treated with Ang II ( $10^{-6}$  M) for 24 h in the presence or in the absence of MQ. (F) Representative blots for protein expressions. Bars graphs represent the mean  $\pm$  SEM of four to six assays normalized for  $\beta$ -actin. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , vs. control cells. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , vs. Ang II-treated VSMCs.

As occurs in cardiac cells, Ang II activated ER stress characterized by an increase in BiP and PDIA6 protein levels (Figure 4D). Analysis of pathways involved in ER stress activation showed that Ang II was not able to produce a significant increase in CHOP or ATF6α after 24 h of stimulation (Figure 4E). The effects of Ang II on BiP and PDIA6 protein levels were blunted by the presence of MitoQ in the culture medium (Figure 4D).

### 3.5. Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress Blocks the Prooxidant and Profibrotic Effects of Ang II in Cardiovascular Cells

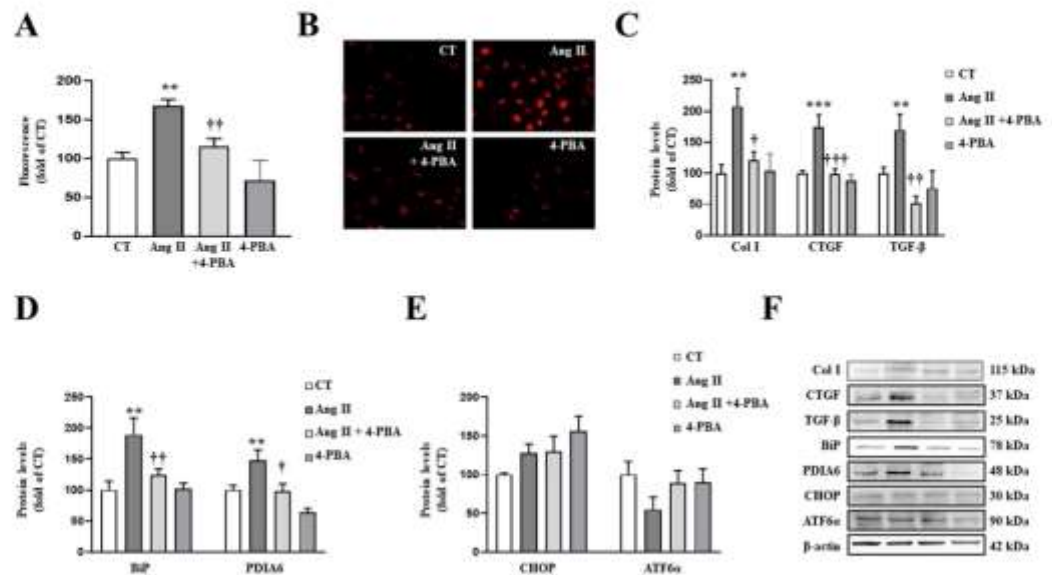
In order to explore the direct effects of ER stress activation on Ang II actions, cardiac fibroblasts were treated with Ang II in the presence or absence of the ER stress inhibitor, 4-PBA. The presence of 4-PBA (4  $\mu$ M) was able to prevent the increase in superoxide anion production in Ang II-treated cells (Figure 5A,B), thereby demonstrating a vicious circle between oxidative stress and ER stress. In addition, the pharmacological inhibition of ER stress prevented the profibrotic actions of Ang II ( $10^{-6}$  M) by decreasing the up-regulation of collagen type I and the profibrotic mediators CTGF and TGF-β protein levels in cardiac fibroblasts (Figure 5C).



**Figure 5.** Endoplasmic reticulum stress mediates the prooxidant and profibrotic effects induced by angiotensin II (Ang II) in cardiac fibroblasts. (A,B) Effect of 4-phenylbutyrate acid (4-PBA; 4  $\mu$ M) on superoxide anion production. Quantification of cells labelled with the oxidative dye dihydroethidium (A) and representative microphotographs (magnification 40 $\times$ ) (B). Protein levels of (C) collagen type I (Col I), connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ); (D) immunoglobulin binding protein (BiP) and protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6); (E) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) and activating transcription factor 6-alpha (ATF6 $\alpha$ ) in cardiac fibroblasts treated with Ang II ( $10^{-6}$  M) for 24 h in the presence or in the absence of 4-PBA. (F) Representative blots for protein expressions. Bars graphs represent the mean  $\pm$  SEM of four to six assays normalized for  $\beta$ -actin. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control cells. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  vs. Ang II-treated cardiac fibroblasts.

As expected, the presence of 4-PBA was able to inhibit ER stress activation in cardiac fibroblasts treated with Ang II, characterized by a decrease in PDIA6 (Figure 5D) protein levels. In addition, 4-PBA was able to prevent the increase in CHOP and ATF6 $\alpha$  protein levels induced by Ang II (Figure 5E).

Similar results were obtained in VSMCs. The presence of 4-PBA (4  $\mu$ M) blunted the prooxidant (Figure 6A,B) and the profibrotic (Figure 6C) actions of Ang II ( $10^{-6}$  M) in VSMCs. These effects of 4-PBA were accompanied by the inhibition of BiP and PDIA6 up-regulation in Ang II-treated cells, thereby confirming the effectiveness of the treatment (Figure 6D).



**Figure 6.** Endoplasmic reticulum stress mediates the prooxidant and profibrotic effects induced by Angiotensin II (Ang II) in vascular smooth muscle cells (VSMCs). (A,B) Effect of 4-phenylbutyrate acid (4-PBA; 4  $\mu$ M) on superoxide anion production. Quantification of cells labelled with the oxidative dye dihydroethidium (A) and representative microphotographs (magnification 40 $\times$ ) (B). Protein levels of (C) collagen type I (Col I), connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ); (D) immunoglobulin binding protein (BiP) and protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6); (E) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) and activating transcription factor 6-alpha (ATF6 $\alpha$ ) in VSMCs treated with Ang II ( $10^{-6}$  M) for 24 h. (F) Representative blots for protein expressions. Bars graphs represent the mean  $\pm$  SEM of four to six assays normalized for  $\beta$ -actin. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control cells. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. Ang II-treated VSMCs.

By complementary analyses, we confirmed the direct effects of ER stress in VSMCs through the use of tunicamycin, a pharmacological inducer. Tunicamycin promoted an increase in superoxide anion production in a dose-dependent manner (Figure S5A). At 1.5  $\mu$ g/mL, tunicamycin induced an increase in collagen type I mRNA levels, an effect that was accompanied by TGF- $\beta$  mRNA level up-regulation in VSMCs (Figure S5B,C).

#### 4. Discussion

The purpose of this study was to investigate the interactions between mitochondrial oxidative stress and ER stress in cardiovascular fibrosis associated with obesity. In the present study, ER stress, which is activated in the cardiovascular system in obesity, emerges as a potential mediator of cardiovascular fibrosis induced by mitochondrial oxidative stress in this context. This is based on the fact that the reduction in mitochondrial oxidative stress by MitoQ prevented the upregulation not only of total collagen but also of collagen I and the profibrotic mediators TGF- $\beta$  and CTGF protein levels in obese rats. These effects were accompanied by an attenuation of ER stress at cardiac and vascular levels. In addition, ROS reduction and ER stress inhibition by MitoQ or 4-PBA, respectively, reduced the profibrotic actions of Ang II, whose levels are elevated in obese animals and involved in cardiovascular fibrosis associated with obesity in cardiac and vascular cells [35,36]. This suggests that interactions between ER stress and mitochondrial oxidative stress regulate downstream events and are responsible for fibrosis in the context of obesity. Thus, ER stress emerges as a potential therapeutic target involved in the altered ECM processing observed in obesity.

Fibrosis is a common feature involved in several cardiovascular pathologies such as obesity, hypertension, myocardial infarction and atherosclerosis, among others [23,37,38]. Cardiovascular fibrosis contributes to poor prognosis in obesity due to alterations in the cardiac and vascular architecture, thus favoring vascular stiffness, cardiac dysfunction and heart failure [39,40]. However, the signaling pathways involved in this process are not fully understood. Therefore, it is mandatory to comprehend the pathological context in order to identify new possible therapeutic approaches. Several studies have elucidated the main role of inflammation in cardiac damage, thereby promoting cardiac dysfunction and myocardial necrosis [41]. It has been described that proinflammatory cytokines such as tumor necrosis-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 play a central role in cardiac damage associated with ischemic conditions [42] and obesity, as well [43]. In a recent study, Zhou J et al. demonstrated that pretreatment with miR-181a-5p antagomiR was able to improve cardiac function in an animal model of cardiac damage. This effect was accompanied by an improvement in both oxidative stress and inflammation of the cardiac tissue [44]. At vascular level, it is known that inflammation and oxidative stress contribute to endothelial dysfunction, as has been recently reported in clinical studies [45]. In addition, inflammation and oxidative stress are involved in the initial phase of cardiac remodeling and facilitate ECM deposition and subsequent fibrosis. Our present study extends the previous observation made at the cardiac level [9] to the vascular level, since treatment with the mitochondrial antioxidant MitoQ was able to reduce total collagen in the media of the descending coronary artery and in the aorta of obese rats. Thus, this supports the role of mitochondrial oxidative stress in the cardiovascular fibrosis in obesity, which confirms previous observations [46]. The amelioration in cardiovascular fibrosis was accompanied by a reduction in collagen type I protein levels in MitoQ-treated animals. Collagen type I is the predominant collagen subtype found in the arterial wall (70–75%) [47] and within the heart (approximately 80%). TGF- $\beta$  and CTGF are two profibrotic mediators involved in collagen synthesis and subsequent fibrosis [48,49]. In this line, MitoQ was able to prevent the increase in TGF- $\beta$  and CTGF at cardiac and vascular levels (except for CTGF aortic protein levels) in the animals fed an HFD, suggesting that the antifibrotic effects of MitoQ are related to collagen synthesis. This improvement could also be related to the interactions between gut microbiota and mitochondrial oxidative stress, which participates in cardiac fibrosis in the context of obesity [23]. In fact, the role of microbiota dysbiosis has been reported not only in obesity but also in other pathological scenarios, including neurodegenerative diseases [50–54].

Interestingly, treatment with the mitochondrial antioxidant was also able to prevent cardiovascular ER stress activation in obese animals. HFD rats presented an increase in BiP and PDIA6, another ER stress marker, at cardiac protein levels, which was prevented by MitoQ treatment. The effect of MitoQ on ER stress was confirmed at vascular level, since MitoQ was also able to prevent upregulation in BiP aortic protein levels observed in HFD animals, showing the connection between mitochondria and ER at cardiovascular level, as has been reported in other pathological conditions, including metabolic alterations [55–58].

The initial response of ER in restoring homeostasis is the UPR, which is initiated by three transmembrane proteins: inositol requiring 1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK), and ATF6. Our data show that obese rats presented an increase in cardiac and aortic protein levels of CHOP, a common downstream element of IRE1 and PERK, without modifications in ATF6 $\alpha$  protein levels. The upregulation of CHOP in obese rats was blunted by MitoQ treatment, confirming the crosstalk between mitochondrial oxidative stress and ER stress activation in obese animals. Similarly, minipigs fed an HFD presented cardiac interstitial fibrosis, which was accompanied by ER stress activation characterized by CHOP upregulation [30]. CHOP is a transcription factor that mediates apoptosis, triggered by UPR response, and has been highlighted as a key regulator of cardiac injury. The increase in CHOP levels could also be ascribed to the mitochondrial UPR (UPR<sup>MIT</sup>); however, our results showing higher levels of BiP and PDIA6 reflect the activation of ER stress in obesity, in agreement with previous reports, while the contribution of UPR<sup>MIT</sup>

to cardiovascular alterations in obesity is currently uncertain. Previous studies have demonstrated that genetic disruption of CHOP attenuates cardiac hypertrophy and cardiac dysfunction in mice induced by pressure overload [59]. Thus, this supports that ER stress activation could become a novel target for cardiovascular diseases. In addition, ER stress activation has been previously observed in adipose tissue of obese patients, and a reduction in body weight is associated with a decrease in ER stress markers [60]. Moreover, the administration of pharmacological inhibitors of ER stress was able to prevent UPR activation in liver and adipose tissue by improving insulin resistance in genetic models of obesity [61]. Therefore, these data support the role of ER activation in the metabolic alterations associated with obesity.

Different factors are involved in cardiovascular damage, including the renin-angiotensin system, which can enhance ROS generation in myocardial tissue [62]. It has been described that Ang II, a well-known profibrotic factor at cardiac and vascular levels [63,64], is elevated in obese patients [65]. In agreement with this, we have observed a similar increase in Ang II plasma levels in obese rats, which was normalized by MitoQ treatment. In cultured cardiac fibroblasts and VSMCs, Ang II increased superoxide anion production and promoted an increase in collagen type I protein levels accompanied by an up-regulation of TGF- $\beta$  and CTGF expression. The presence of MitoQ was able to prevent not only the prooxidant effects of Ang II but also its profibrotic effects. This fact shows that mitochondrial oxidative stress mediates the profibrotic and prooxidant effects of Ang II and its involvement in ECM production in obesity, reinforcing the data observed *in vivo*. Importantly, cardiac and vascular cells exposed to Ang II presented ER stress activation characterized by an upregulation of ER stress markers. This effect was previously observed in adipocytes [66], in podocytes [67] and in pancreatic  $\beta$  cells [68]. We show for the first time that Ang II promotes ER stress activation in cardiac fibroblasts and VSMCs through mitochondrial oxidative stress production. However, it is important to mention that this ER stress activation seems to operate through different pathways in cardiac fibroblasts and VSMCs, since up-regulation in CHOP and ATF6 $\alpha$  protein levels observed in the cardiac cells under Ang II treatment was not present in VSMCs.

A previous study has demonstrated that the pharmacological inhibition of ER stress is able to prevent cardiac fibrosis induced by Ang II infusion in mice [29]. In agreement with this, we have shown that treatment with the ER stress inhibitor, 4-PBA, prevents the increase in ECM proteins induced by Ang II in cardiac fibroblasts and VSMCs. The role of ER stress in ECM production was confirmed by the pharmacological inducer of ER stress, tunicamycin. VSMCs exposed to tunicamycin presented an increase in collagen type I and TGF- $\beta$  mRNA levels. Moreover, ER stress activation by tunicamycin also promoted ROS production in VSMCs, thereby supporting the notion that there exists a crosstalk between oxidative stress and ER stress. ER is an organelle responsible for calcium homeostasis. It has been described that a massive influx of calcium into mitochondria can lead to the formation and opening of pores, thereby promoting damage to mitochondria and the subsequent ROS production [69,70]. In this sense, we have demonstrated that Ang II promotes superoxide anion production in cardiovascular cells, an effect that was prevented by ER stress inhibition.

## 5. Conclusions

In summary, we have demonstrated that the cardiovascular fibrosis observed in obese animals was accompanied by oxidative stress and ER stress activation. Inhibition of mitochondrial oxidative stress with MitoQ prevented all of these alterations, thus supporting the role of ER stress in the profibrotic effect of mitochondrial oxidative stress in the context of obesity. Moreover, there seems to be a crosstalk between mitochondrial oxidative stress and ER stress activation, which mediates the increase in ECM proteins, ROS production and ER stress activation in Ang II-treated cardiovascular cells, a factor involved in the cardiovascular fibrosis associated with obesity [36,71].

These results show the potential role of mitochondrial oxidative stress and ER stress in cardiovascular fibrosis in the context of obesity, thereby suggesting new therapeutic approaches in the management of obesity for the treatment of cardiovascular alterations in which high levels of Ang II can play a role.

## 6. Limitations

Although the study explores interactions between mitochondrial oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in cardiovascular fibrosis in obese rats through different approaches (in vivo and in vitro studies), the data do not allow the assessment that one ultimately leads to the other. The information regarding specific time course of events could represent a limitation of our study.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10081274/s1>. Table S1: Primers used in real time PCR analysis, Figure S1: Correlations observed between cardiac fibrosis and endoplasmic reticulum stress, Figure S2: Mitochondrial oxidative stress mediates the fibrosis of the media of the descending coronary artery, Figure S3: Vascular morphology of aorta in the animals, Figure S4: Angiotensin (Ang II) plasma levels, Figure S5: Endoplasmic reticulum stress increases oxidative stress and extracellular matrix markers in vascular smooth muscle cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.R., M.L.N., E.M.-M. and V.C.; methodology, F.V.S.-N., S.J.-G., B.D.-V., R.J.-L., M.G., A.R.-M., E.M.-M. and V.C.; validation, E.M.-M. and V.C.; formal analysis, F.V.S.-N., S.J.-G., B.D.-V., R.J.-L., M.G., A.R.-M., E.M.-M. and V.C.; investigation, F.V.S.-N., S.J.-G., B.D.-V., R.J.-L., M.G., A.R.-M., E.M.-M. and V.C.; data curation, F.V.S.-N., S.J.-G., E.M.-M. and V.C.; writing—original draft preparation, C.R., M.L.N., E.M.-M. and V.C.; writing—review and editing, C.R., M.L.N., E.M.-M. and V.C.; visualization, F.V.S.-N., S.J.-G., B.D.-V., R.J.-L., M.G., A.R.-M., C.R., M.L.N., E.M.-M. and V.C.; supervision, E.M.-M. and V.C.; project administration, E.M.-M. and V.C.; funding acquisition, E.M.-M. and V.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI18/00257; CIBERCV). F.V.S.-N. was supported by a contract from Universidad Complutense de Madrid y Banco Santander (CT42/18-CT43/18). B.D.-V. was supported by a grant P-FIS (FI19/00277). E.M.-M. was supported by a contract from CAM (Atracción de talento). S.J.-G. and A.R.-M. were supported by a contract from CAM (Ayuda de empleo juvenil PEJD-2018-PRE/BMD-9171 and PEJ-2018-TL/BMD-11906).

**Institutional Review Board Statement:** The Animal Care and Use Committee of Universidad Complutense de Madrid approved all experimental procedures according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

**Acknowledgments:** We thank Avelina Hidalgo, Virginia Peinado and Daniel Fernández for their technical help. We thank Anthony DeMarco for his help in editing. We thank MP Murphy for generously providing the MitoQ.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kong, P.; Christia, P.; Frangogiannis, N.G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 549–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Czubyrt, M.P. Cardiac Fibroblast to Myofibroblast Phenotype Conversion—An Unexploited Therapeutic Target. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2019**, *6*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kirkman, D.L.; Robinson, A.T.; Rossman, M.J.; Seals, D.R.; Edwards, D.G. Mitochondrial contributions to vascular endothelial dysfunction, arterial stiffness, and cardiovascular diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2021**, *320*, H2080–H2100. [[CrossRef](#)]
4. Cavalera, M.; Wang, J.; Frangogiannis, N.G. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: Pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Transl. Res.* **2014**, *164*, 323–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Martinez-Martinez, E.; Jurado-Lopez, R.; Valero-Munoz, M.; Bartolome, M.V.; Ballesteros, S.; Luaces, M.; Briones, A.M.; Lopez-Andres, N.; Miana, M.; Cachofeiro, V. Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: Potential role in obesity. *J. Hypertens.* **2014**, *32*, 1104–1114; discussion 1114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jeong, J.; Kim, D.H.; Park, G.; Park, S.; Kim, H.S. Clinical significance of anti-dense fine speckled 70 antibody in patients with fibromyalgia. *Korean J. Intern. Med.* **2019**, *34*, 426–433. [[CrossRef](#)]
7. Bhatti, J.S.; Bhatti, G.K.; Reddy, P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1863*, 1066–1077. [[CrossRef](#)]
8. Tsutsui, H.; Kinugawa, S.; Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *301*, H2181–H2190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Jimenez-Gonzalez, S.; Marin-Royo, G.; Jurado-Lopez, R.; Bartolome, M.V.; Romero-Miranda, A.; Luaces, M.; Islas, F.; Nieto, M.L.; Martinez-Martinez, E.; Cachofeiro, V. The Crosstalk between Cardiac Lipotoxicity and Mitochondrial Oxidative Stress in the Cardiac Alterations in Diet-Induced Obesity in Rats. *Cells* **2020**, *9*, 451. [[CrossRef](#)]
10. Feillet-Coudray, C.; Fouret, G.; Ebabe Elle, R.; Rieusset, J.; Bonafos, B.; Chabi, B.; Crouzier, D.; Zarkovic, K.; Zarkovic, N.; Ramos, J.; et al. The mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ ameliorates metabolic syndrome features in obesogenic diet-fed rats better than Apocynin or Allopurinol. *Free Radic. Res.* **2014**, *48*, 1232–1246. [[CrossRef](#)]
11. Coudray, C.; Fouret, G.; Lambert, K.; Ferreri, C.; Rieusset, J.; Blachnio-Zabielska, A.; Lecomte, J.; Ebabe Elle, R.; Badia, E.; Murphy, M.P.; et al. A mitochondrial-targeted ubiquinone modulates muscle lipid profile and improves mitochondrial respiration in obesogenic diet-fed rats. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 1155–1166. [[CrossRef](#)]
12. Marin-Royo, G.; Rodriguez, C.; Le Pape, A.; Jurado-Lopez, R.; Luaces, M.; Antequera, A.; Martinez-Gonzalez, J.; Souza-Neto, F.V.; Nieto, M.L.; Martinez-Martinez, E.; et al. The role of mitochondrial oxidative stress in the metabolic alterations in diet-induced obesity in rats. *FASEB J.* **2019**, *33*, 12060–12072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chen, X.; Devaraj, S. Gut Microbiome in Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **2018**, *18*, 129. [[CrossRef](#)]
14. Dabke, K.; Hendrick, G.; Devkota, S. The gut microbiome and metabolic syndrome. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 4050–4057. [[CrossRef](#)]
15. Yang, T.; Richards, E.M.; Pepine, C.J.; Raizada, M.K. The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2018**, *14*, 442–456. [[CrossRef](#)]
16. Astudillo, A.A.; Mayrovitz, H.N. The Gut Microbiome and Cardiovascular Disease. *Cureus* **2021**, *13*, e14519. [[PubMed](#)]
17. Karlsson, F.H.; Fak, F.; Nookaew, I.; Tremaroli, V.; Fagerberg, B.; Petranovic, D.; Backhed, F.; Nielsen, J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1245. [[CrossRef](#)]
18. Yang, T.; Santisteban, M.M.; Rodriguez, V.; Li, E.; Ahmari, N.; Carvajal, J.M.; Zadeh, M.; Gong, M.; Qi, Y.; Zubcevic, J.; et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension* **2015**, *65*, 1331–1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Karbach, S.H.; Schonfelder, T.; Brandao, I.; Wilms, E.; Hormann, N.; Jackel, S.; Schuler, R.; Finger, S.; Knorr, M.; Lagrange, J.; et al. Gut Microbiota Promote Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* **2016**, *5*, e003698. [[CrossRef](#)]
20. Martinez, B.K.; White, C.M. The Emerging Role of Inflammation in Cardiovascular Disease. *Ann. Pharm.* **2018**, *52*, 801–809. [[CrossRef](#)]
21. Saad, M.J.; Santos, A.; Prada, P.O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* **2016**, *31*, 283–293. [[CrossRef](#)]
22. Cani, P.D.; Bibiloni, R.; Knauf, C.; Waget, A.; Neyrinck, A.M.; Delzenne, N.M.; Burcelin, R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **2008**, *57*, 1470–1481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ortega-Hernandez, A.; Martinez-Martinez, E.; Gomez-Gordo, R.; Lopez-Andres, N.; Fernandez-Celis, A.; Gutierrez-Miranda, B.; Nieto, M.L.; Alarcon, T.; Alba, C.; Gomez-Garre, D.; et al. The Interaction between Mitochondrial Oxidative Stress and Gut Microbiota in the Cardiometabolic Consequences in Diet-Induced Obese Rats. *Antioxidants* **2020**, *9*, 640. [[CrossRef](#)]
24. Blackwood, E.A.; Hofmann, C.; Santo Domingo, M.; Bilal, A.S.; Sarakki, A.; Stauffer, W.; Arrieta, A.; Thuerauf, D.J.; Kolchhorst, F.W.; Muller, O.J.; et al. ATF6 Regulates Cardiac Hypertrophy by Transcriptional Induction of the mTORC1 Activator, Rheb. *Circ. Res.* **2019**, *124*, 79–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Luo, T.; Chen, B.; Wang, X. 4-PBA prevents pressure overload-induced myocardial hypertrophy and interstitial fibrosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *242*, 99–106. [[CrossRef](#)]
26. Thuerauf, D.J.; Marcinko, M.; Gude, N.; Rubio, M.; Sussman, M.A.; Glembocki, C.C. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 275–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Myoishi, M.; Hao, H.; Minamino, T.; Watanabe, K.; Nishihira, K.; Hatakeyama, K.; Aasada, Y.; Okada, K.; Ishibashi-Ueda, H.; Gabbiani, G.; et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* **2007**, *116*, 1226–1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Liu, H.; Li, X.; Qin, F.; Huang, K. Selenium suppresses oxidative-stress-enhanced vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting the activation of the PI3K/AKT and ERK signaling pathways and endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, 375–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Kassan, M.; Galan, M.; Partyka, M.; Saifudeen, Z.; Henrion, D.; Trebak, M.; Matrougui, K. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 1652–1661. [CrossRef]
30. Li, S.J.; Liu, C.H.; Chu, H.P.; Mersmann, H.J.; Ding, S.T.; Chu, C.H.; Chen, C.Y. The high-fat diet induces myocardial fibrosis in the metabolically healthy obese minipigs—The role of ER stress and oxidative stress. *Clin. Nutr.* **2017**, *36*, 760–767. [CrossRef]
31. Noyan-Ashraf, M.H.; Shikatanı, E.A.; Schuiki, I.; Mukovozov, I.; Wu, J.; Li, R.K.; Volchuk, A.; Robinson, L.A.; Billia, F.; Drucker, D.J.; et al. A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity. *Circulation* **2013**, *127*, 74–85. [CrossRef]
32. Wu, S.; Zou, M.H. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in the heart. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *662*, 201–212. [CrossRef] [PubMed]
33. Rivera-Barahona, A.; Alonso-Barroso, E.; Perez, B.; Murphy, M.P.; Richard, E.; Desviat, L.R. Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *122*, 43–50. [CrossRef] [PubMed]
34. Martínez-Martínez, E.; Miana, M.; Jurado-López, R.; Bartolome, M.V.; Souza Neto, F.V.; Salas, M.; López-Andrés, N.; Cachofeiro, V. The potential role of leptin in the vascular remodeling associated with obesity. *Int. J. Obes.* **2014**, *38*, 1565–1572. [CrossRef] [PubMed]
35. Wang, M.; Murdoch, C.E.; Brewer, A.C.; Ivetic, A.; Evans, P.; Shah, A.M.; Zhang, M. Endothelial NADPH oxidase 4 protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis and inflammation. *ESC Heart Fail.* **2021**, *8*, 1427–1437. [CrossRef]
36. Broekmans, K.; Giesen, J.; Menges, L.; Koesling, D.; Russwurm, M. Angiotensin II-Induced Cardiovascular Fibrosis Is Attenuated by NO-Sensitive Guanylyl Cyclase1. *Cells* **2020**, *9*, 2436. [CrossRef]
37. Martínez-Martínez, E.; Brugnolaro, C.; Ibarrola, J.; Ravassa, S.; Buonafina, M.; Lopez, B.; Fernandez-Celis, A.; Querejeta, R.; Satamaria, E.; Fernandez-Irigoyen, J.; et al. CT-1 (Cardiotrophin-1)-Gal-3 (Galectin-3) Axis in Cardiac Fibrosis and Inflammation. *Hypertension* **2019**, *73*, 602–611. [CrossRef]
38. Martínez-Martínez, E.; Buonafina, M.; Boukhalfa, I.; Ibarrola, J.; Fernandez-Celis, A.; Kolkhof, P.; Rossignol, P.; Girerd, N.; Mulder, P.; Lopez-Andrés, N.; et al. Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction through NFKappaB Pathway. *Hypertension* **2017**, *70*, 1148–1156. [CrossRef]
39. Ferreira, J.P.; Machu, J.L.; Girerd, N.; Jaisser, F.; Thum, T.; Butler, J.; Gonzalez, A.; Diez, J.; Heymans, S.; McDonald, K.; et al. Rationale of the FIBROTARGETS study designed to identify novel biomarkers of myocardial fibrosis. *ESC Heart Fail.* **2018**, *5*, 139–148. [CrossRef]
40. Safar, M.E.; Czernichow, S.; Blacher, J. Obesity, arterial stiffness, and cardiovascular risk. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, S109–S111. [CrossRef]
41. Chen, Z.W.; Qian, J.Y.; Ma, J.Y.; Chang, S.F.; Yun, J.; Jin, H.; Sun, A.J.; Zou, Y.Z.; Ge, J.B. TNF-alpha-induced cardiomyocyte apoptosis contributes to cardiac dysfunction after coronary microembolization in mini-pigs. *J. Cell Mol. Med.* **2014**, *18*, 1953–1963. [CrossRef]
42. Su, Q.; Li, L.; Sun, Y.; Yang, H.; Ye, Z.; Zhao, J. Effects of the TLR4/Myd88/NF-kappaB Signaling Pathway on NLRP3 Inflammation in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury. *Cell Physiol. Biochem.* **2018**, *47*, 1497–1508. [CrossRef]
43. Martínez-Martínez, E.; López-Andrés, N.; Jurado-López, R.; Rousseau, E.; Bartolome, M.V.; Fernandez-Celis, A.; Rossignol, P.; Islas, F.; Antequera, A.; Prieto, S.; et al. Galectin-3 Participates in Cardiovascular Remodeling Associated with Obesity. *Hypertension* **2015**, *66*, 961–969. [CrossRef]
44. Zhou, Y.; Long, M.Y.; Chen, Z.Q.; Huang, J.W.; Qin, Z.B.; Li, L. Downregulation of miR-181a-5p alleviates oxidative stress and inflammation in coronary microembolization-induced myocardial damage by directly targeting XIAP. *J. Geriatr. Cardiol.* **2021**, *18*, 426–439. [PubMed]
45. Orlandi, M.; Masi, S.; Bhowruth, D.; Leira, Y.; Georgiopoulos, G.; Yellon, D.; Hingorani, A.; Chiesa, S.T.; Hausenloy, D.J.; Deanfield, J.; et al. Remote Ischemic Preconditioning Protects against Endothelial Dysfunction in a Human Model of Systemic Inflammation: A Randomized Clinical Trial. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41*, e417–e426. [CrossRef] [PubMed]
46. Marseglia, L.; Manti, S.; D'Angelo, G.; Nicotera, A.; Parisi, E.; Rosa, G.D.; Gitto, E.; Arrigo, T. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *16*, 378–400. [CrossRef] [PubMed]
47. McNulty, M.; Mahmud, A.; Spiers, P.; Feely, J. Collagen type-I degradation is related to arterial stiffness in hypertensive and normotensive subjects. *J. Hum. Hypertens.* **2006**, *20*, 867–873. [CrossRef]
48. Johnston, E.F.; Gillis, T.E. Transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1) stimulates collagen synthesis in cultured rainbow trout cardiac fibroblasts. *J. Exp. Biol.* **2017**, *220*, 2645–2653. [PubMed]
49. Duncan, M.R.; Frazier, K.S.; Abramson, S.; Williams, S.; Klapper, H.; Huang, X.; Grotendorst, G.R. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: Down-regulation by cAMP. *FASEB J.* **1999**, *13*, 1774–1786. [CrossRef]
50. Roy Sarkar, S.; Banerjee, S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J. Neuroimmunol.* **2019**, *328*, 98–104. [CrossRef]
51. Wu, S.; Liu, X.; Jiang, R.; Yan, X.; Ling, Z. Roles and Mechanisms of Gut Microbiota in Patients with Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 650047. [CrossRef]
52. Muscogiuri, G.; Cantone, E.; Cassarano, S.; Tuccinardi, D.; Barrea, L.; Savastano, S.; Colao, A.; on behalf of the Obesity Programs of nutrition, Education Research Assessment Group. Gut microbiota: A new path to treat obesity. *Int. J. Obes. Suppl.* **2019**, *9*, 10–19. [CrossRef]

53. Leocadio, P.C.L.; Oria, R.B.; Crespo-Lopez, M.E.; Alvarez-Leite, J.I. Obesity: More Than an Inflammatory, an Infectious Disease? *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 3092. [[CrossRef](#)]
54. Boulange, C.L.; Neves, A.L.; Chilloux, J.; Nicholson, J.K.; Dumas, M.E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* **2016**, *8*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fujii, J.; Homma, T.; Kobayashi, S.; Seo, H.G. Mutual interaction between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of diseases specifically focusing on non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Biol. Chem.* **2018**, *9*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Bhandary, B.; Marahatta, A.; Kim, H.R.; Chae, H.J. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *14*, 434–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Cao, S.S.; Kaufman, R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 396–413. [[CrossRef](#)]
58. Escribano-Lopez, I.; Banuls, C.; Diaz-Morales, N.; Iannantuoni, F.; Rovira-Llopis, S.; Gomis, R.; Rocha, M.; Hernandez-Mijares, A.; Murphy, M.P.; Victor, V.M. The Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ Modulates Mitochondrial Function and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic beta Cells Exposed to Hyperglycaemia. *Cell Physiol. Biochem.* **2019**, *52*, 186–197.
59. Fu, H.Y.; Okada, K.; Liao, Y.; Tsukamoto, O.; Isomura, T.; Asai, M.; Okuda, K.; Asano, Y.; Sanada, S.; Asanuma, H.; et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* **2010**, *122*, 361–369. [[CrossRef](#)]
60. Gregor, M.F.; Yang, L.; Fabbri, E.; Mohammed, B.S.; Eagon, J.C.; Hotamisligil, G.H.; Klein, S. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* **2009**, *58*, 693–700. [[CrossRef](#)]
61. Ozcan, U.; Yilmaz, E.; Ozcan, L.; Furuhashi, M.; Vaillancourt, E.; Smith, R.O.; Gorgun, C.Z.; Hotamisligil, G.S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **2006**, *313*, 1137–1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Garcia, N.; Zazueta, C.; Aguilera-Aguirre, L. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 5853238. [[CrossRef](#)]
63. Martin, R.; Miana, M.; Jurado-Lopez, R.; Martinez-Martinez, E.; Gomez-Hurtado, N.; Delgado, C.; Bartolome, M.V.; San Roman, J.A.; Cordoba, C.; Lahera, V.; et al. DIOL triterpenes block profibrotic effects of angiotensin II and protect from cardiac hypertrophy. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41545. [[CrossRef](#)]
64. Wang, W.; Huang, X.R.; Canlas, E.; Oka, K.; Truong, L.D.; Deng, C.; Bhowmick, N.A.; Ju, W.; Bottinger, E.P.; Lan, H.Y. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 1032–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Cabandugama, P.K.; Gardner, M.J.; Sowers, J.R. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Obesity and Hypertension: Roles in the Cardiorenal Metabolic Syndrome. *Med. Clin. N. Am.* **2017**, *101*, 129–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Menikdiwela, K.R.; Ramalingam, L.; Allen, L.; Scoggins, S.; Kalupahana, N.S.; Moustaid Moussa, N. Angiotensin II Increases Endoplasmic Reticulum Stress in Adipose Tissue and Adipocytes. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8481. [[CrossRef](#)]
67. Ha, T.S.; Park, H.Y.; Seong, S.B.; Altun, H.Y. Angiotensin II induces endoplasmic reticulum stress in podocyte, which would be further augmented by PI3-kinase inhibition. *Clin. Hypertens* **2015**, *21*, 13. [[CrossRef](#)]
68. Ramalingam, L.; Sopontammarak, B.; Menikdiwela, K.R.; Moustaid-Moussa, N. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Part Mediates Effects of Angiotensin II in Pancreatic Beta Cells. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2020**, *13*, 2843–2853. [[CrossRef](#)]
69. Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. ER stress and its functional link to mitochondria: Role in cell survival and death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004424. [[CrossRef](#)]
70. Chen, Q.; Thompson, J.; Hu, Y.; Das, A.; Lesnfsky, E.J. Metformin attenuates ER stress-induced mitochondrial dysfunction. *Transl. Res.* **2017**, *190*, 40–50. [[CrossRef](#)]
71. da Silva-Bertani, D.C.T.; Vileigas, D.F.; Mota, G.A.F.; de Souza, S.L.B.; Sant'Ana, P.G.; Freire, P.P.; de Tomasi, L.C.; Correa, C.R.; Padovani, C.R.; Fernandes, T.; et al. Increased angiotensin II from adipose tissue modulates myocardial collagen I and III in obese rats. *Life Sci.* **2020**, *252*, 117650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## The interplay of mitochondrial oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in cardiovascular fibrosis in obese rats

Francisco V Souza-Neto<sup>1†</sup>, Sara Jiménez-González<sup>1†</sup>, Beatriz Delgado-Valero<sup>1</sup>, Raquel Jurado-López<sup>1</sup>, Marie Genty<sup>1</sup>, Ana Romero-Miranda<sup>1</sup>, Cristina Rodríguez<sup>2,3,4</sup>, Maria Luisa Nieto<sup>4,5</sup>, Ernesto Martínez-Martínez<sup>1,4,\*</sup> and Victoria Cachofeiro<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid-Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, Spain. franvasc@ucm.es (F.V.S-N.); saraji02@ucm.es (S. J-G.); beadel02@ucm.es (B.D-V.); rajurado@ucm.es (R.J-L.); marie.gentygau@gmail.com (M.G.); anarom12@ucm.es (A. R-M.).

<sup>2</sup> Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. crodriguez@santpau.cat (C.R.).

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IB Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain.

<sup>4</sup> Ciber de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Instituto de Biología y Genética Molecular, CSIC-Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain. ml.nieto@csic.es (M.L.N.).

\* These authors contributed equally to this work. Correspondence: ermarti@ucm.es; Tel.: +34 913941483 (E.M-M.); vcara@ucm.es; Tel: +34 913941489 (V.C.).

† These authors contributed equally to this study.

This file includes:

1 supplemental table

6 supplemental figures

## SUPPLEMENTAL TABLES

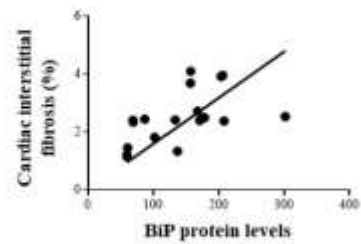
Table S1. Primers used in real time PCR analysis

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')
<i>Col 1a1</i>	Forward	GCCTCCCAGAACATCACCTA
	Reverse	ATGCTGTCTTGCCCCAAGT
<i>Tgf-β</i>	Forward	CAGAAGTTGGCATGGTAGCC
	Reverse	TGCTTCAGCTCCACAGAGAA
<i>Hprt</i>	Forward	AGGACCTCTCGAAGTGT
	Reverse	ATTCAAATCCCTGAAGTACTCAT

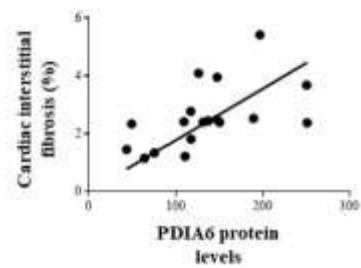
*Col1a1*: Collagen type I; *Tgf-β*: Transforming growth factor-beta and *Hprt*: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.

## SUPPLEMENTAL FIGURES

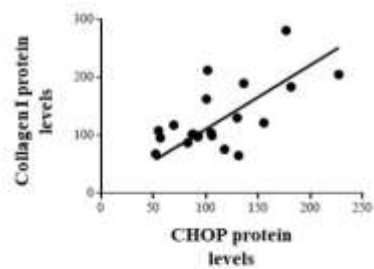
A



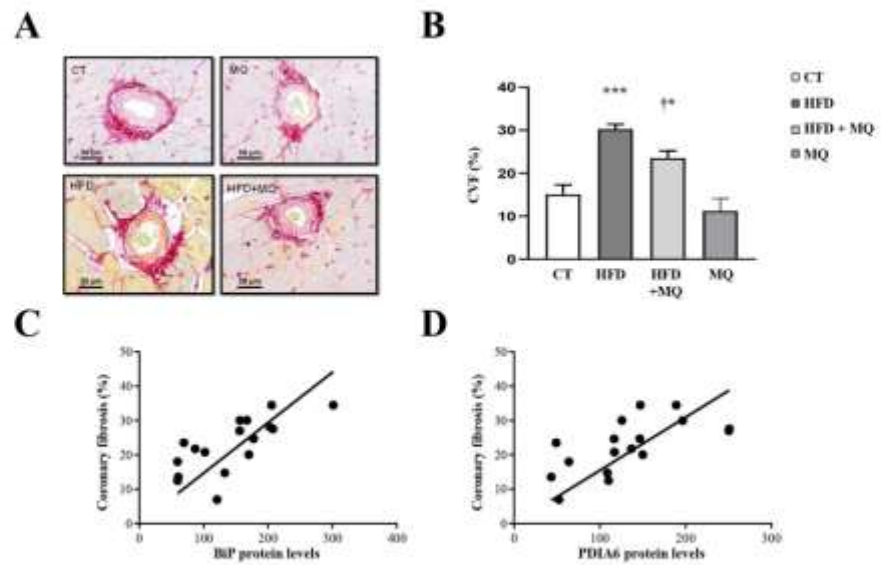
B



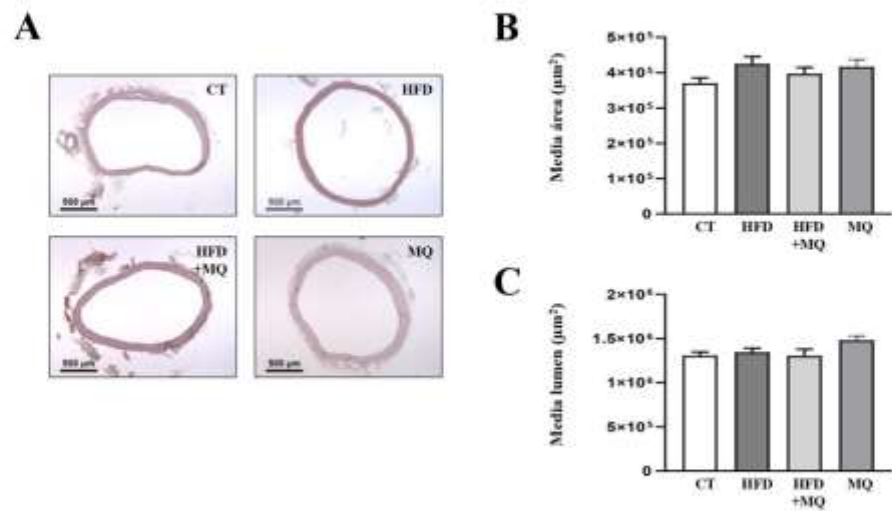
C



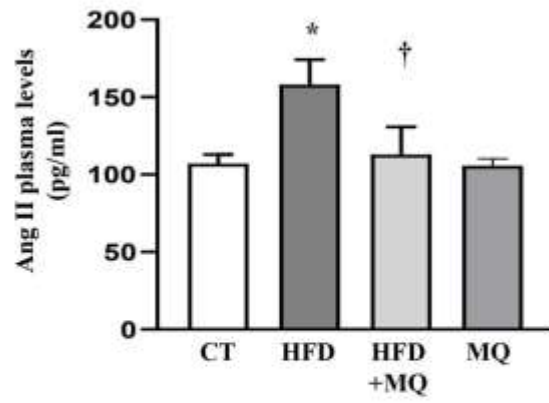
**Figure S1. Correlations observed between cardiac fibrosis and endoplasmic reticulum stress.** Direct correlation between cardiac interstitial fibrosis and (A) immunoglobulin binding protein (BiP;  $r=0.5475$ ;  $p=0.0187$ ); (B) protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6;  $r=0.5534$ ;  $p=0.0172$ ) protein expression in all animals. (C) Direct correlation between cardiac CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) and collagen type I protein expression in all animals ( $r=0.6385$ ;  $p=0.0018$ ).



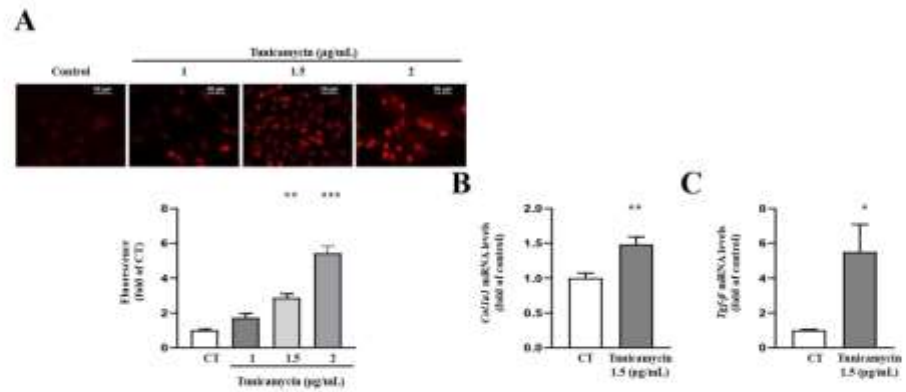
**Figure S2. Mitochondrial oxidative stress mediates the fibrosis of the media of the descending coronary artery.** (A) Representative microphotographs of cardiac sections staining with picrosirius red and (B) quantification of collagen volume fraction in the media of the coronary artery from control rats fed a normal chow (CT) and rats fed a high fat diet (HFD) treated with vehicle or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Scale bar: 50  $\mu$ m. Bars graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 6-8 animals. \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 vs. control group. † $p$ <0.05 vs. HFD group. Direct correlation between coronary media fibrosis and (C) immunoglobulin binding protein (BiP;  $r=0.7207$ ;  $p=0.0011$ ); (D) protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6;  $r=0.6460$ ;  $p=0.0051$ ) protein expression in all animals.



**Figure S3. Vascular morphology of aorta in the animals.** (A) Representative microphotographs of aortas stained with hematoxylin/eosin. (B) Media and (C) lumen area from control rats fed a normal chow (CT) and rats fed a high fat diet (HFD) treated with vehicle or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200 µM). Scale bar: 500 µm. Bars graphs represent the mean ± SEM of 6-8 animals.



**Figure S4. Angiotensin (Ang II) plasma levels** from control rats fed a normal chow (CT) and rats fed a high fat diet (HFD) treated with vehicle or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Bars graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 5-8 animals. \* $p < 0.05$  vs. control group. † $p < 0.05$  vs. HFD group.



**Figure S5. Endoplasmic reticulum stress increases oxidative stress and extracellular matrix markers in vascular smooth muscle cells.** Effects of the endoplasmic reticulum stress inductor, tunicamycin (1-2 µg/mL) on superoxide anion production. **(A)** Representative microphotographs and quantification of cells labelled with the oxidative dye dihydroethidium (magnification 40X). mRNA levels of **(B)** collagen type I (*Col 1a1*), and **(C)** transforming growth factor-beta (*Tgf-β*) in vascular smooth muscle cells treated with tunicamycin (1.5 µg/mL) for 24 hours. Bars graphs represent the mean ± SEM of four to six assays normalized for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT). \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. control cells.

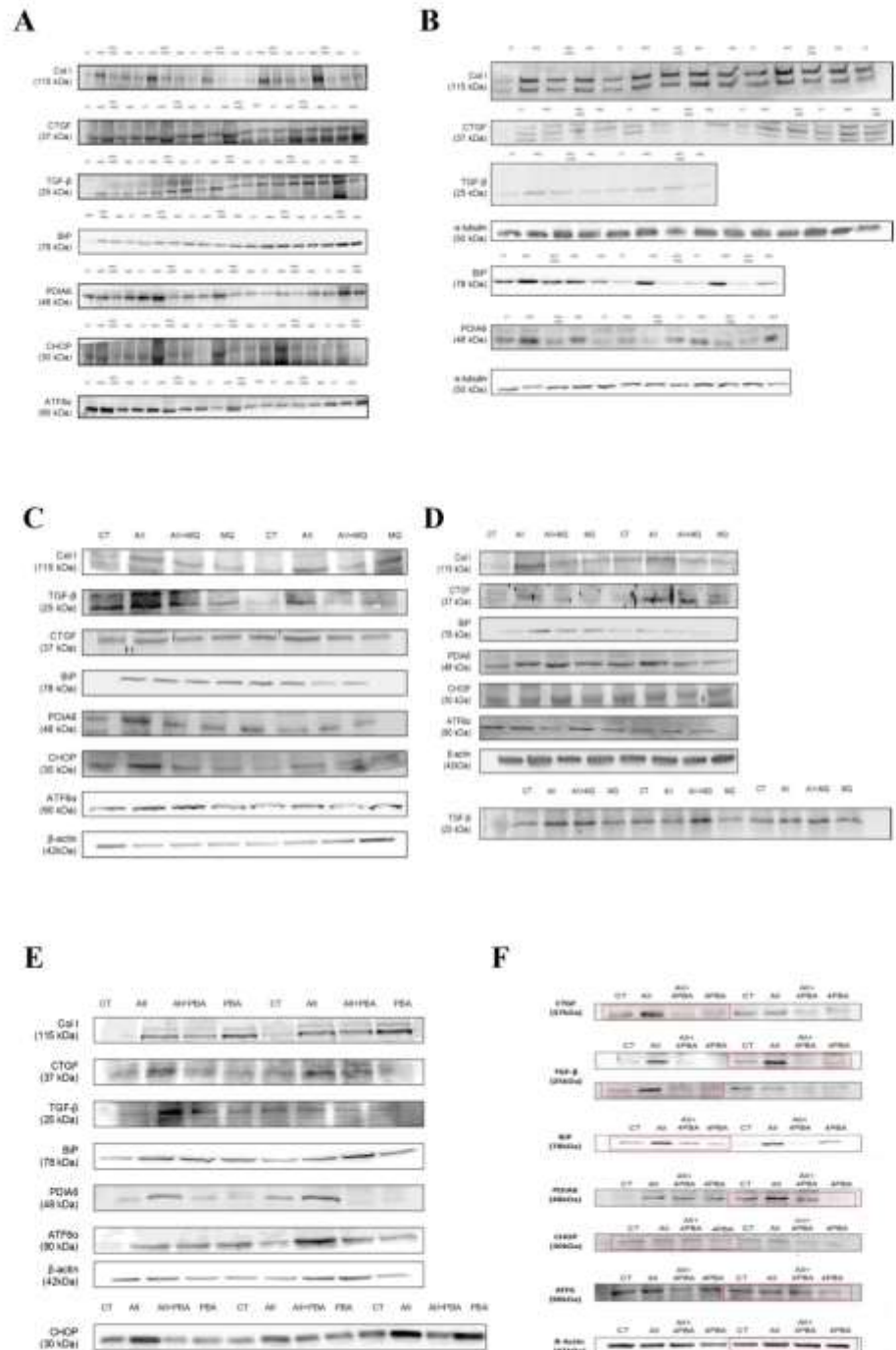
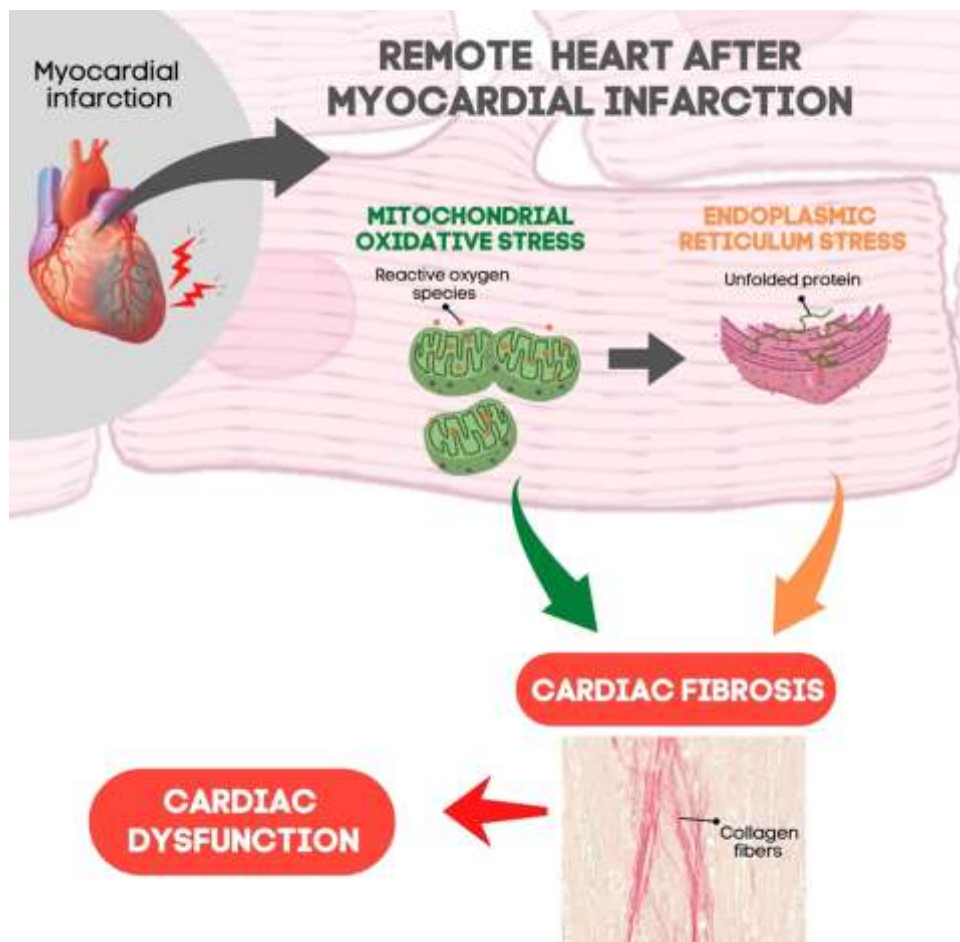


Figure S6. Original blots corresponding to (A) Figure 1; (B) Figure 2; (C) Figure 3; (D) Figure 4; (E) Figure 5 and (F) Figure 6.

**Trabajo nº 2: Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Cardiac Remodeling in Myocardial Infarction through the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress.**

Graphical Abstract



Article

# Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Cardiac Remodeling in Myocardial Infarction through the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress

Francisco V. Souza-Neto <sup>1,†</sup>, Fabian Islas <sup>2,†</sup>, Sara Jiménez-González <sup>1</sup>, María Luaces <sup>2</sup>, Bunty Ramchandani <sup>3</sup>, Ana Romero-Miranda <sup>1</sup>, Beatriz Delgado-Valero <sup>1</sup>, Elena Roldan-Molina <sup>4</sup>, Melchor Saiz-Pardo <sup>5,6</sup>, M<sup>a</sup> Ángeles Cerón-Nieto <sup>5</sup>, Luis Ortega-Medina <sup>4,5,6</sup>, Ernesto Martínez-Martínez <sup>1,7,\*</sup> and Victoria Cachafeiro <sup>1,7,\*</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; franvasc@ucm.es (F.V.S.-N.); sarajil@ucm.es (S.J.-G.); anarom12@ucm.es (A.R.-M.); beadel02@ucm.es (B.D.-V.)
- <sup>2</sup> Servicio de Cardiología, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain; fabianislas@salud.madrid.org (F.I.); mluaacs@salud.madrid.org (M.L.)
- <sup>3</sup> Servicio de Cirugía Cardíaca Infantil, Hospital La Paz, 28046 Madrid, Spain; bunty.r@salud.madrid.org
- <sup>4</sup> Biobanco del Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación de Salud del Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain; elenamilagrosa.molina@salud.madrid.org (E.R.-M.); luis.ortega@salud.madrid.org (L.O.-M.)
- <sup>5</sup> Departamento de Patología, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain; melchor.saiz@salud.madrid.org (M.S.-P.); nines.ceron@salud.madrid.org (M.A.C.-N.)
- <sup>6</sup> Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
- <sup>7</sup> Ciber de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCIV), Instituto de Salud Carlos III, 28222 Majadahonda, Spain
- \* Correspondence: emmarti@ucm.es (E.M.-M.); vcara@ucm.es (V.C.); Tel.: +34-91-3941483 (E.M.-M.); +34-91-3941489 (V.C.)
- † These authors contributed equally to this study.



**Citation:** Souza-Neto, F.V.; Islas, F.; Jiménez-González, S.; Luaces, M.; Ramchandani, B.; Romero-Miranda, A.; Delgado-Valero, B.; Roldan-Molina, E.; Saiz-Pardo, M.; Cerón-Nieto, M.A.; et al. Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Cardiac Remodeling in Myocardial Infarction through the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1232. <https://doi.org/10.3390/antiox11071232>

Academic Editors: Stanley Omaye and Marina Politi Okoshi

Received: 9 May 2022  
Accepted: 20 June 2022  
Published: 23 June 2022

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



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** We have evaluated cardiac function and fibrosis in infarcted male Wistar rats treated with MitoQ (50 mg/kg/day) or vehicle for 4 weeks. A cohort of patients admitted with a first episode of acute MI were also analyzed with cardiac magnetic resonance and T1 mapping during admission and at a 12-month follow-up. Infarcted animals presented cardiac hypertrophy and a reduction in the left ventricular ejection fraction (LVEF) and E- and A-waves (E/A) ratio when compared to controls. Myocardial infarction (MI) rats also showed cardiac fibrosis and endoplasmic reticulum (ER) stress activation. Binding immunoglobulin protein (BiP) levels, a marker of ER stress, were correlated with collagen I levels. MitoQ reduced oxidative stress and prevented all these changes without affecting the infarct size. The LVEF and E/A ratio in patients with MI were  $57.6 \pm 7.9\%$  and  $0.96 \pm 0.34$ , respectively. No major changes in cardiac function, extracellular volume fraction (ECV), or LV mass were observed at follow-up. Interestingly, the myeloperoxidase (MPO) levels were associated with the ECV in basal conditions. BiP staining and collagen content were also higher in cardiac samples from autopsies of patients who had suffered an MI than in those who had died from other causes. These results show the interactions between mitochondrial oxidative stress and ER stress, which can result in the development of diffuse fibrosis in the context of MI.

**Keywords:** cardiac fibrosis; mitochondrial oxidative stress; endoplasmic reticulum stress; myocardial ischemia

## 1. Introduction

Cardiomyocyte necrosis, granulation tissue formation, inflammation, and scar maturation are important events in the healing process after myocardial infarction (MI) [1]. The loss of functional myocardium results in a cardiac remodeling in which fibrosis plays

a central role in the structural changes in the left ventricle (LV) [2,3] as well as in energy metabolism alterations and impaired myocardial perfusion. This cardiac remodeling is produced in the infarcted border zone and remote non-infarcted myocardium, where the accumulation of fibrosis can result in functional consequences [4,5]. All these alterations can attenuate diastolic and systolic functions, producing a significant impact on the quality and quantity of life.

Multiple mechanisms have been proposed as potential players in cardiac remodeling in the context of MI, including oxidative stress. MI triggers excessive reactive oxygen species (ROS) production, especially in response to the reperfusion that is produced in subcellular organelles such as the sarcolemma, endoplasmic reticulum (ER), and especially mitochondria through the electron transport chain [6]. This oxidant environment produces damage to the mitochondria themselves, further facilitating mitochondrial dysfunction. The heart is the most metabolically active organ in the body, which possesses the highest mitochondria content of any tissue and obtains its energy primarily from these. Mitochondrial dysfunction produces cellular energy disruption and oxidative stress, which triggers cardiac cell loss after damage caused by a compromised supply of the energy necessary for reaching the intense demands of the heart [7,8].

The ER is a dynamic cellular organelle with different functions, including  $\text{Ca}^{2+}$  buffering and protein synthesis, folding, and processing, among others [9,10]. In a physiological state, the folding capacity of the ER is not saturated because protein synthesis and folding levels follow a balance. However, in response to excessive oxidative stress, misfolded proteins accumulate in the ER lumen, promoting ER stress and the activation of the unfolded protein response (UPR) in order to normalize and return the balance [10]. This response involves the dissociation of binding immunoglobulin protein (BiP) from three transmembrane proteins. Consequently, an upregulation of BiP is considered to be a marker of ER stress activation [11]. However, it could promote inflammation, cell dysfunction, death, and tissue injury if ER stress is not resolved. ER stress activation is associated with myocardial fibrosis due to its ability to promote fibroblast differentiation to myofibroblasts with an enhanced proliferation capacity and higher synthesis of extracellular matrix (ECM) components [12]. Both the ER and mitochondria can come into contact, thereby forming the mitochondria-ER-associated membranes through which they can coordinate their functions by participating in the regulation of different processes. However, whether these interactions can be relevant for the development of cardiovascular fibrosis in the context of MI is not fully established. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether the crosstalk between mitochondrial oxidative stress and ER stress activation is relevant in the development of cardiac remodeling in the context of MI. Accordingly, we evaluated the effect of the mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ in cardiac fibrosis in MI rats. Additionally, we studied how MitoQ treatment can affect ER stress activation in this pathological context. We also explored the potential relationship between cardiac fibrosis and the activation of ER stress in patients with MI.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animal Model

MI was induced by ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery in 12-week-old male Wistar rats (Envigo, Barcelona, Spain;  $n = 20$  rats), as previously described [5]. A group of animals subjected to a sham operation (the same surgical procedure without the fastening of the suture that passes through the LAD;  $n = 20$  rats) was included as a reference group (CT). Both groups of animals received the mitochondrial antioxidant MitoQ (50 mg/kg/day, equivalent to 200  $\mu\text{M}$ ) in the drinking water for 4 weeks after surgery. The dose of MitoQ was based on previous data [13]. MitoQ was provided by MP Murphy from the Medical Research Council Mitochondrial Biology Unit, Cambridge BioMedical Campus, Cambridge, UK. The body weight, systolic blood pressure (SBP), and cardiac structure and function were measured at the end of the evolution period. The SBP was estimated through use of a tail-cuff plethysmograph (Cibertec, Madrid, Spain) in

unrestrained rats. At the end of the experiment, serum and plasma were collected. The Animal Care and Use Committee of Universidad Complutense de Madrid and Dirección General de Medio Ambiente, Comunidad de Madrid, Spain, approved all experimental procedures (PROEX 121/18).

### 2.2. Cardiac Function Measurement

Cardiac function was evaluated by transthoracic echocardiography with a Vivid-I (General Electric Healthcare, Boston, MA, USA) connected to a 12 MHz transducer. Then, 2D-guided M-mode recordings were made from short-axis views at the level of the papillary muscles to measure the left ventricular (LV) chamber end-diastolic dimensions, interventricular septum, and posterior wall thickness. The mean measurements from several consecutive beats were used for the data analysis. The end-diastolic diameter (EDD) and end-systolic diameter (EDS) were used to calculate the left ventricular ejection fraction (LVEF) and the fractional shortening (FS). The LVEF was calculated in percentage according to the Teicholz formula:  $(EDD^3 \times 7)/(2.4 + EDD)$ , and the LV systolic chamber function was determined from the LV endocardial FS. The FS was calculated in percentage according to the formula:  $(EDD - EDS)/EDD$ . The diastolic function was assessed by the early and late transmitral peak diastolic flow velocity (E and A waves), and the ratio between E-waves and A-waves (E/A) was calculated. The images were processed with the Echopack software v. 201 (General Electric Healthcare, Boston, MA, USA).

The LV mass and infarct size were defined by magnetic resonance imaging (MRI). Both the LV mass and myocardial deformation parameters such as the radial strain and circumferential strain were analyzed in basal, medial, and apical short axis slices from steady state free precession images using a 17-segment model. The MRI study was performed with a Biospec BMT 47/40 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) located at the NMR Center of the Universidad Complutense de Madrid that was equipped with a 12 cm gradient system and connected to a 1025 SAM monitoring and a gating system (SA Instruments, Inc., New York, NY, USA), as is previously described [5]. The images were processed with the MEDIS SUITE MR software (Medis Medical Imaging Systems, Leiden, The Netherlands).

### 2.3. Morphological and Histological Evaluation

Cardiac tissue samples were dehydrated, embedded in paraffin, and cut in 4  $\mu$ m thick sections. The sections were stained with picosirius red in order to detect collagen fibers. The area of cardiac interstitial fibrosis was identified as the ratio of interstitial fibrosis or collagen deposition to the total tissue area after excluding the vessel area from the region of interest. For each sample, 10 to 15 fields were analyzed with a 40 $\times$  objective under transmitted light microscopy (Leica DM 2000; Leica AG, Wetzlar, Germany). The cross-sectional area was measured in myocytes along the left ventricle (60–80 per animal) with visible nuclei, and intact cellular membranes were chosen for the determination of the cross-sectional area in hematoxylin and eosin staining sections with a 40 $\times$  objective under transmitted light microscopy (Leica DM 2000) in three different sections. A quantitative analysis was performed using an analysis system (Leica LAS 4.3; Leica AG, Wetzlar, Germany).

### 2.4. Measurement of Cardiac Reactive Oxygen Species (ROS) Levels

For the detection of total superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) levels, cardiac sections (14  $\mu$ m) were incubated with dye dihydroethidium (DHE;  $10^{-5}$  M) for 30 min at 37  $^\circ$ C. DHE is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence. The oxidation products become highly fluorescent upon binding to nucleic acids. The fluorescent signals were viewed using a fluorescent laser scanning microscope (40 $\times$  objective in a Leica DMI 3000 microscope; Leica AG, Wetzlar, Germany). The quantitative analysis of  $O_2^{\cdot -}$  production was performed using an image analyzer (Leica LAS 4.3; Leica AG, Wetzlar, Germany). Three sections per animal were quantified and averaged for each experimental condition. The mean

fluorescence densities in the target region were analyzed. The results are expressed as n-fold increases over the values of the control group in arbitrary units.

### 2.5. Western Blot Analysis

Total cardiac proteins from the non-infarcted area were separated by SDS-PAGE on 4–15% polyacrylamide gels and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Hybond-P; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) with the Trans-Blot Turbo Transfer System. Membranes were probed with primary antibodies for activating transcription factor 4 (ATF4; Proteintech, Rosemont, IL, USA; dilution:1:1000; Ref: 10835-1-AP), activating transcription factor 6 alpha, (ATF6 $\alpha$ ; Santa Cruz, Dallas, TX, USA; dilution: 1:250; Ref: sc-166659), binding immunoglobulin protein (BIP; BD Biosciences, Madrid, Spain; dilution 1:1000; Ref: 610978), calpain 1 (Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:1000; Ref: ab39170), calreticulin (CALRT; Cambridge, UK; dilution 1:1000; Ref: ab92516), CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; dilution 1:500; Ref: #2895), collagen I (Calbiochem, San Diego, CA, USA; dilution 1:1000; Ref: 234167), connective tissue growth factor (CTGF; Sigma-Aldrich, Cambridge, UK; dilution 1:1000; Ref: C4871), cyclophilin F (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA; dilution 1:500; Ref: Sc-376061), mitofusin 1 (MFN1, Abcam; Cambridge, UK; dilution 1:1000; Ref: ab126575), transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ; Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:500; Ref: ab190503), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Cell Signaling; dilution: 1:5000; Ref: #5174) as a loading control. The signals were detected using the ECL system (Millipore, Burlington, MA, USA). Several proteins were analyzed in the same membrane after a stripping procedure (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; Ref: 21063). The results are expressed as n-fold increases over the values of the control group in arbitrary densitometric units.

### 2.6. Clinical Study

A cohort of 44 patients admitted to a tertiary care center (Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain) with a first episode of acute MI were studied. MI was defined by “The Third Universal Definition of Myocardial Infarction” [14]: an increase in the biomarkers in the presence of ischemia, ST-segment -T wave (ST-T) changes, the appearance of new Q waves, the identification of alterations in local contraction by imaging techniques, or intracoronary thrombus detected by angiography. Twenty-four to forty-eight hours after hospital admission for MI and 12 months after follow-up, patients underwent transthoracic echocardiography, and, at the same time, blood samples were collected. The study protocol was approved by the ethics committee (18/195-E), and all participants signed the informed consent. The present study was conducted in compliance with the good clinical practice guidelines and the ethical principles stated in the Declaration of Helsinki.

### 2.7. Cardiac Function

Transthoracic echocardiographic (TTE) images were acquired according to the cavity quantification guidelines of the American Society of Echocardiography and the European Society of Cardiovascular Imaging [15]. Conventional TTE planes were obtained, such as the parasternal long axis, in which the left ventricle (LV) wall thickness was measured for ventricular mass calculation and classification. In addition, two-chamber (2C), three-chamber (3C), and four-chamber (4C) apical planes were obtained, and the LV end-diastolic (EDV) and end-systolic (ESV) volumes were measured.

The LVEF was calculated from the quantification of the LVEDV and LVESV obtained in the apical 4C and apical 2C planes using the following formula:  $LVEF = (LVEDV - LVESV)/LVEDV$ . Diastolic function was assessed according to the current guideline recommendations as well. Diastolic function was assessed by the early and late transmitral peak diastolic flow velocity (E and A waves), and the ratio between the E-waves and A-waves (E/A) was calculated. The images were processed with the Echopack software v.201 (General Electric Healthcare, Boston, MA, USA).

### 2.8. Myocardial Extracellular Volume Fraction

T1- and T2-weighted sequences were included in the study to detect late gadolinium enhancement (LGE) and edema. Quantitative T1 mapping was performed with modified look-locker inversion-recovery (MOLLI) sequences for the identification and quantification of the extracellular volume in the affected territory and in the territory remote to the infarct [16,17]. The analysis of the cardiac MRI images was performed with Medis Suite MR (Medis Medical Imaging Systems, Leiden, The Netherlands).

### 2.9. Circulating Plasma Levels of Myeloperoxidase (MPO) and BiP

Circulating MPO and BiP levels were measured by sensitive enzyme immunoassays (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Ref: DY3174 and Abxexa, Cambridge, UK; Ref: abx251110, respectively) following the instructions of the manufacturers.

### 2.10. Analysis of Biobank Cardiac Samples. Cardiac Immunohistochemistry of BiP

BiP immunohistochemical staining was measured in LV myocardial tissue obtained from patients who had suffered MI ( $n = 14$ ) from the Hospital Clínico San Carlos biobank. Patients that had died from another cause were used as controls ( $n = 14$ ). Immunostaining was detected using a rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:100) in 4  $\mu\text{m}$  heart sections in samples fixed in buffered formaldehyde and paraffin-embedded using an automated method (Dako Autostainer). After counterstaining with hematoxylin, slides were dehydrated in ascending concentrations of ethanol and mounted. An external negative control was included. A blinded staining evaluation was performed by an experienced pathologist who did not have access to the clinicopathological data. For each sample, 25 fields were analyzed with a 20 $\times$  objective under a transmitted light microscope (Leica DM 2000; Leica AG, Wetzlar, Germany). The area of BiP staining was identified as the ratio of staining to the total tissue area after excluding either the necrotic or vessel areas from the region of interest. The quantitative analysis was performed using an analysis system (Leica LAS 4.3; Leica AG, Wetzlar, Germany). This study was approved by the Medical Ethics Review Committee of Hospital Clínico San Carlos (21/168-E).

### 2.11. Cardiac Collagen Content

Cardiac sections from autopsies from the Hospital Clínico San Carlos biobank were dehydrated, embedded in paraffin, and cut in 4  $\mu\text{m}$  thick sections. The samples were stained with picrosirius red in order to detect collagen fibers. The area of cardiac interstitial fibrosis was identified as the ratio of interstitial fibrosis or collagen deposition to the total tissue area after excluding the vessel area from the region of interest. For each sample, 25 fields were analyzed with a 40 $\times$  objective under a transmitted light microscope (Leica DM 2000; Leica AG, Wetzlar, Germany). The quantitative analysis was performed using an analysis system (Leica LAS 4.3; Leica AG, Wetzlar, Germany).

### 2.12. Statistical Analysis

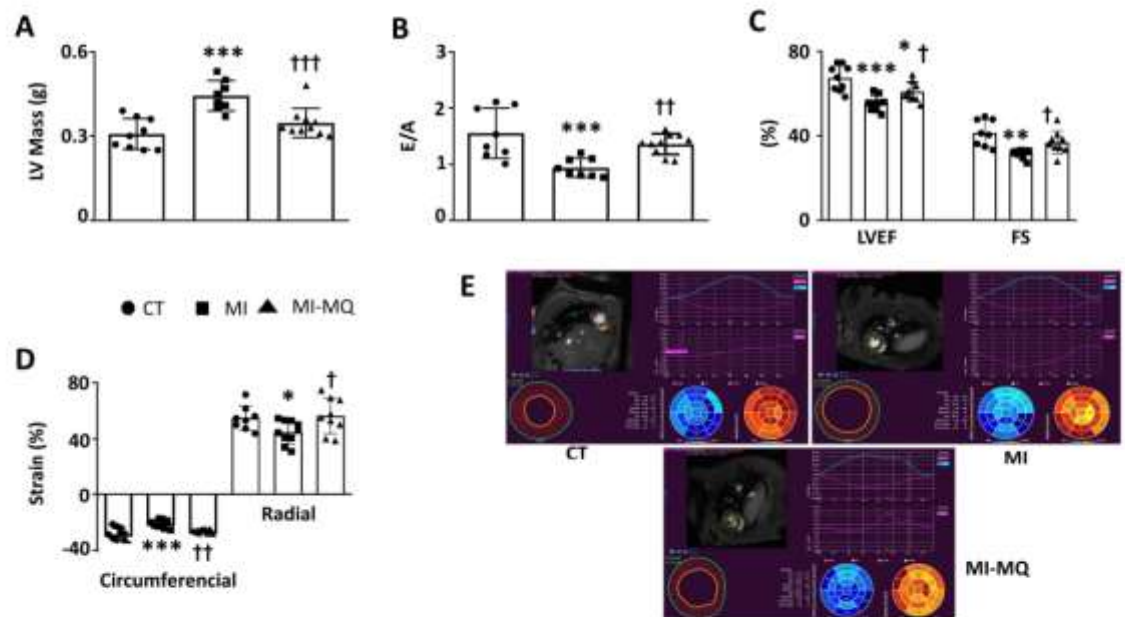
Continuous variables are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). Categorical variables are expressed in absolute values and percentages. The differences between categorical variables were analyzed using the chi-square test. The normality of distributions was verified by means of the Kolmogorov–Smirnov test. In the case of continuous variables, differences between two groups were analyzed by either an unpaired Student's *t*-test or a Mann–Whitney test as the parametric and non-parametric tests, respectively. Specific differences between more groups were analyzed using Kruskal–Wallis tests followed by Dunn's test for variables with non-normal distributions. For variables with normal distributions, a one-way analysis of variance was used followed by a Newman–Keuls test. Either Pearson or Spearman correlation analyses were used to examine the associations among different variables according to whether they were normally distributed. A value of  $p < 0.05$  was used as the cut-off value for defining statistical significance. The data analysis

was performed using the statistical programs GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA) and SPSS version 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3. Results

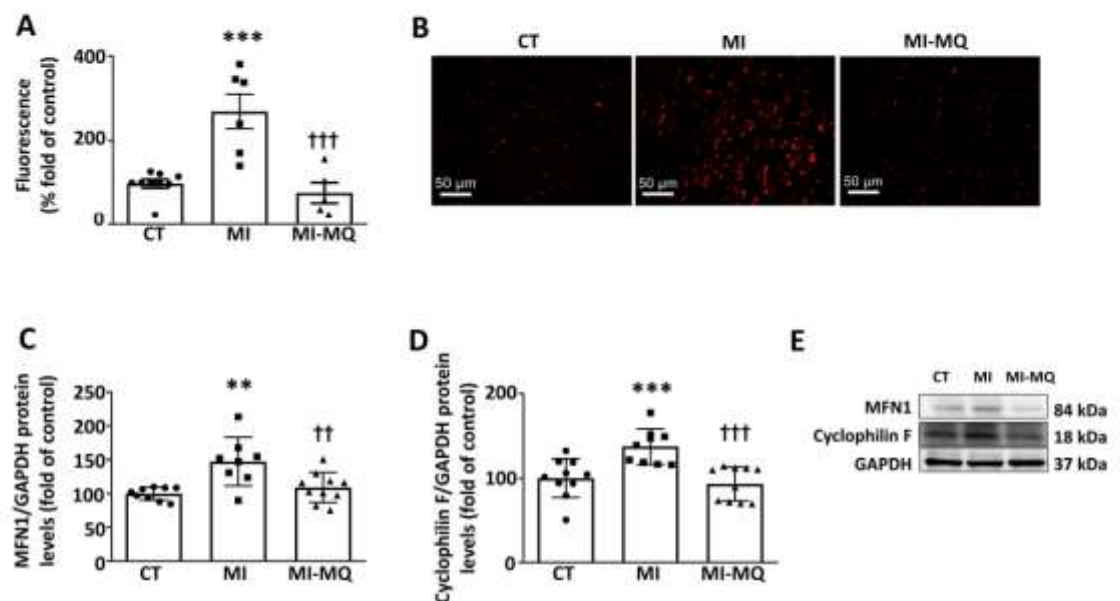
#### 3.1. Animal Study

Body weight and blood pressure were similar in all groups (Table S1). However, MI was associated with increases in the cardiomyocyte cross-sectional area (Figure S1A), relative heart weight (Figure S1B), and left ventricle mass (Figure 1A), suggesting the presence of cardiac hypertrophy. No significant differences were observed in the thickness of either the interventricular septum (IVST) or posterior wall (PWT) between the CT and MI animals (Figure S2A,C). No changes were observed in EDD among any group, although an increase in ESD was observed in the animals with MI, which was prevented by MitoQ (Figure S2B,C). MI rats also showed functional alterations: reductions in the E/A ratio, LVEF, and SF (Figures 1B,C and S3). Moreover, infarcted rats showed a reduction in the circumferential and radial strain (Figure 1D,E). The inhibition of mitochondrial oxidative stress by MitoQ was able to prevent all these changes without any effect on the size of the infarcted area (Table S1). The MitoQ treatment did not affect cardiac function or any other evaluated parameter in the control animals (Figure S4). Therefore, and to simplify the results, only CT and MI rats treated with vehicle or MitoQ (MI-MQ) will be considered here.



**Figure 1.** Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac structural and functional alterations in infarcted rats. (A) Left ventricle mass; (B) E-wave and A-wave ratio (E/A); (C) left ventricle ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (FS); (D) circumferential and radial strain; (E) representative image depicting myocardial segmentation and data analysis for global circumferential and radial strain evaluation using feature-tracking CMR imaging in control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/kg/day). Bar graphs represent the means  $\pm$  SD of 8–10 animals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CT group. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. MI group.

MI produced an oxidant environment characterized by an increase in superoxide anion levels (Figure 2A,B) that was prevented by MitoQ, supporting the effectiveness of the treatment (Figure 2A,B). In addition, MitoQ was able to prevent the mitochondrial alterations observed in MI rats, such as the upregulation in mitofusin 1(MFN1) and cyclophilin F levels (Figure 2C,D). Figure S5 shows the original blots corresponding to Figure 2E.

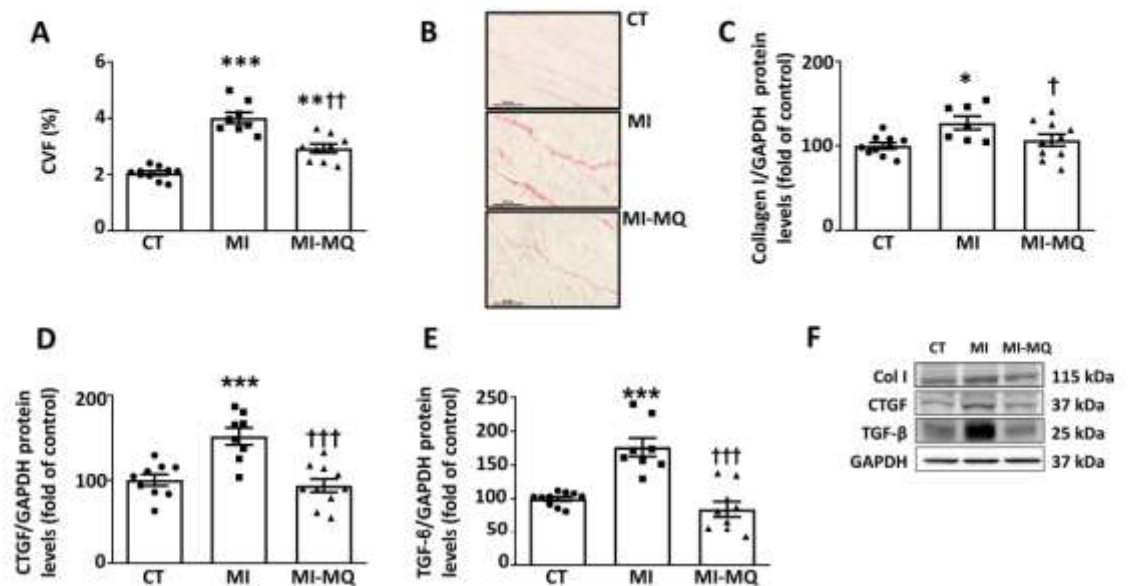


**Figure 2.** Effect of a mitochondrial antioxidant on superoxide anion levels and mitochondrial protein expression in infarcted rats. (A) Quantification of cardiac superoxide anion levels and (B) representative microphotographs of cardiac sections labelled with the oxidative dye dihydroethidium (magnification 40×). Protein levels of (C) mitofusin 1 (MFN1) and (D) cyclophilin F and (E) representative blots for protein expression in cardiac tissue from control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/kg/day). Bars graphs represent the means ± SD of 8–10 animals, normalized for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CT group. ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. MI group.

As expected, MI was associated with diffuse fibrosis (Figure 3A,B) in the LV, which was positively correlated with cardiac oxidative stress levels ( $r = 0.7263$ ;  $p = 0.0022$ ) and ameliorated with MitoQ (Figure 3A,B). The hearts from infarcted rats showed an increase in the protein levels of collagen I, the main component of ECM at the cardiac level. An increase was also observed in the protein levels of the ECM mediators connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in MI animals (Figure 3C–E). The upregulation of all these proteins was prevented in the animals treated with MitoQ (Figure 3C–E). Figure S5 shows the original blots corresponding to Figure 3F.

MI was also accompanied by cardiac ER stress activation, as suggested by an increase in an ER stress marker, BiP (Figure 4A). These levels were associated with those of either fibrosis ( $r = 0.7022$ ;  $p = 0.0024$ ) or collagen I ( $r = 0.7461$ ;  $p = 0.0014$ ). Complementary analyses of different pathways involved in ER stress activation revealed (ATF6 $\alpha$ , CHOP, and ATF4 (Figure 4B–D) upregulation in the hearts of infarcted animals. Treatment with MitoQ was able to prevent ER stress activation as well as the increase in ATF6 $\alpha$ , CHOP, and ATF4 levels (Figure 4A–D). Infarcted rats showed increases in the cardiac levels of both calpain 1 and

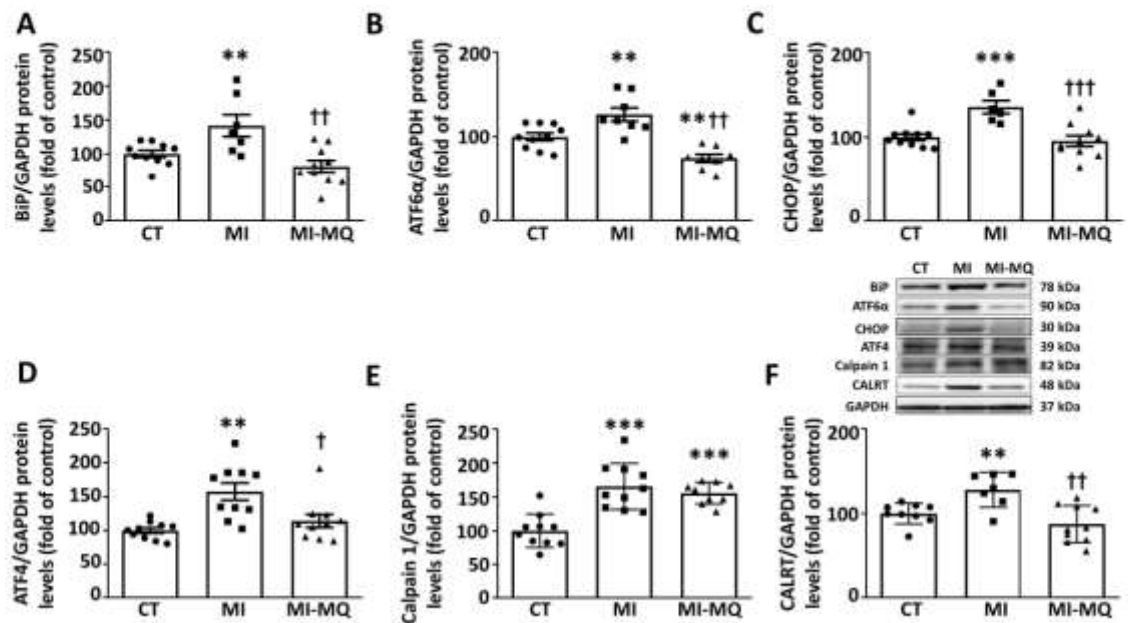
CALRT. The MitoQ treatment was only able to prevent the increase in CALRT (Figure 4E,F). Figure S5 shows the original blots corresponding to Figure 4F.



**Figure 3.** Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac fibrosis in infarcted rats. (A) Quantification of collagen volume fraction (CVF); (B) representative microphotographs of cardiac sections stained with picrosirius red (magnification 40×). Protein levels of (C) collagen type I (Col I), (D) connective tissue growth factor (CTGF), and (E) transforming growth factor-beta (TGF-β) and (F) representative blots for protein expression in cardiac tissue from control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/kg/day). Bars graphs represent the means ± SD of 8–10 animals, normalized for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CT group. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. MI group.

### 3.2. Clinical Study

The mean age of patients was  $57.5 \pm 10.1$  years, and 92.7% were male. The majority (95.1%) of patients had associated comorbidities, with the most frequent being overweight or obesity (78%), hypertension (36.6%), dyslipidemia (36.7%), and diabetes mellitus (22.0%). Drug treatment for hypertension included angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin II type 1 receptor antagonists, whereas all dyslipidemic patients were on statins. After the MI, 80% of patients were on beta-blockers, 87.5% were on ACE inhibitors or angiotensin II type 1 receptor antagonists, and 100% were on statins and antiplatelet therapy. All patients underwent a primary percutaneous intervention during admission, and a culprit lesion was treated in all cases with drug-eluting stents. The anterior descending coronary artery was responsible in 61% of cases. The echocardiography findings of patients are shown in Table 1 in basal conditions and after a 12-month follow-up. Patients with MI showed reduced LVEF and E/A ratio values after hospital admission for MI (Table 1). No major changes in cardiac function were observed in the 12-month follow-up (Table 1). However, patients showed reductions in IVST ( $p = 0.046$ ), PWT ( $p < 0.0002$ ), and EDD ( $p = 0.0458$ ) (Table 1) at 12 months after MI.



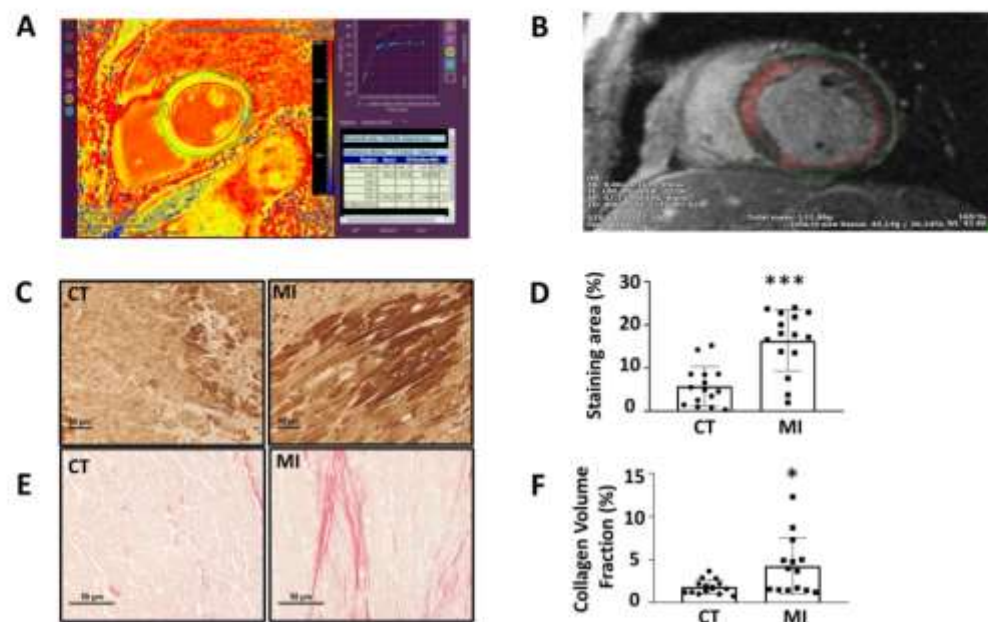
**Figure 4.** Mitochondrial oxidative stress mediates the cardiac activation of endoplasmic reticulum stress in infarcted rats. Protein levels of (A) immunoglobulin binding protein (BiP); (B) activating transcription factor 6 alpha (ATF6α); (C) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP); (D) activating transcription factor 4 (ATF4); (E) calpain 1; and (F) calreticulin (CALRT) in cardiac tissue from control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/kg/day). Bars graphs represent the means ± SD of 8–10 animals, normalized for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CT group. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. MI group.

**Table 1.** Cardiac function, body mass index, and circulating MPO levels in MI patients in basal conditions and 12-month follow-up.

	BASAL	FOLLOW-UP
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.7 ± 3.5	28.1 ± 3.0
IVST (mm)	11.5 ± 0.22	10.9 ± 1.41 *
PWT (mm)	10.8 ± 1.08	9.8 ± 1.01 ***
EDD (mm)	47.8 ± 4.5	48.6 ± 6.2 *
ESD (mm)	33.6 ± 5.6	32.1 ± 7.9
LVEF (%)	57.6 ± 7.9	55.9 ± 9.2
E/A	0.96 ± 0.34	1.05 ± 0.45
ECV (%)	43.4 ± 15.9	42.7 ± 12.7
LV Mass (g)	99.9 ± 15.5	96.1 ± 17.9
Infarcted Mass (g)	20.2 ± 16.1	15.2 ± 10.4 ***
MPO (ng/mL)	41.0 ± 22.2	75.4 ± 56.5 **

BMI: body mass index; IVST: interventricular septum thickness; PWT: posterior wall thickness; EDD: end-diastolic diameter; EDS: end-systolic diameter; LVEF: left ventricle ejection function; E/A: E-wave/A-wave ratio; ECV: extracellular volume fraction; MPO: myeloperoxidase. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. basal period.

Figure 5A,B illustrate representative native T1 and late gadolinium enhancement (LGE) imaging, respectively, in patients with acute MI. It can be appreciated that the areas of signal hyperenhancement in LGE correspond to elevated extracellular volume fractions (ECV).



**Figure 5.** (A) A representative image of T1 map with MOLLI sequences of a patient with acute myocardial infarction; (B) a representative image of LGE quantification. The mean signal intensity was determined by drawing a region of interest (ROI) in a portion of the normal myocardium, and for comparison, a threshold technique was performed using 5 SDs above the mean signal intensity for the normal nulled myocardium. (C) Representative microphotographs of cardiac sections of BiP staining from patients with (MI) or without myocardial infarction (CT); (magnification 20×); (D) quantification of BiP staining in cardiac sections from patients with or without myocardial infarction; (E) representative microphotographs of cardiac sections staining with picrosirius red of patients with or without myocardial infarction (magnification 40×). (F) Quantification of collagen volume fraction (CVF) in cardiac sections of patients with or without myocardial infarction. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CT group.

No changes were found in the follow-up in either the myocardial ECV or LV mass (Table 1), although a significant reduction was observed in the infarcted mass ( $p = 0.0006$ ). Interestingly, a marker of oxidative stress, myeloperoxidase (MPO), was increased after the 12-month follow-up ( $p = 0.0014$ ). It is noteworthy that patients with BMI  $> 25$  had higher levels of MPO at follow-up ( $81.58 \pm 60.76$  vs.  $57.51 \pm 40.62$  ng/mL;  $p = 0.342$ ) and significantly lower LVEF relative to patients with BMI  $< 25$  kg/m<sup>2</sup> ( $57.4 \pm 7.4$  vs.  $64.7 \pm 5.4\%$ ;  $p = 0.009$ ). In addition, MPO levels were associated with myocardial ECV in basal conditions ( $r = 0.375$ ;  $p = 0.05$ ), showing the possible relevance of oxidative stress to ECM production. Circulating BiP levels were not detected in either the basal conditions or in the 12-month follow-up.

### 3.3. Analysis of Biobank Cardiac Samples

Taking into consideration that circulating BiP levels were undetected in patients, we analyzed BiP staining in cardiac sections from autopsies obtained from the Hospital Clínico San Carlos biobank. Most patients were male (57.1% and 71.4% in the control group and

in the MI one, respectively;  $p = 0.4302$ ). There were no significant differences between the two groups in terms of age ( $70.9 \pm 10.8$  vs.  $70.0 \pm 15.4$  years;  $p = 0.8550$ ). In the group of infarcted patients, five of the patients (35.7%) died in the 48 h after MI, three of the patients (21.4%) died in the week after of the ischemic event, and 42.8% of the patients (six of the patients) survived more than 2 weeks after the MI. The main cause of death in the control group was cancer in 50% of the patients. In addition, 31.4% died of non-ischemic cardiovascular disease, three of them (31.4%) died of pulmonary disease, one died of pancreatitis, one died of appendicitis, and one died of drowning.

Figure 5C illustrates the representative BiP staining patterns in cardiac autopsies from the patients with MI and those of control patients. BiP staining was observed in the cytoplasm of cardiac cells and was over-expressed in all patients that suffered an MI, except for two patients who showed minimal expression compared with those of the control group (Figure 5C,D). The hearts from patients that suffered MI not only showed BiP overexpression but also high collagen content levels compared with the controls, except for one who died in the next two hours after suffering the event (Figure 5E,F). The BiP expression and collagen content were associated ( $r = 0.397$ ;  $p = 0.0329$ ), indicating the possible role of ER stress in the development of cardiac fibrosis.

#### 4. Discussion

Our study shows that the administration of the mitochondrial antioxidant MitoQ prevents the development of cardiac fibrosis and the increase in collagen I, TGF- $\beta$ , and CTGF synthesis in rats with MI. In addition, circulating MPO levels, a marker of oxidative stress, were associated with levels of myocardial ECV, a surrogate marker of interstitial fibrosis, in patients that had suffered their first MI. This suggests a role of oxidative stress in the remodeling triggered by myocardial ischemia. The reduction in fibrosis in infarcted rats treated with MitoQ was accompanied by a reduction in the ER stress activation, and these beneficial effects of the mitochondrial antioxidant were reflected by an improvement in systolic and diastolic function in MI rats. Moreover, higher levels of myocardial collagen content were accompanied by the overexpression of BiP in cardiac tissues from autopsies of patients that suffered an MI compared with those who had died from different causes, supporting the participation of ER stress in the development of cardiac fibrosis in the context of myocardial ischemia. Thus, mitochondrial oxidative stress emerges as one of the factors involved in the cardiovascular remodeling associated with myocardial ischemia through the activation of ER stress.

Myocardial fibrosis is a common feature shared by different insults, including myocardial ischemia, which facilitates the development of heart failure by causing contractile dysfunction and arrhythmogenicity [18]. Different studies have shown that a higher degree of fibrosis and lesion size are associated with shorter long-term survival in patients with heart failure and other cardiac pathologies [19,20]. Our data show that patients with acute MI presented with more than 40% of the myocardium occupied by fibrosis, which was accompanied by a reduction in cardiac function. Patients showed some improvement in LV structural changes after the 12-month follow-up. However, neither the ECV nor the cardiac function had significantly improved. These results confirm the relevance of myocardial fibrosis in cardiac function and make it essential to try to reduce the excessive ECM accumulation observed in MI. Twenty percent of the LV was occupied by a necrotic scar in the first days after the event, which was reduced in the 12-month follow-up and could be due to the edema that appears abruptly a few hours after reperfusion [21].

Elevated levels of MPO are predictors of coronary artery disease [22] and the risk of MI [23]. This predictive value is explained through its inflammatory and oxidative actions, reducing the antioxidant defenses. MPO leads to alterations in the redox balance through reductions in antioxidant levels, including those of glutathione [24]. The fact that MPO levels were associated with ECV, a surrogate marker of myocardial diffuse fibrosis [25], suggests the potential role of oxidative stress in the interstitial fibrosis after myocardial ischemia. This suggestion was confirmed in the experimental setting since treatment

with a mitochondrial antioxidant was able to blunt the development of diffuse fibrosis in infarcted rats. Similarly, other preclinical studies have suggested cardioprotective actions of antioxidants, not only in the context of MI but also in the context of obesity [26,27]. However, this beneficial effect has not been clearly supported in the clinical setting, even when data implying the negative association between the oxidative stress balance and LVEF function in patients with heart failure have been reported [28].

In response to ischemia, the myocardium generates ROS, especially after reperfusion [29] with cardiac myocytes and with endothelial cells and neutrophils being the main cells involved in the ROS production through several sources, including mitochondria [30]. Oxidative stress may induce permeability transition pore (mPTP) expression and can consequently trigger mitochondrial permeability. This can amplify ROS production by damaging the surrounding mitochondria and finally cause cellular injury [31]. Our data fit into this scenario because infarcted rats showed parallel increases in oxidative stress and cyclophilin F levels, which play an essential regulatory role in pore opening [32]. In this sense, it has been described that cyclophilin F levels increase in an ROS-dependent manner [33], thereby generating mitochondrial alterations. MFN1 is involved in mitochondrial fusion and, in consequence, in mitochondrial morphology. Previous studies have observed an increase in MFN1 and alterations in its activity in MI and heart failure [34,35]. The cardiac genetic depletion of MFN1 has shown beneficial effects in MI by attenuation of  $Ca^{2+}$  overload and oxidative stress [35]. The MitoQ treatment was able to prevent the increase in cyclophilin F and also the increase in MFN1 protein levels observed in infarcted animals. This supports a reduction in this compensatory mechanism to maintain energetically effective mitochondria in order to ensure cellular homeostasis [36]. MitoQ was able to reduce diffuse fibrosis in rats with MI, which can explain the improvement in diastolic function since a reduced relaxing capability of the heart can increase its filling pressure and contribute to diastolic dysfunction. In addition, MitoQ was able to improve systolic function, as supported by improvements in LVEF, SF, and the circumferential and radial strains, the latter being more sensitive markers of LV function [37]. All these beneficial effects occurred without affecting the infarct size.

Excessive ROS production shifts their regulatory role to a deleterious one. This involves the activation of different mediators, such as TGF- $\beta$  [38], which plays a central role in ECM production through mechanisms that also involve ROS: the activation of fibroblasts to myofibroblasts, with more capacity of ECM production [39] or a reduction in ECM degradation [38]. In agreement, we observed an upregulation of TGF- $\beta$  and of its downstream effector, CTGF, in rats with MI, which was prevented in animals treated with MitoQ. A similar increase in the cardiac levels of both fibrotic mediators was previously reported in this context [40]. Excessive ROS generation, a consequence of an impaired mitochondrial function, perturbs protein folding, resulting in ER stress activation [10]. This can facilitate the development of cardiac fibrosis observed in infarcted rats. This notion is based on the fact that the decrease in oxidative stress levels observed in infarcted MitoQ-treated rats was accompanied by a reduction in both cardiac ER stress activation and fibrosis. Moreover, BiP, a marker of ER stress, was associated with both total fibrosis and collagen I contents in the hearts of infarcted rats. The role of ER stress in the development of fibrosis in the context of myocardial ischemia is further supported by the fact that infarcted hearts showed higher BiP expression than those from patients who died from another cause. Furthermore, the higher BiP expression observed in the cardiac autopsies of MI patients was accompanied by higher collagen levels. In agreement with this, previous studies have reported that ER stress modulation is accompanied by a reduction in cardiac fibrosis in several models of cardiac damage [13,41]. Fibroblasts seem to be the main cell involved in BiP overexpression in infarcted hearts [42]. Our data also suggest that ATF6 $\alpha$  could be one of the pathways involved in the ER modulation of the cardiac fibrosis observed in infarcted rats, a role reported in other pathological contexts [41,43]. In fact, we observed in cardiofibroblasts that the collagen synthesis induced by angiotensin II was accompanied by an overexpression of ATF6 $\alpha$ , which was prevented by the ER stress inhibitor 4-phenylbutyric acid [13].

Our data also showed an overexpression of ATF4 and CHOP down-stream of the PERK pathway in the hearts of infarcted animals, which was reduced in MitoQ-treated animals. ATF4 promotes the expression of CHOP [44], which can play an important role in ER-stress-induced apoptosis in cardiac cells in different pathological contexts [45] through the suppression of the survival protein Bcl2 [46]. However, a potential role in cardiac fibrosis has also been suggested [47]. The beneficial effects of MitoQ on ER stress activation are also reflected in CALRT protein levels. CALRT is one of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding ER chaperones that is upregulated in response to ER stress in the heart [48]. It has been reported that its expression is upregulated during ER stress activation in cardiomyocytes, thus promoting cardiomyopathy, arrhythmia, and the development of heart failure [49]. This can stimulate ECM accumulation through different mechanisms, including the modulation of TGF- $\beta$  actions [50]. In addition, CALRT can mediate ER-stress-induced apoptosis and hypertrophy, which can play a role in cardiac remodeling in the context of myocardial ischemia [48,51].

Our data show that MitoQ was unable to normalize calpain 1 levels, a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent protease present in the cytosol and mitochondria, which contributes to protein processing and degradation. Its expression is enhanced under pathological conditions associated with  $\text{Ca}^{2+}$  overload, including MI, thereby contributing to cardiac injury [52,53] during ischemic conditions [54]. Calpain 1 activation is involved in different processes that occur in response to myocardial ischemia, including cytoskeletal remodeling, cell-cell adhesion disassembly, and cardiomyocyte death [55]. Its overexpression promotes impaired mitochondrial function, apoptosis, and pathological remodeling, whereas its inhibition has been shown to promote beneficial effects in MI [52,53].

## 5. Conclusions

In summary, we have demonstrated that the cardiac functional alterations, remodeling, and fibrosis observed after MI were accompanied by oxidative stress and ER stress activation in rats. The inhibition of mitochondrial oxidative stress with MitoQ prevented all these alterations. In the clinical context, we have found an association between ECV and the plasma levels of a marker of oxidative stress, MPO. Moreover, an association between markers of ER stress and fibrosis was found in sections of infarcted hearts from patients. All these data suggest that ER stress activation can mediate, at least in part, the role of oxidative stress in the remodeling that occurs after MI by facilitating the development of diffuse cardiac fibrosis.

## 6. Limitations

Some limitations of the present study deserve to be briefly mentioned. We were unable to measure circulating BiP levels in patients that suffered their first MI. Therefore, the lack of evaluation of the possible association with myocardial fibrosis and cardiac function as well as how they follow-up one year later represents a limitation of our study. However, the samples obtained from autopsies demonstrated that cardiac BiP levels were higher in patients that had suffered an MI than those who had not. Moreover, the BiP levels were associated with myocardial fibrosis, supporting the role of ER stress in the development of myocardial fibrosis in the context of MI. Although we measured radial and circumferential strain in the experimental study, the lack of data regarding longitudinal strain (due to the lack of specific images) represents a limitation of the study since these data could help to have more comprehensive information about cardiac mechanics and function.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox11071232/s1>, Table S1: Body weight, systolic blood pressure (SBP), and infarct size in control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/kg/day); Figures S1 and S2: Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac structural alterations in infarcted rats; Figure S3: Representative pulsed tissue Doppler image tracing obtained from the basal interventricular septum along the longitudinal axis from the left parasternal four-chamber view pulsed wave (PW) Doppler spectral display shows E-waves as well as end-diastolic A-waves of rats submitted to my-

ocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/kg/day); Figure S4: Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac structural and functional alterations in infarcted rats; Figure S5: Original blots corresponding to (A) Figure 2; (B) Figure 3; and (C) Figure 4.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.L., M.L., E.M.-M. and V.C.; methodology, F.V.S.-N., F.L., S.J.-G., M.L., B.R., A.R.-M., B.D.-V., E.R.-M., M.S.-P., M.Á.C.-N., L.O.-M., E.M.-M. and V.C.; validation, E.M.-M. and V.C.; formal analysis, F.V.S.-N., F.L., S.J.-G., M.L., B.R., A.R.-M., B.D.-V., E.R.-M., M.S.-P., M.Á.C.-N., L.O.-M., E.M.-M. and V.C.; investigation, F.V.S.-N., F.L., S.J.-G., M.L., B.R., A.R.-M., B.D.-V., E.R.-M., M.S.-P., M.Á.C.-N., L.O.-M., E.M.-M. and V.C.; data curation, F.V.S.-N., F.L., E.M.-M. and V.C.; writing—original draft preparation, E.M.-M. and V.C.; writing—review and editing, F.V.S.-N., F.L., M.L., B.R., E.R.-M., M.S.-P., M.Á.C.-N., L.O.-M., E.M.-M. and V.C.; visualization, F.V.S.-N., F.L., S.J.-G., M.L., B.R., A.R.-M., B.D.-V., E.R.-M., M.S.-P., M.Á.C.-N., L.O.-M., E.M.-M. and V.C.; supervision, F.L., M.L., E.M.-M. and V.C.; project administration, E.M.-M. and V.C.; funding acquisition, E.M.-M. and V.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI18/00257; PI21/0431, PT20/00074, CIBERCV, Madrid, Spain). B.D.-V. was supported by a P-FIS grant (PI19/00277, Spain).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of Hospital Clínico San Carlos (18/195-E on 28 March 2018). The biobank cardiac sample study was approved by the Medical Ethics Review Committee of Hospital Clínico San Carlos (21/168-E on 15 March 2021). All experimental procedures of the animal study protocol were approved by the Animal Care and Use Committee of Universidad Complutense de Madrid and Dirección General de Medio Ambiente, Comunidad de Madrid, Spain (PROEX 121/18 on 20 July 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article or Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We thank Raquel López-Jurado, Avelina Hidalgo, Virginia Peinado, Daniel Fernández, and Alexandra Castro-Soplín for their technical help; Nuria Nogales Gonzalez for preparing the samples from the Biobank; Encarnación Fernández-Valle (ICTS Bioimagen Complutense; BiofmaC) for her help in the NMR study; and Anthony DeMarco for editing the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. All authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

## References

1. Doeleman, L.C. Stop prolonging resuscitations in drowned patients with asystole. *Resuscitation* **2016**, *106*, e1. [CrossRef] [PubMed]
2. Talman, V.; Ruskoaho, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 563–581. [CrossRef] [PubMed]
3. Scalise, R.F.M.; De Sarro, R.; Caracciolo, A.; Lauro, R.; Squadrito, F.; Carerj, S.; Bitto, A.; Micari, A.; Bella, G.D.; Costa, F.; et al. Fibrosis after Myocardial Infarction: An Overview on Cellular Processes, Molecular Pathways, Clinical Evaluation and Prognostic Value. *Med. Sci.* **2021**, *9*, 16. [CrossRef] [PubMed]
4. Garg, P.; Broadbent, D.A.; Swoboda, P.P.; Foley, J.R.; Fent, G.J.; Musa, T.A.; Ripley, D.P.; Erhayiem, B.; Dobson, L.E.; McDiarmid, A.K.; et al. Extra-cellular expansion in the normal, non-infarcted myocardium is associated with worsening of regional myocardial function after acute myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **2017**, *19*, 73. [CrossRef]
5. Marin-Royo, G.; Ortega-Hernandez, A.; Martinez-Martinez, E.; Jurado-Lopez, R.; Luaces, M.; Islas, F.; Gomez-Garre, D.; Delgado-Valero, B.; Lagunas, E.; Ramchandani, B.; et al. The Impact of Cardiac Lipotoxicity on Cardiac Function and Mirnas Signature in Obese and Non-Obese Rats with Myocardial Infarction. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 444. [CrossRef]
6. Tse, G.; Yan, B.P.; Chan, Y.W.; Tian, X.Y.; Huang, Y. Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction: The Link with Cardiac Arrhythmogenesis. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 313. [CrossRef]
7. Sheeran, F.L.; Pepe, S. Energy deficiency in the failing heart: Linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 543–552. [CrossRef]
8. Kim, H.K.; Nilius, B.; Kim, N.; Ko, K.S.; Rhee, B.D.; Han, J. Cardiac Response to Oxidative Stress Induced by Mitochondrial Dysfunction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2016**, *170*, 101–127. [CrossRef]
9. Schwarz, D.S.; Blower, M.D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 79–94. [CrossRef]

10. Braakman, I.; Hebert, D.N. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a013201. [[CrossRef](#)]
11. Bravo, R.; Parra, V.; Gatica, D.; Rodriguez, A.E.; Torrealba, N.; Paredes, F.; Wang, Z.V.; Zorzano, A.; Hill, J.A.; Jaimovich, E.; et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: Dynamics and metabolic integration. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2013**, *307*, 215–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Matsuzaki, S.; Hiratsuka, T.; Taniguchi, M.; Shingaki, K.; Kubo, T.; Kiya, K.; Fujiwara, T.; Kanazawa, S.; Kanematsu, R.; Maeda, T.; et al. Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123578. [[CrossRef](#)]
13. Souza-Neto, F.V.; Jimenez-Gonzalez, S.; Delgado-Valero, B.; Jurado-Lopez, R.; Genty, M.; Romero-Miranda, A.; Rodriguez, C.; Nieto, M.L.; Martinez-Martinez, E.; Cachofeiro, V. The Interplay of Mitochondrial Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Fibrosis in Obese Rats. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); Bax, J.J.; Baumgartner, H.; Ceconi, C.; Dean, V.; Deaton, C.; Fagard, R.; Funck-Brentano, C.; Hasdai, D.; Hoes, A.; et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2012**, *60*, 1581–1598. [[CrossRef](#)]
15. Lang, R.M.; Badano, L.P.; Mor-Avi, V.; Afilalo, J.; Armstrong, A.; Ernande, L.; Flachskampf, F.A.; Foster, E.; Goldstein, S.A.; Kuznetsova, T.; et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **2015**, *16*, 233–271. [[CrossRef](#)]
16. Haaf, P.; Garg, P.; Messroghli, D.R.; Broadbent, D.A.; Greenwood, J.P.; Plein, S. Cardiac T1 Mapping and Extracellular Volume (ECV) in clinical practice: A comprehensive review. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **2016**, *18*, 89. [[CrossRef](#)]
17. Reiter, U.; Reiter, C.; Krauter, C.; Fuchsjäger, M.; Reiter, G. Cardiac magnetic resonance T1 mapping. Part 2: Diagnostic potential and applications. *Eur. J. Radiol.* **2018**, *109*, 235–247. [[CrossRef](#)]
18. Gulati, A.; Japp, A.G.; Raza, S.; Halliday, B.P.; Jones, D.A.; Newsome, S.; Ismail, N.A.; Morarji, K.; Khwaja, J.; Spath, N.; et al. Absence of Myocardial Fibrosis Predicts Favorable Long-Term Survival in New-Onset Heart Failure. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2018**, *11*, e007722. [[CrossRef](#)]
19. Li, Y.; Liu, X.; Yang, F.; Wang, J.; Xu, Y.; Fang, T.; Pu, L.; Zhou, X.; Han, Y.; Chen, Y. Prognostic value of myocardial extracellular volume fraction evaluation based on cardiac magnetic resonance T1 mapping with T1 long and short in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. Radiol.* **2021**, *31*, 4557–4567. [[CrossRef](#)]
20. Raiker, N.; Vullaganti, S.; Collins, J.D.; Allen, B.D.; Choudhury, L. Myocardial tissue characterization by gadolinium-enhanced cardiac magnetic resonance imaging for risk stratification of adverse events in hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **2020**, *36*, 1147–1156. [[CrossRef](#)]
21. Fernandez-Jimenez, R.; Barreiro-Perez, M.; Martin-Garcia, A.; Sanchez-Gonzalez, J.; Aguero, J.; Galan-Arriola, C.; Garcia-Prieto, J.; Diaz-Pelaez, E.; Vara, P.; Martinez, I.; et al. Dynamic Edematous Response of the Human Heart to Myocardial Infarction: Implications for Assessing Myocardial Area at Risk and Salvage. *Circulation* **2017**, *136*, 1288–1300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Oyenuga, A.O.; Couper, D.; Matsushita, K.; Boerwinkle, E.; Folsom, A.R. Association of monocyte myeloperoxidase with incident cardiovascular disease: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0205310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Brennan, M.L.; Penn, M.S.; Van Lente, E.; Nambi, V.; Shishehbor, M.H.; Aviles, R.J.; Goormastic, M.; Pepoy, M.L.; McErlane, E.S.; Topol, E.J.; et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1595–1604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Davies, M.J. Myeloperoxidase-derived oxidation: Mechanisms of biological damage and its prevention. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2011**, *48*, 8–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yang, E.Y.; Ghosn, M.G.; Khan, M.A.; Gramze, N.L.; Brunner, G.; Nabi, F.; Nambi, V.; Nagueh, S.F.; Nguyen, D.T.; Graviss, E.A.; et al. Myocardial Extracellular Volume Fraction Adds Prognostic Information Beyond Myocardial Replacement Fibrosis. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2019**, *12*, e009535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jimenez-Gonzalez, S.; Marin-Royo, G.; Jurado-Lopez, R.; Bartolome, M.V.; Romero-Miranda, A.; Luaces, M.; Islas, F.; Nieto, M.L.; Martinez-Martinez, E.; Cachofeiro, V. The Crosstalk between Cardiac Lipotoxicity and Mitochondrial Oxidative Stress in the Cardiac Alterations in Diet-Induced Obesity in Rats. *Cells* **2020**, *9*, 451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sia, Y.T.; Parker, T.G.; Liu, P.; Tsoporis, J.N.; Adam, A.; Rouleau, J.L. Improved post-myocardial infarction survival with probucol in rats: Effects on left ventricular function, morphology, cardiac oxidative stress and cytokine expression. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *39*, 148–156. [[CrossRef](#)]
28. Van der Pol, A.; van Gilst, W.H.; Voors, A.A.; van der Meer, P. Treating oxidative stress in heart failure: Past, present and future. *Eur. J. Heart Fail.* **2019**, *21*, 425–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hori, M.; Nishida, K. Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 457–464. [[CrossRef](#)]
30. Starkov, A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1147*, 37–52. [[CrossRef](#)]
31. Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 909–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Baines, C.P.; Kaiser, R.A.; Purcell, N.H.; Blair, N.S.; Osinska, H.; Hambleton, M.A.; Brunskill, E.W.; Sayen, M.R.; Gottlieb, R.A.; Dorn, G.W.; et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **2005**, *434*, 658–662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tian, H.; Yu, D.; Hu, Y.; Zhang, P.; Yang, Y.; Hu, Q.; Li, M. Angiotensin II upregulates cyclophilin A by enhancing ROS production in rat cardiomyocytes. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 4349–4355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ferreira, J.C.B.; Campos, J.C.; Qvit, N.; Qi, X.; Bozi, L.H.M.; Bechara, L.R.G.; Lima, V.M.; Queliconi, B.B.; Disatnik, M.H.; Dourado, P.M.M.; et al. A selective inhibitor of mitofusin 1-beta1IPKC association improves heart failure outcome in rats. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hall, A.R.; Burke, N.; Dongworth, R.K.; Kalkhoran, S.B.; Dyson, A.; Vicencio, J.M.; Dorn, G.W., II; Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Schrepfer, E.; Scorrano, L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 683–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pryds, K.; Larsen, A.H.; Hansen, M.S.; Grondal, A.Y.K.; Tougaard, R.S.; Hansson, N.H.; Clemmensen, T.S.; Logstrup, B.B.; Wiggers, H.; Kim, W.Y.; et al. Myocardial strain assessed by feature tracking cardiac magnetic resonance in patients with a variety of cardiovascular diseases—A comparison with echocardiography. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11296. [[CrossRef](#)]
38. Liu, R.M.; Desai, L.P. Reciprocal regulation of TGF-beta and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 565–577. [[CrossRef](#)]
39. Jain, M.; Rivera, S.; Monclus, E.A.; Synenki, L.; Zirk, A.; Eisenbart, J.; Feghali-Bostwick, C.; Mutlu, G.M.; Budinger, G.R.; Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 770–777. [[CrossRef](#)]
40. Dean, R.G.; Balding, L.C.; Candido, R.; Burns, W.C.; Cao, Z.; Twigg, S.M.; Burrell, L.M. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J. Histochem. Cytochem.* **2005**, *53*, 1245–1256. [[CrossRef](#)]
41. Guan, C.; Zhang, H.F.; Wang, Y.J.; Chen, Z.T.; Deng, B.Q.; Qiu, Q.; Chen, S.X.; Wu, M.X.; Chen, Y.X.; Wang, J.F. The Downregulation of ADAM17 Exerts Protective Effects against Cardiac Fibrosis by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress and Mitophagy. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2021**, *2021*, 5572088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lin, R.; Su, Z.; Tan, X.; Su, Y.; Chen, Y.; Shu, X.; Liang, S.; Wang, J.; Xie, S. Effect of Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in the Regulation of Post-infarct Cardiac Repair. *Arch. Med. Res.* **2018**, *49*, 576–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, Z.; Zhang, Y.; Tang, Z.; Xu, J.; Ma, M.; Pan, S.; Qiu, C.; Guan, G.; Wang, J. Matrine attenuates cardiac fibrosis by affecting ATF6 signaling pathway in diabetic cardiomyopathy. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *804*, 21–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Minamino, T.; Kitakaze, M. ER stress in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2010**, *48*, 1105–1110. [[CrossRef](#)]
45. Bourdier, G.; Flore, P.; Sanchez, H.; Pepin, J.L.; Belaidi, E.; Arnaud, C. High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2016**, *310*, H279–H289. [[CrossRef](#)]
46. Fribley, A.; Zhang, K.; Kaufman, R.J. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *559*, 191–204. [[CrossRef](#)]
47. Xin, Y.; Wu, W.; Qu, J.; Wang, X.; Lei, S.; Yuan, L.; Liu, X. Inhibition of Mitofusin-2 Promotes Cardiac Fibroblast Activation via the PERK/ATF4 Pathway and Reactive Oxygen Species. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 3649808. [[CrossRef](#)]
48. Stoner, M.W.; McTiernan, C.F.; Scott, L.; Manning, J.R. Calreticulin expression in human cardiac myocytes induces ER stress-associated apoptosis. *Physiol. Rep.* **2020**, *8*, e14400. [[CrossRef](#)]
49. Lee, D.; Oka, T.; Hunter, B.; Robinson, A.; Papp, S.; Nakamura, K.; Srisakuldee, W.; Nickel, B.E.; Light, P.E.; Dyck, J.R.; et al. Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56387. [[CrossRef](#)]
50. Owusu, B.Y.; Zimmerman, K.A.; Murphy-Ullrich, J.E. The role of the endoplasmic reticulum protein calreticulin in mediating TGF-beta-stimulated extracellular matrix production in fibrotic disease. *J. Cell Commun. Signal.* **2018**, *12*, 289–299. [[CrossRef](#)]
51. Zhang, Z.Y.; Liu, X.H.; Hu, W.C.; Rong, F.; Wu, X.D. The calcineurin-myocyte enhancer factor 2c pathway mediates cardiac hypertrophy induced by endoplasmic reticulum stress in neonatal rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *298*, H1499–H1509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Mani, S.K.; Balasubramanian, S.; Zavadzkas, J.A.; Jeffords, L.B.; Rivers, W.T.; Zile, M.R.; Mukherjee, R.; Spinale, F.G.; Kuppaswamy, D. Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H1744–H1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Li, L.; Thompson, J.; Hu, Y.; Lesnfsky, E.J.; Willard, B.; Chen, Q. Calpain-mediated protein targets in cardiac mitochondria following ischemia-reperfusion. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wan, F.; Letavernier, E.; Le Saux, C.J.; Houssaini, A.; Abid, S.; Czibik, G.; Sawaki, D.; Marcos, E.; Dubois-Rande, J.L.; Baud, L.; et al. Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2015**, *309*, H1883–H1893. [[CrossRef](#)]
55. Kudo-Sakamoto, Y.; Akazawa, H.; Ito, K.; Takano, J.; Yano, M.; Yabumoto, C.; Naito, A.T.; Oka, T.; Lee, J.K.; Sakata, Y.; et al. Calpain-dependent cleavage of N-cadherin is involved in the progression of post-myocardial infarction remodeling. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 19408–19419. [[CrossRef](#)]



## SUPPLEMENTARY MATERIALS

## Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Cardiac Remodelling in Myocardial Infarction Through the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress

Francisco V Souza-Neto <sup>1,†</sup>, Fabian Islas <sup>2,†</sup>, Sara Jiménez-González <sup>1</sup>, Maria Luaces <sup>2</sup>, Bunty Ramchandani <sup>3</sup>, Ana Romero-Miranda <sup>1</sup>, Beatriz Delgado-Valero <sup>1</sup>, Elena Roldan-Molina <sup>4</sup>, Melchor Saiz-Pardo <sup>5,6</sup>, M<sup>a</sup> Ángeles Cerón-Nieto <sup>5</sup>, Luis Ortega-Medina <sup>4,5,6</sup>, Ernesto Martínez-Martínez <sup>1,7,†</sup>, Victoria Cachafeiro <sup>1,7,†</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; franvasc@ucm.es (F.V.S.-N); sarajp02@ucm.es (S.J.-G); anarom12@ucm.es (A.R.-M); beadel02@ucm.es (B.D.-V).

<sup>2</sup> Servicio de Cardiología, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; fabianisl@ucm.es (F.I.); mluaace01@ucm.es (M.L.).

<sup>3</sup> Servicio de Cirugía Cardíaca Infantil, Hospital La Paz, Madrid, Spain; bunty.r@gmail.com (B.R.).

<sup>4</sup> Biobanco del Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación de Salud del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; elenamilagrosa.molina@salud.madrid.org (E.R.-M.); luis.ortega@salud.madrid.org (L.O.-M.).

<sup>5</sup> Departamento de Patología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; melchor.saiz@salud.madrid.org (M.S.-P.); nines.ceron@gmail.com (M.A.C.-N.).

<sup>6</sup> Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

<sup>7</sup> Ciber de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain.

\* Correspondence: ernmarti@ucm.es (E.M.-M.); vcarra@ucm.es (V.C.); Tel.: +34-913941483 (E.M.-M.); +34-913941489 (V.C.).

† These authors contributed equally to this study.

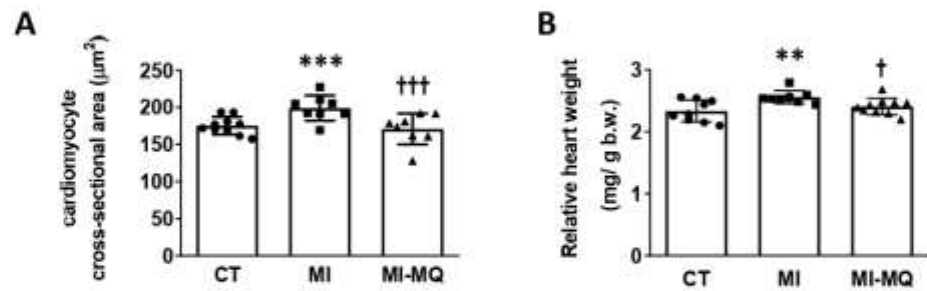
### This file includes:

1. supplemental table
- 5 supplemental figures

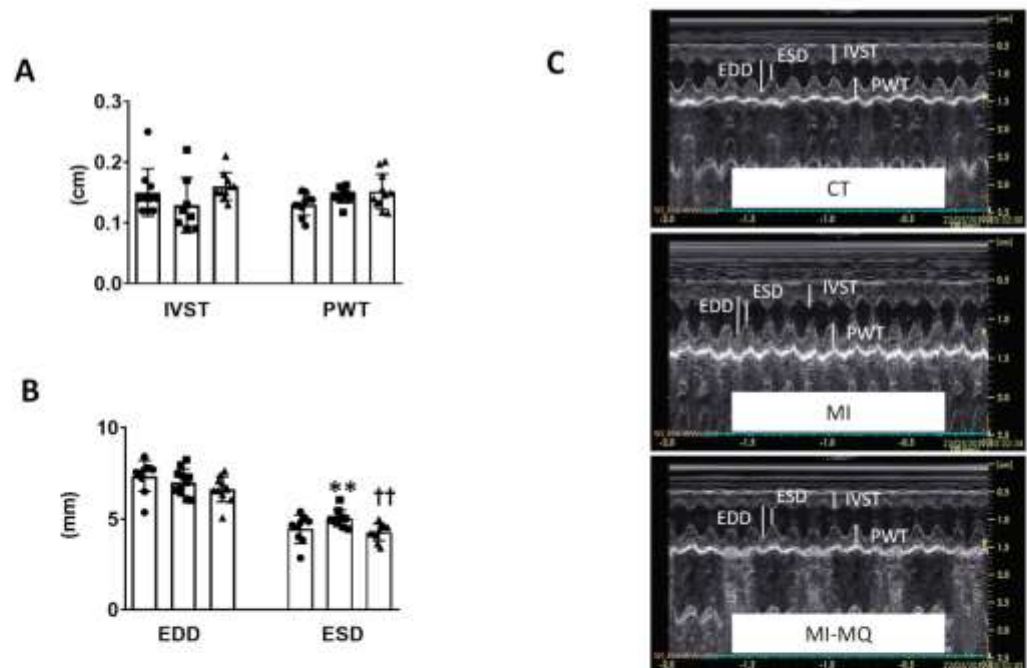
**Table S1.** Body weight, systolic blood pressure (SBP) and infarct size in control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/Kg/day).

	CT	MI	MI-MQ
Body weight (g)	389.9±9.6	394.8±9.7	380.8±9.4
SBP (mmHg)	128.4±2.2	132.5±1.1	128.7±1.9
Infarct size/LV mass (%)	-	25.2±11.7	32.1±14.9

SUPPLEMENTARY MATERIALS

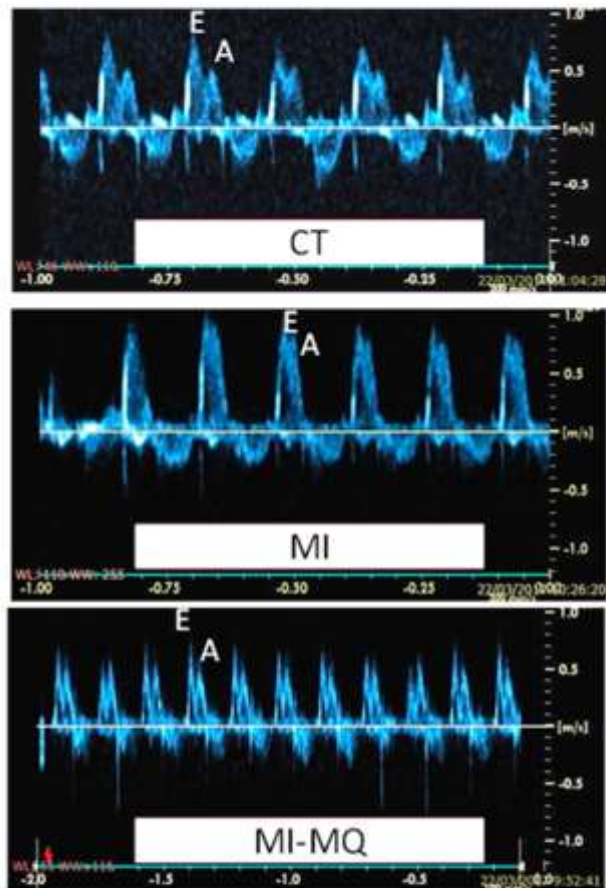


**Figure S1.** Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac structural alterations in infarcted rats. (A) cardiomyocyte cross-sectional area; (B) relative heart weight expressed by body weight (b.w) in control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/Kg/day). Bars graphs represent the mean  $\pm$  SD of 8-10 animals. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. CT group. † $p < 0.05$ , ††† $p < 0.001$  vs. MI group.



**Figure S2.** Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac structural alterations in infarcted rats. (A) interventricular septum end-diastolic thickness (IVST) and posterior wall end-diastolic thickness (PWT); (B) end-diastolic diameter (EDD) and end-systolic diameter (ESD); (C) Representative echocardiographic images in M-mode on right parasternal short axis in control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 50 mg/Kg/day). Bars graphs represent the mean  $\pm$  SD of 8-10 animals. \*\* $p < 0.01$  vs. CT group; †† $p < 0.01$  vs. MI group.

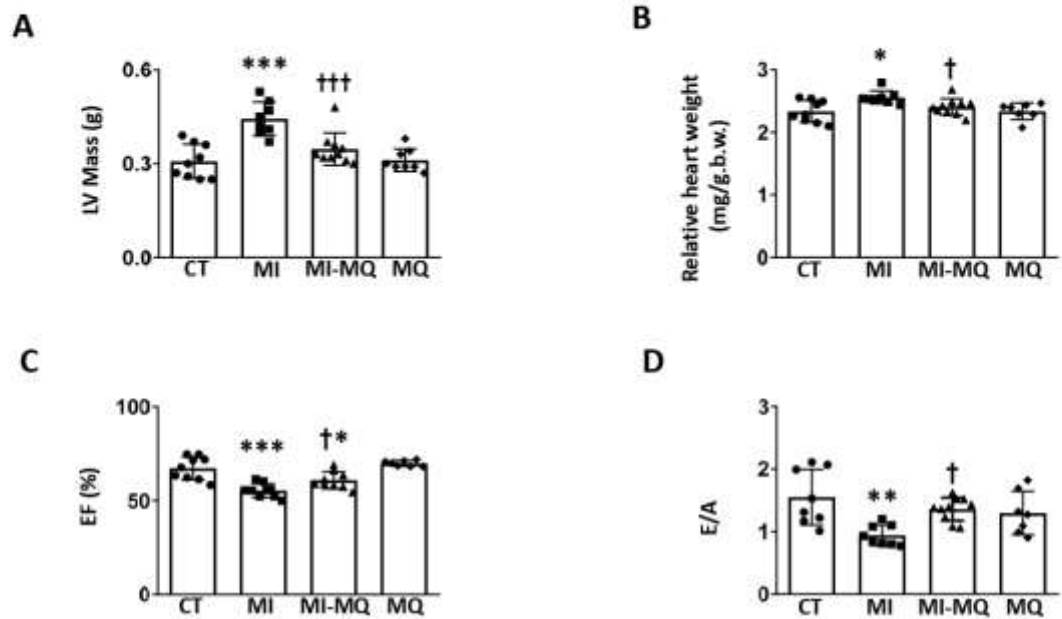
## SUPPLEMENTARY MATERIALS



**Figure S4.** Representative pulsed tissue Doppler image tracing obtained from the basal interventricular septum along the longitudinal axis from the left parasternal 4-chamber view pulsed wave (PW) Doppler spectral display shows an E-wave, as well as an end-diastolic A-wave of rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MI-MQ; 200  $\mu$ M/50 mg/Kg/day).



## SUPPLEMENTARY MATERIALS



**Figure S4.** Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac structural and functional alterations in infarcted rats. (A) left ventricle mass; (B) relative heart weight; (C) left ventricle ejection fraction (EF) and (D) E-wave and A- wave ratio (E/A) in control rats (CT) and rats submitted to myocardial infarction treated with vehicle (MI) or with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ and MI-MQ; 50 mg/Kg/day, respectively). Bar graphs represent the mean  $\pm$  SD of 7-10 animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. CT group. † $p < 0.05$ , †† $p < 0.001$  vs. MI group.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

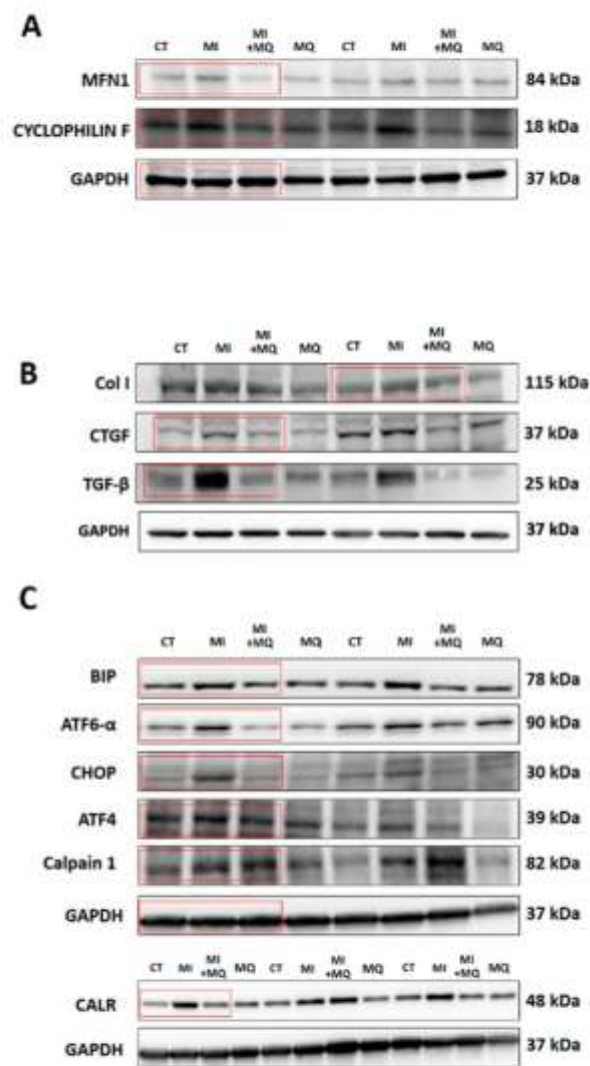


Figure S5. Original blots corresponding to (A) Figure 2; (B) Figure 3; (C) Figure 4.

**Trabajo nº 3 (no publicado):** *The role of mitochondrial oxidative stress in cardiac damage induced by obesity associated with myocardial infarction in rats.*

**The role of mitochondrial oxidative stress in cardiac damage induced by obesity associated with myocardial infarction in rats.**

**ABSTRACT**

We have evaluated the role of mitochondrial oxidative stress and its association with endoplasmic reticulum (ER) stress activation in cardiac damage in the context of obesity associated with myocardial infarction (MI). Male Wistar rats were fed either a standard diet (3.5% fat, CT) or a high-fat diet (HFD, 35% fat) for 10 weeks. Myocardial infarction was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery 6 weeks after the start of the diet. Animals were treated with vehicle or the mitochondrial antioxidant MitoQ (200  $\mu$ M) in the drinking water after MI for an additional 4 weeks. The infarcted-obese animals presented an increase in body weight and adiposity index that was accompanied by an increase in the relative weight of the heart and the mass of the left ventricle (LV). Treatment with MitoQ reduced, but did not normalize body weight, however was not able to prevent the alterations in cardiac mass or in infarct size. However, MitoQ normalized LV ejection fraction (LVEF%) and E/A ratio, which were decreased in infarcted-obese rats. Infarcted-obese animals presented cardiac fibrosis accompanied by increased levels of extracellular matrix proteins and profibrotic mediators. These alterations were associated with ER stress activation characterized by enhanced levels of immunoglobulin binding protein (BiP), activating transcription factor 6 alpha (ATF6 $\alpha$ ), activating transcription factor 4 (ATF4), CCAAT-enhancer-binding homologous protein (CHOP) and with mitochondrial damage. The mitochondrial antioxidant (MitoQ) prevented all of these alterations. Tunicamycin, an ER stress activator, altered the contractility in isolated rat cardiomyocytes that was prevented by treatment with the mitochondrial antioxidant (MitoTempo). The data suggest that mitochondrial oxidative stress and ER stress participates in the cardiac consequences induced by obesity associated with myocardial infarction.

**Keywords:** cardiac fibrosis; endoplasmic reticulum stress; mitochondrial oxidative stress; obesity, myocardium infarction.

## 1. INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the main worldwide cause of death, with the myocardial infarction (MI) being the most prevalent disease. The prevalence of MI has been increasing in the last decades due to the parallel increase of different risk factors including obesity. Different studies have evaluated the mechanisms involved in the cardiac alterations associated with MI and obesity. Nevertheless, independently, a larger number of patients with MI are obese. Until now, there have not been studies that have evaluated if the presence of obesity can affect the detrimental cardiac consequences induced by MI being mandatory to study this complex scenario.

Several alterations have been described in MI and obesity, such as cardiac remodeling and left ventricular hypertrophy, which can finally lead to systolic and/or diastolic dysfunction that could promote heart failure. Cardiac fibrosis is a common feature in both pathologies, which is defined by the imbalance between production and degradation of extracellular matrix components (ECM), with the main component of ECM being collagen type I <sup>(1)</sup>. Fibrosis can produce an aberrant remodeling that triggers functional alterations by reducing the relaxing capability of the heart, which can turn into an increase in its filling pressure and contribute to diastolic dysfunction <sup>(2)</sup>. In this sense, fibrosis promotes tissue stiffness that facilitates ventricular dysfunction. A variety of factors has been suggested as potential mediators of cardiac fibrosis and cardiac damage in the context of obesity or MI <sup>(3, 4, 5, 6)</sup>, including oxidative stress <sup>(7, 8, 9, 10)</sup>. Mitochondria are the main source of reactive oxygen species (ROS) in the cell through oxidative phosphorylation (OXPHOS) during the process of ATP synthesis <sup>(11)</sup>. In normal conditions, ROS levels in the mitochondria are balanced by an effective antioxidant defense. However, an excessive production of ROS can affect mitochondrial function and could lead to functional alterations of the heart <sup>(12, 13)</sup>. In this line, some data have reported

the relevance of mitochondrial oxidative stress in the development of not only cardiac fibrosis, but also of metabolic alterations in diet-induced obese rats <sup>(14, 15)</sup>, as well as in rats subjected to myocardial ischemia <sup>(10)</sup>. In recent studies from our laboratory, we have demonstrated the beneficial effects of the treatment with a mitochondrial antioxidant, MitoQ, on the development of cardiac fibrosis and functional alterations in an animal model of obesity <sup>(7, 8)</sup> or in MI <sup>(9)</sup>. These effects seem to be mediated, at least in part, through the inhibition of endoplasmic reticulum (ER) stress activation in MitoQ-treated animals. ER stress is a situation promoted by an accumulation of unfolded / misfolded proteins within the lumen of ER, which could trigger inflammatory and apoptotic processes and tissue injury. Mitochondria are connected with ER through structural domains known as mitochondria-associated ER membranes (MAMs). Under pathological conditions such as obesity or MI, mitochondria become dysfunctional increasing ROS, which promotes ER stress activation and being characterized by an increase in molecular markers such as immunoglobulin binding protein (BiP) and the activation of different pathways.

In this context, the objective of this study was to evaluate the role of mitochondrial oxidative stress in the cardiac alterations observed in a pathological context in which obesity and MI are concomitant. Therefore, we have evaluated if the treatment with a mitochondrial antioxidant was able to ameliorate the cardiac consequences of MI in an animal model with established cardiac damage induced by obesity. In addition, we have evaluated the crosstalk between mitochondrial oxidative stress and ER activation and its role in cardiomyocyte contractility.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 *Experimental design and animals.*

Male Wistar rats of 150 g (Envigo, Barcelona, Spain) were fed either a high fat diet (HFD, 35% fat; Envigo Teklad no. TD.03307, Haslett, MI, USA; n=18) or a standard diet (CT, 3.5% fat; Envigo Teklad no.TD.2014, Haslett, MI, USA; n=16) for a period of 10 weeks. In the sixth week, and once the differences in the body weight were observed, MI was induced in HFD animals by ligation of the left anterior descendent (LAD) coronary artery, as previously described<sup>(16)</sup>. Animals from control group (CT) were subjected to SHAM operation (the same surgical procedure, except that the suture passing through the LAD was not fastened). The mitochondrial antioxidant MitoQ (50 mg/kg/day, equivalent to 200 µM) was administered to half of the animals of each group in the drinking water for 4 weeks after LAD. The dose of MitoQ was based on previous studies<sup>(8, 17)</sup>. MitoQ was provided by MP Murphy from Medical Research Council Mitochondrial Biology Unit, Cambridge BioMedical Campus, Cambridge, UK. Body weight, systolic blood pressure (SBP) and cardiac structure and function were measured at the end of the evolution period. SBP was estimated using a tail-cuff plethysmograph (Narco Bio-Systems) in unrestrained rats. Animals were sacrificed by decapitation. The heart and different fat pads (epididymal, lumbar, and mesenteric adipose tissue) were dissected. The adiposity index was calculated by the following formula:  $\text{sum of fat pads(g)} / [(\text{body weight(g)} - \text{fat pad weight(g)}) \times 100]$ .

The Animal Care and Use Committee of Universidad Complutense de Madrid and Dirección General de Medio Ambiente, Comunidad de Madrid, Spain approved all experimental procedures (PROEX 121/18).

### 2.2 *Cardiac structure and function.*

Cardiac structure and function were evaluated by transthoracic echocardiography with a Vivid-I (General Electric Healthcare, Boston, MA, USA) connected to a 12-MHz linear transducer and by magnetic resonance

imaging (NMR) study. 2D-guided M-mode recordings were made from short-axis views to measure left ventricular (LV) chamber dimensions, interventricular septum and posterior wall thickness.

Diastolic function was assessed by early and late transmitral peak diastolic flow velocity (E and A waves) and ratio between E-waves and A-wave (E/A) was calculated. The images were processed with the software MASS (Medis Medical Imaging Systems, Best, Norway). End-diastolic diameter (EDD) and end-systolic diameter (EDS) were used to calculate the left ventricular ejection fraction (LVEF) according to the Teicholz Formula:  $(EDD^3 \times 7) / (2.4 + EDD)$  in percentage.

Infarct size and LV mass were defined by magnetic resonance imaging (NMR) study. Infarct size was measured by late gadolinium enhancement. It was performed with a Biospec BMT 47/40 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany), located at the NMR Center of the Universidad Complutense of Madrid, equipped with a 12-cm gradient system, and connected to a 1025 SAM monitoring and a gating system (SA Instruments, Inc., New York, USA), as is previously described <sup>(16)</sup>. The images were processed with the MEDIS SUITE MR software (Medis Medical Imaging Systems, Leiden, The Netherlands).

### *2.3 Histological analysis.*

Cardiac tissue samples were dehydrated, embedded in paraffin, and cut in 4  $\mu\text{m}$ -thick sections. Sections were stained with picrosirius red to detect collagen fibers. The area of cardiac interstitial fibrosis was identified as the ratio of interstitial fibrosis or collagen deposition into the total tissue area after excluding the vessel area from the region of interest. For each sample, 10 to 15 fields were analyzed with a 40X objective under transmitted light microscopy (Leica DM 2000; Leica AG, Germany). Quantitative analysis was performed using an analysis system (Leica LAS 4.3).

#### 2.4 Western blot.

Total cardiac proteins (40µg) from the non-infarcted area were separated by SDS-PAGE on 4-15% polyacrylamide gels (Criterion TGX Precast Gels, BioRad) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Richmond, CA) with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Richmond, CA). Membranes were probed with primary antibodies for 4-hydroxynonenal (4HNE, Abcam; Cambridge, UK; dilution 1:250; Ref: ab243070), activating transcription factor 4 (ATF4; Proteintech, Rosemont, IL, USA; dilution: 1:1000; Ref: 10835-1-AP), activating transcription factor 6 alpha (ATF6α; Santa Cruz, Texas, USA; dilution 1:250; Ref: sc-166659), CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP; Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA; dilution 1:500; Ref: #2895), collagen I (Calbiochem, California, USA; dilution 1:500; Ref: 234167), connective tissue growth factor (CTGF; Sigma-Aldrich, Missouri, USA; dilution 1:1000; Ref: C4871), cyclophilin F (cycloF, Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA; dilution 1:500; Ref: Sc-376061), cytochrome C (CytoC, Abcam; Cambridge, UK; dilution 1:500; Ref: ab133504), fumarase (FH; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA; dilution 1:1000; Ref: sc-393992), immunoglobulin binding protein (BiP; BD Biosciences, Madrid, Spain; dilution 1:1500; Ref: 610978), mitofusin 1 (MFN1, Abcam; Cambridge, UK; dilution 1:1000; Ref: ab126575) protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6; Abcam plc, Cambridge, UK; dilution 1:1000; Ref: ab154820), transforming growth factor-β (TGF-β; Abcam plc, Cambridge, UK; dilution 1:250; Ref: ab190503) and GAPDH (Sigma-Aldrich; dilution 1:5000; Ref: #5174) as loading control. Signals were detected using the ECL system (Millipore, Massachusetts, USA). Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units.

#### 2.5 Study of contractility cellular in cardiomyocyte.

Cardiac tissue was removed from 1 to 3-day-old Wistar rats, as previously described <sup>(18)</sup>. In brief, the collagenase type II enzyme was used in order to

digest the heart tissue. Isolated neonatal rat cardiomyocytes were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, and replated in 75-cm<sup>2</sup> flasks for 2 hours. The cells were then plated into culture dishes and incubated at 37°C in a 95% sterile air and 5% CO<sub>2</sub> incubator. One day after plating, cells were rinsed with DMEM plus serum and fed for another 48 hours with regular culture medium, now including 20 µg/ml cytosine-D-arabinofuranoside in order to inhibit the growth of noncardiomyocytes. The cultured cells were used in experiments on the fourth day of culture. Cells were treated with the ER stress inducer, tunicamycin (100nM), for 24 hours in the presence or absence of the mitochondrial antioxidant, MitoTiempo (10µM).

A high-speed digital CMOS camera (SILICON VIDEO ® 642M, EPIX, Inc) was coupled to a Nikon Eclipse Ti-E inverted microscope, brightfield microscopy, containing a 40x objective (Nikon Japan, 0.55 numerical aperture and 2.1mm working distance). In the microscope stage, an incubator (model ChamlielIC-CU: 109, Live Cell Instrument, Nowan-gu, Korea) was added to maintain uniform temperature (37°C), humidity (60%) and CO<sub>2</sub> (5%). The image sequence was recorded at 100 frames per second (fps) over 15s, with a resolution of 640x480 pixels. The image pixel size was 0.25 µm/pixel with a depth of 8 bits. To detect cell contraction movement, we used the Dense Optical Flow methodology, which is based on the principles of optical flow to detect the movement of all points between a pair of images. Images were analyzed using CONTRACTIONWAVE software (v1.0) as it is previously described <sup>(19)</sup>. The cellular contractility parameters evaluated are represented in (Figure S1).

### *2.6. Cell viability by resazurin reduction.*

To investigate the cell viability after treatment with tunicamycin (TUN), the resazurin reduction method was used employing the Alamar Blue reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. Ref: DAL 1100), following

fabricant instructions. Briefly, neonatal cardiomyocytes were treated with TUN (100, 300 and 600 nM) for 24 hours in 96 well microplate, followed by the addition of 10% of the Alamar Blue reagent for 4 hours. Fluorescence was measured in a microplate reader using the Cytation 5 Cell Imaging (Biotek) using an excitation of 530nm and an emission of 590 nm.

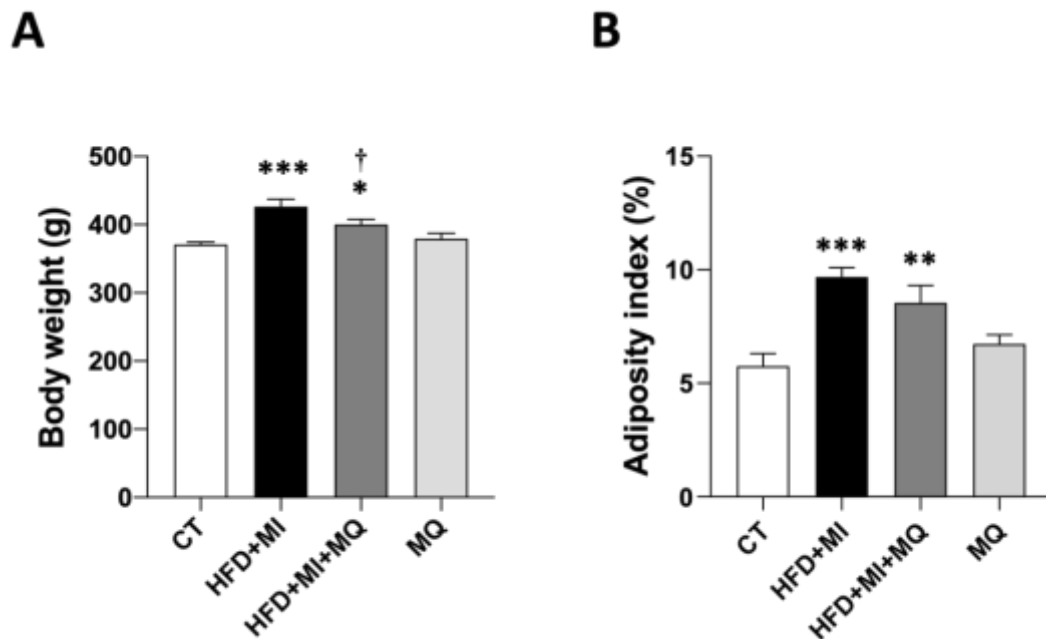
### *2.7. Statistical analysis.*

Variables are expressed as mean  $\pm$  SEM. Normality of distributions was verified by means of the Kolmogorov–Smirnov test. Differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. A value of  $P < 0.05$  was used as the cutoff value for defining statistical significance. Data analysis was performed using the statistical program GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA).

## **3. RESULTS**

### *3.1. Effects of mitochondrial oxidative stress on body weight and adiposity index, in myocardial infarcted-obese rats.*

Animals fed a high-fat diet and with MI (HFD+MI) showed a significant increase in body weight (Figure 1A) and in the adiposity index (Figure 1B) as compared to the CT group. The administration of MitoQ reduced the increase in body weight in HFD+MI+MQ animals, although it was not able to reach those values observed in the CT group. MitoQ was unable to prevent the increase in adiposity index observed in HFD+MI animals (Figure 1B).

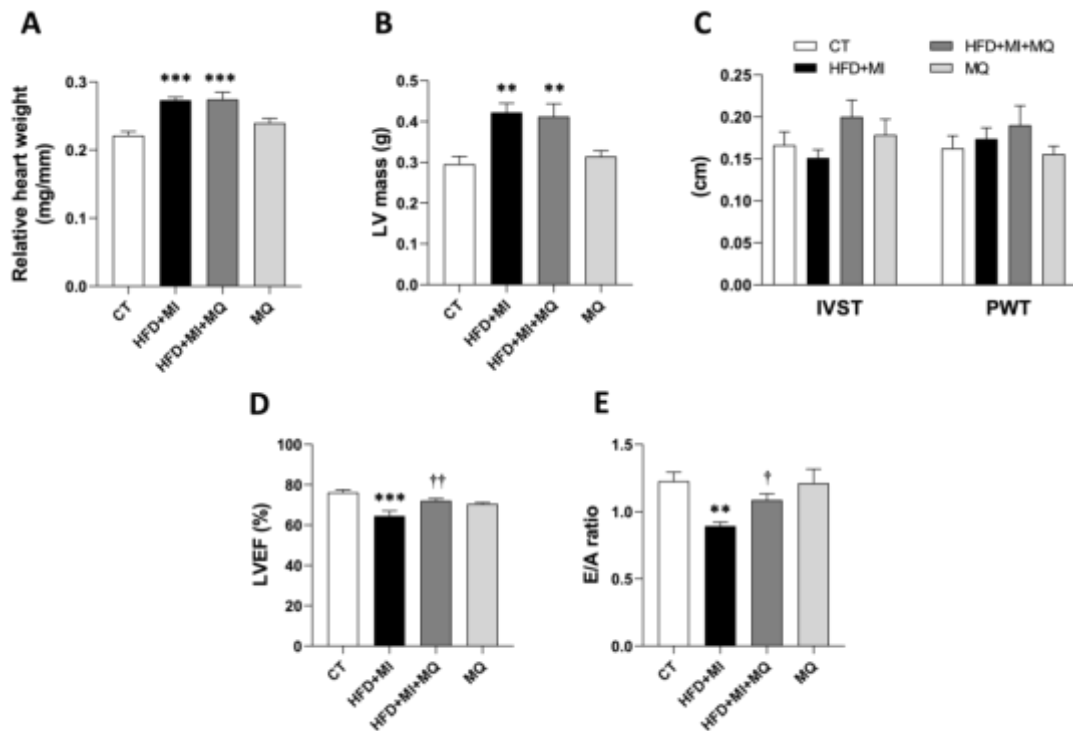


**Figure 1: Effects of mitochondrial oxidative stress on body weight and adiposity index in myocardial infarcted-obese rats. (A)** Body weight and **(B)** adiposity index in rats fed a standard diet (CT) or high-fat diet with myocardial infarction (HFD+MI) treated or not with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 7-9 animals per group \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. CT; † $p < 0.05$  vs. HFD+MI.

### 3.2 Effects of mitochondrial antioxidant on cardiac structural and functional alterations in myocardial infarcted-obese rats.

Myocardial infarcted-obese rats showed an increase in the relative heart weight (Figure 2A) and in LV mass (Figure 2B) without affecting the intraventricular septum and posterior wall thickness (Figure 2C), suggesting the presence of cardiac hypertrophy. The treatment with the mitochondrial antioxidant (MitoQ) was not able to prevent these alterations (Figure 2A-B). Moreover, HFD+MI rats showed a decrease in LVEF (Figure 2D) and in the E/A ratio (Figure 2E), indicating a decrease in systolic and diastolic function, respectively. The inhibition of mitochondrial oxidative stress by MitoQ was able

to prevent these alterations in cardiac function in HFD+MI animals (Figure 2D-E).



**Figure 2: The role of mitochondrial oxidative stress in cardiac structural and functional alterations in infarcted-obese rats. (A)** Relative heart weight normalized by tibial length; **(B)** left ventricle (LV) mass; **(C)** interventricular septum (IVST) and posterior wall thickness (PWT); **(D)** Left ventricular ejection fraction (LVEF) and **(E)** E/A ratio in rats fed a standard diet (CT) or high-fat diet with myocardial infarction (HFD+MI) treated or not with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 7-9 animals per group. \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 vs. CT; † $p$ <0.05; †† $p$ <0.01 vs. HFD+MI.

Infarcted-obese rats showed an increase in ESD without alterations in EDD (Table 1). MitoQ treatment was not able to prevent this change, nor the infarct size in infarcted-obese rats (Table 1). Independently from the presence of obesity, MI did not change systolic blood pressure (SBP). Only a slight decrease in SBP in the MQ group has been observed (Table 1).

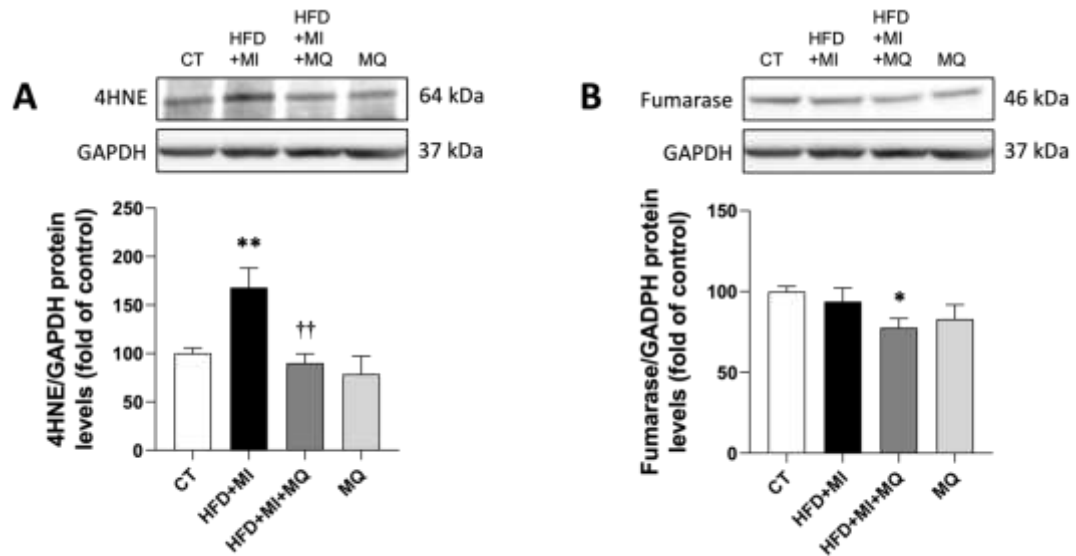
**Table 1: Effects of mitochondrial oxidative stress on cardiac parameters and systolic blood pressure in infarcted-obese rats.**

	CT	HFD+MI	HFD+MI+MQ	MQ
<b>ESD (cm)</b>	0,361 ± 0,020	0,466 ± 0,018 *	0,520 ± 0,046 **	0,429 ± 0,015
<b>EDD (cm)</b>	0,670 ± 0,021	0,708 ± 0,019	0,727 ± 0,038	0,611 ± 0,020
<b>Infarct size/LV mass (%)</b>	–	24,5 ± 2,9	21,5 ± 3,0	–
<b>SBP (mmHg)</b>	127,3 ± 2,4	128,1 ± 2,7	127,0 ± 2,5	117,1 ± 2,8 *

Systolic blood pressure (SBP), left ventricular end-systolic diameter (ESD), left ventricular-end diastolic diameter (EDD) in rats fed a standard diet (CT) or high-fat diet with MI (HFD+MI) treated or not with mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200 µM). Data values represents the mean ± SEM of 7-9 animals per group. \*p<0.05; \*\*p<0.01 vs. CT.

### *3.3 Effects of MitoQ treatment on cardiac oxidative stress in myocardial infarcted-obese rats.*

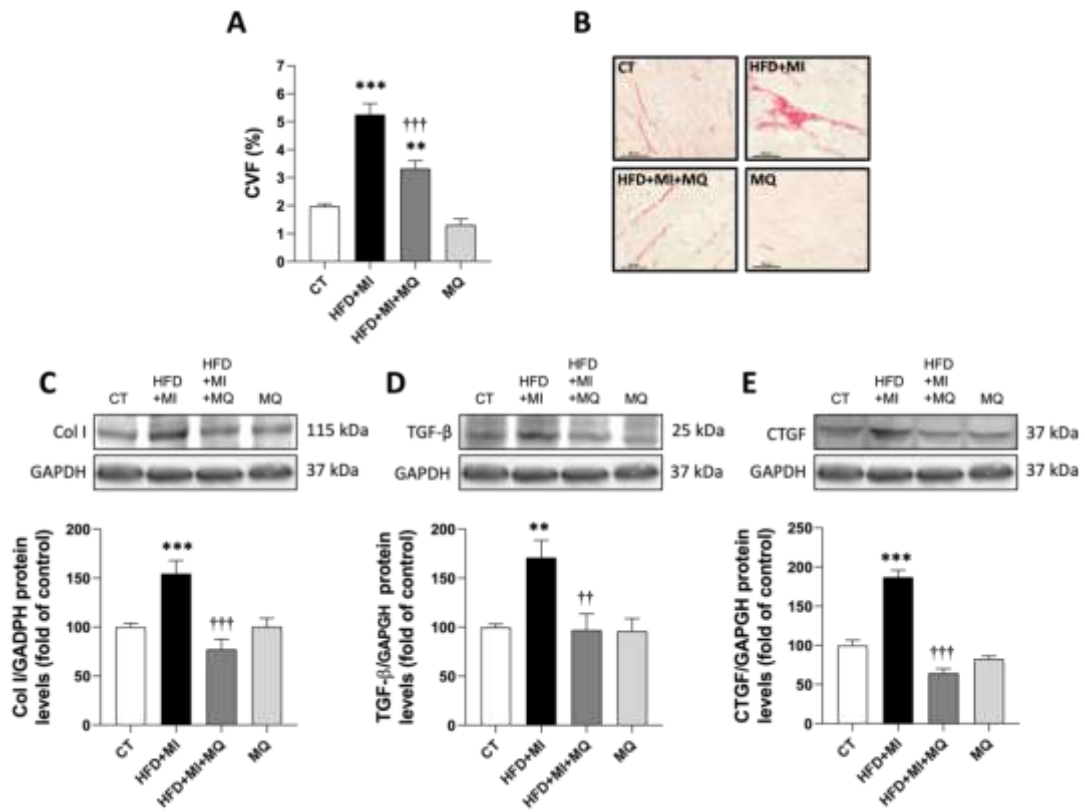
Myocardial ischemia in the context of obesity produced an oxidative environment in the heart, characterized by increased protein levels of 4-hydroxynonenal (4HNE), a major end-product of lipid peroxidation, in HFD+MI animals (Figure 3A). MitoQ was able to prevent the increase of 4HNE, supporting the effectiveness of the treatment. No major changes were observed in fumarase protein levels in infarcted-obese animals as compared with controls. However, MitoQ treatment was able to reduce these levels (Figure 3B).



**Figure 3: Effects of MitoQ treatment on oxidative stress induced by obesity associated with MI.** Protein levels of **(A)** 4-hydroxynonenal (4HNE) and **(B)** fumarase in the heart of rats fed a standard diet (CT) or high-fat diet with myocardial infarction (HFD+MI) treated or not with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 6-10 animals per group. \*\* $p < 0.01$  vs. CT; †† $p < 0.01$  vs. HFD+MI.

### 3.4 The role of mitochondrial oxidative stress on myocardial fibrosis in infarcted-obese rats.

Infarcted-obese rats showed interstitial cardiac fibrosis, characterized by an increase in collagen volume fraction (CVF) that was reduced by MitoQ treatment (Figure 4A-B). Furthermore, it was also observed in the heart of HFD+MI animals an increase in collagen I protein levels (Figure 4C), and the profibrotic mediators TGF- $\beta$  (Figure 4D) and CTGF (Figure 4E). The inhibition of mitochondrial oxidative stress by MitoQ was able to prevent all of these changes (Figure 4C-E).

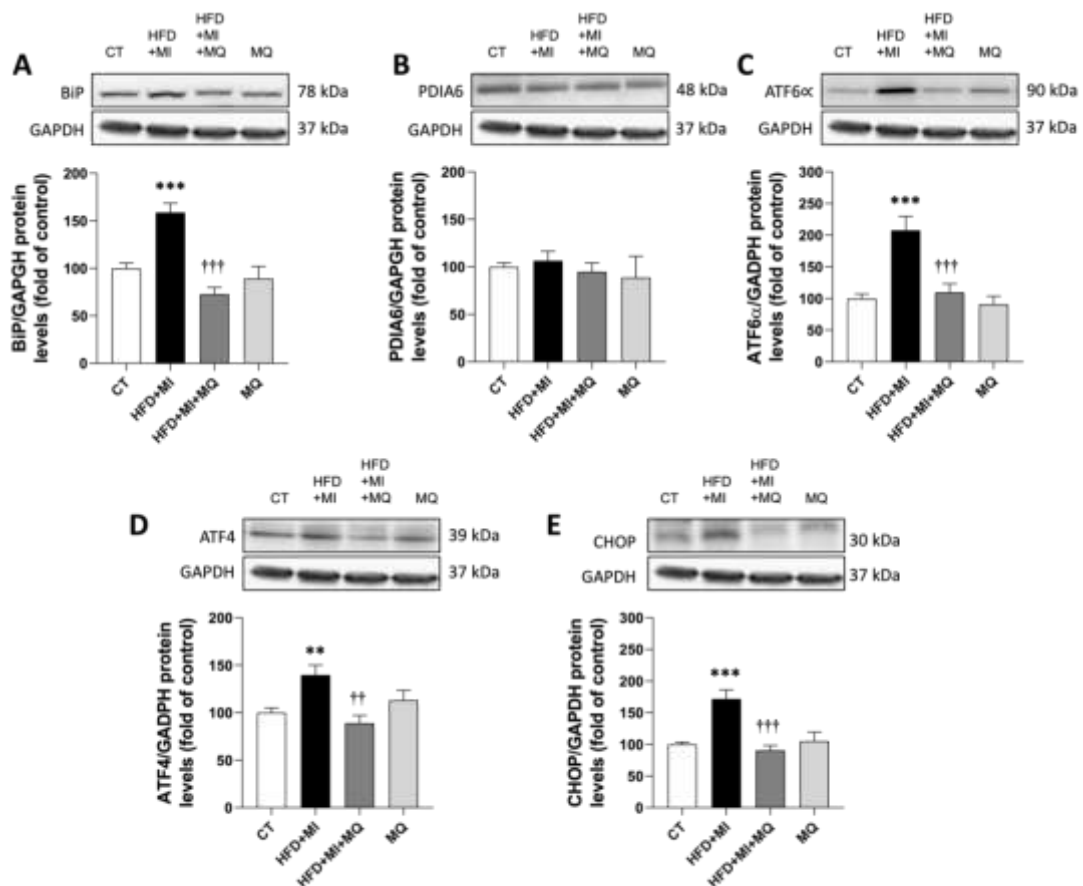


**Figure 4: The role of mitochondrial oxidative stress on myocardial fibrosis induced by obesity associated with MI.** (A) collagen volume fraction (CVF); (B) representative microphotographs of heart sections staining with picrosirius red (magnification: 40X; scale bar: 50µm). Protein levels of (C) collagen type I (Col I); (D) transforming growth factor β (TGF-β); (E) connective tissue growth factor (CTGF) in the heart of rats fed a standard diet (CT) or high-fat diet with myocardial infarction (HFD+MI) treated or not with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200 µM). Bar graphs represent the mean ± SEM of 6-10 animals per group. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. CT; ††p<0.01; †††p<0.001 vs. HFD+MI.

### 3.5 Mitochondrial oxidative stress mediates endoplasmic reticulum stress activation in the heart of infarcted-obese rats.

Infarcted-obese rats presented activation of ER stress at cardiac level. This activation was characterized by an increase in protein levels of the main ER stress marker, the chaperone BiP (Figure 5A) without changes in PDIA6 levels, another ER stress marker (Figure 5B). In addition, HFD+MI animals presented

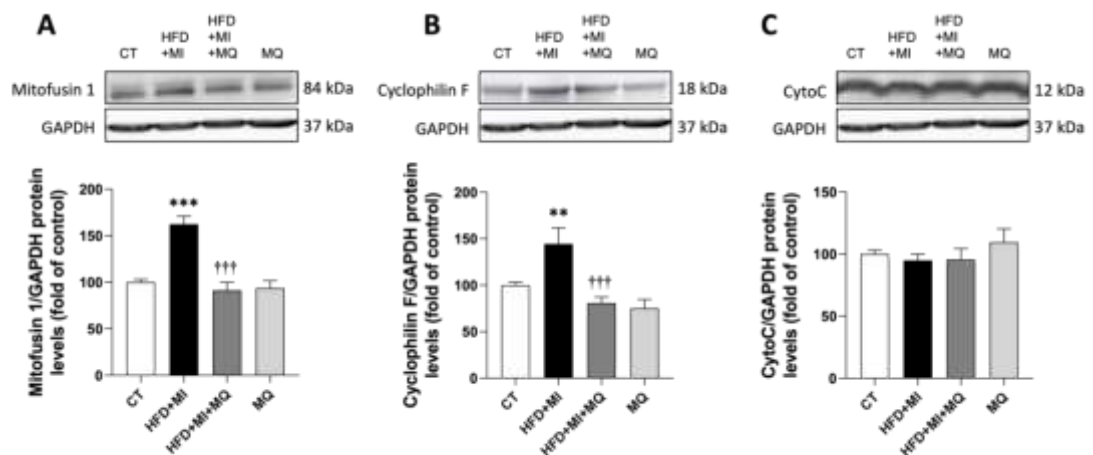
activation of different pathways involved in the unfolded protein response, such as ATF6 $\alpha$  (Figure 5C), ATF4 (Figure 5D) and CHOP (Figure 5E). These increased levels were normalized with treatment by MitoQ, confirming the participation of mitochondrial oxidative stress in the ER stress activation in this pathological context.



**Figure 5: Mitochondrial oxidative stress mediates cardiac endoplasmic reticulum stress activation in infarcted-obese rats.** Protein levels of (A) Immunoglobulin binding protein (BiP); (B) protein disulfide isomerase family A member 6 (PDIA6); (C) activating transcription factor 6 alpha (ATF6 $\alpha$ ); (D) activating Transcription Factor 4; (E) CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) in the heart of rats fed a standard diet (CT) or high-fat diet with myocardial infarction (HFD+MI) treated or not with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 6-10 animals per group. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. CT; ††p<0.01; †††p<0.001 vs. HFD+MI.

### 3.6 Mitochondrial oxidative stress participates in cardiac mitochondrial damage induced by obesity associated with MI.

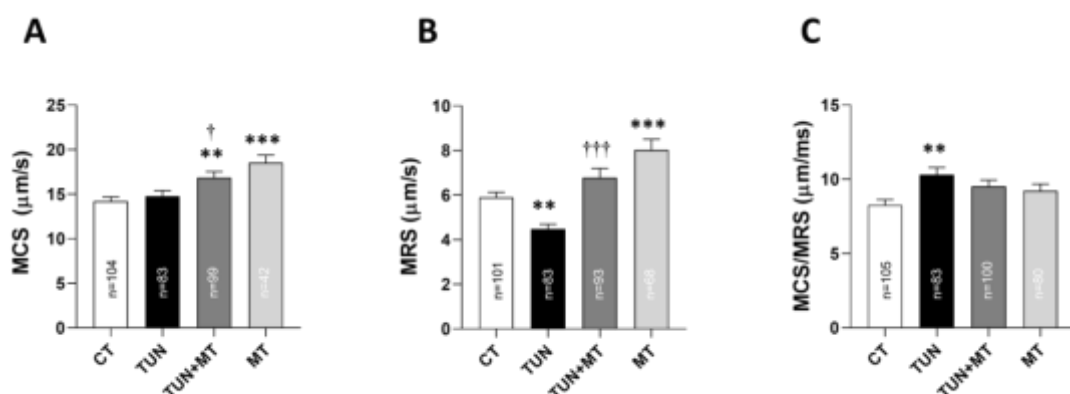
Considering that mitochondrial dysfunction plays a central role in a wide variety of cardiac disorders, including obesity and MI we decided to assess the levels of proteins involved in different mitochondrial functions. HFD+MI animals showed an increase in protein levels of MFN1, which is involved in the mitochondrial fusion process (Figure 6A) and cyclophilin F, which is involved in the induction of the opening of the mitochondrial permeability transition pores (mPTP) (Figure 6B). These higher levels were prevented by the MitoQ treatment (Figure 6A-B), showing the participation of mitochondrial oxidative stress in mitochondrial damage in this pathological context. No changes were observed in CytoC protein levels (Figure 6C).



**Figure 6: Mitochondrial oxidative stress participates on cardiac mitochondrial damage induced by obesity associated with MI.** Protein levels of (A) mitofusin 1; (B) cyclophilin F and (C) cytochrome C (CytoC) in the heart of rats fed a standard diet (CT) or high-fat diet with myocardial infarction (HFD+MI) treated or not with the mitochondrial antioxidant MitoQ (MQ; 200  $\mu$ M). Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 6-10 animals per group. \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 vs. CT; ††† $p$ <0.001 vs. HFD+MI.

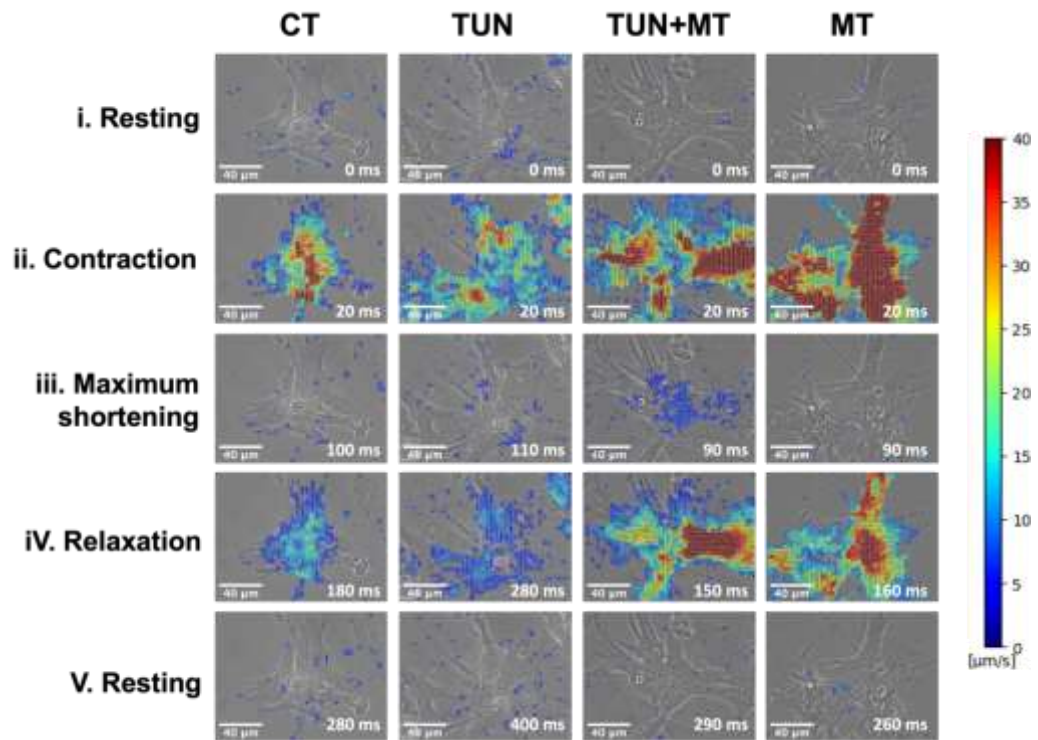
### 3.7 Role of mitochondrial oxidative stress and endoplasmic reticulum stress activation in cell contractility of isolated cardiac myocytes.

In order to know the possible effects of mitochondrial oxidative stress and ER stress on contractile function of the heart, we have studied the participation of both mechanisms on cellular contractility of isolated cardiomyocytes. A dose-response study was performed to choose tunicamycin dose (Figure S2). The 100 nM dose of tunicamycin was chosen, since it was able to decrease the frequency of contraction (33.3% as compared with the control group) and maximum displacement speed, without affecting cell viability (Figure S2-S3). The pharmacological activation of ER stress by tunicamycin (100nM) in cardiomyocytes isolated from neonatal rats did not change the maximum contraction speed (MCS) (Figure 7A), decreasing only the maximum relaxation speed (MRS) (Figure 7B). Consequently, there was observed an increase in the ratio between MCS and MRS (MCS/MRS) (Figure 7C). Treatment with the mitochondrial antioxidant MitoTempo (MT, 10 $\mu$ M) was able to prevent these changes. MT treatment was able to ameliorate the MCS and MRS in cardiomyocytes in the absence of tunicamycin (Figure 7A-B). Representative microphotographies of these studies are represented in Figure 8.



**Figure 7: Mitochondrial oxidative stress mediates the alterations in relaxation speed in neonatal rat cardiomyocytes induced by tunicamycin.** (A) Maximum contraction speed (MCS); (B) maximum relaxation speed (MRS); (C) ratio between maximum contraction speed

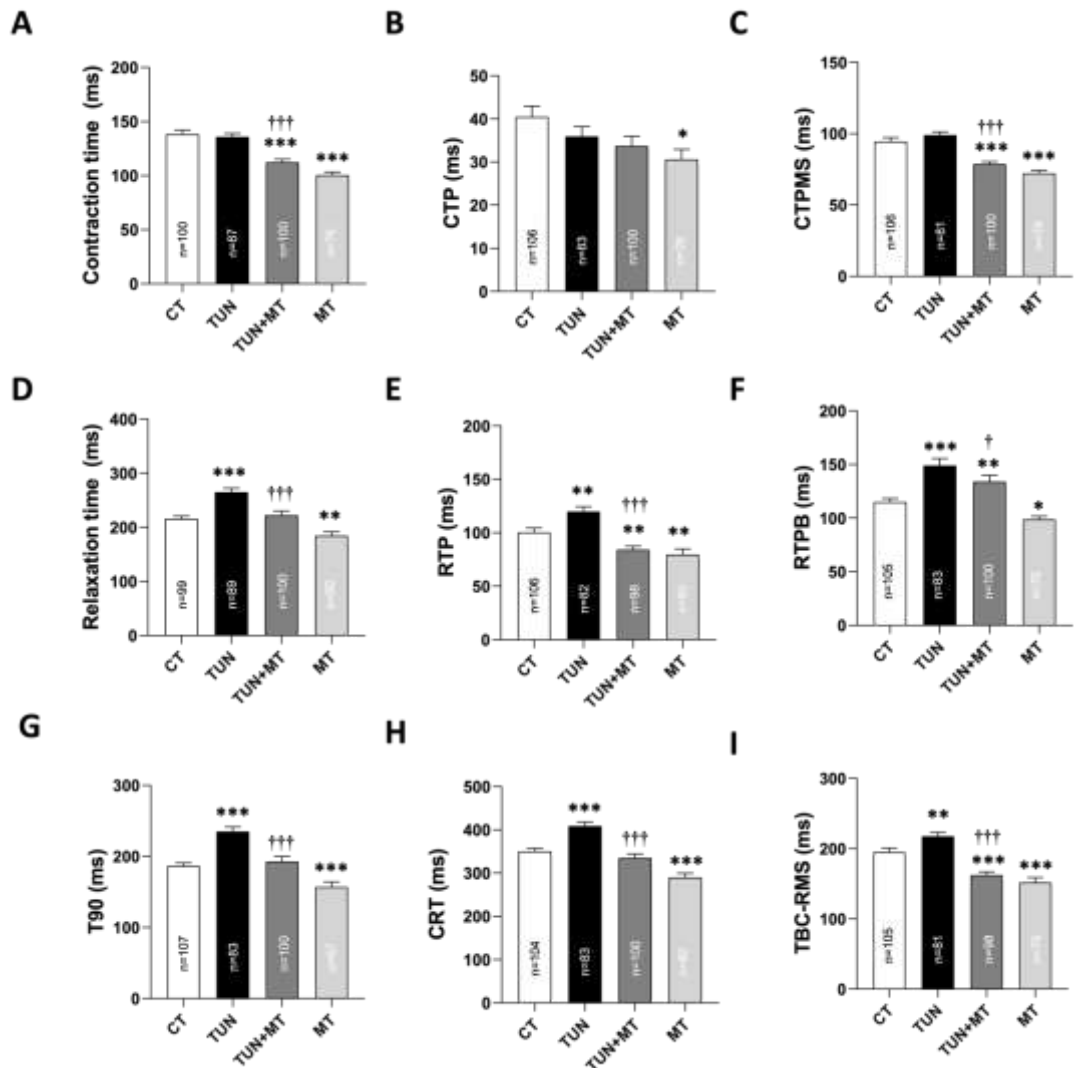
and maximum relaxation speed (MCS/MRS) of neonatal rat cardiomyocytes in response to tunicamycin (TUN) 100nM for 24 hours in the presence or absence of MitoTempo (MT) 10 $\mu$ M. Bar graphs represent the means  $\pm$  SEM of the cells from each experimental group. n=number of cardiomyocytes. Data represent results of 6 independent experiments. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. CT; †p<0.05; †††p<0.001 vs. TUN.



**Figure 8: Representative images of cellular contractility parameters during a contraction-relaxation cycle of neonatal rat cardiomyocytes.** Representative images showing the membrane movement detection by the magnitude and vector fields with visual and numerical intensity scale detection during a contraction-relaxation cycle in neonatal rat cardiomyocytes in response to tunicamycin (TUN) 100nM for 24 hours in the presence or absence of MitoTempo (MT) 10 $\mu$ M (magnification: 40X; scale bar: 40 $\mu$ m). Left, phases of the contraction-relaxation cycle. Right, a speed scale bar.

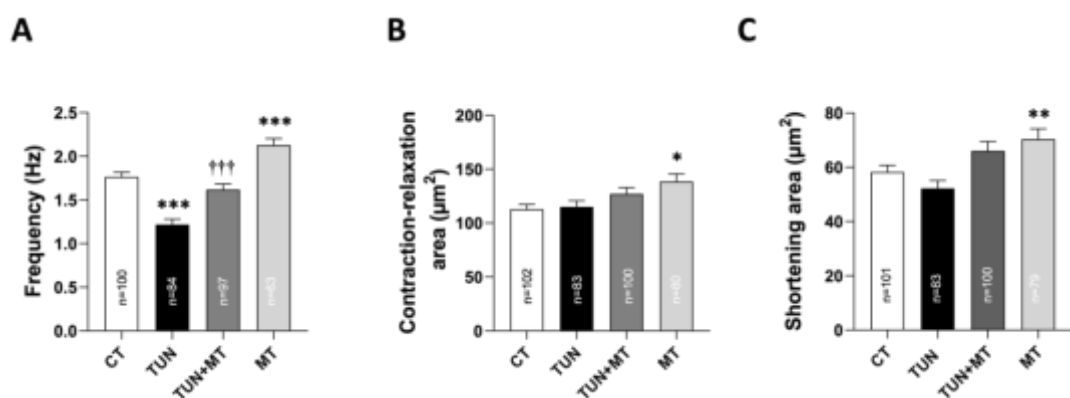
In addition, cardiomyocytes treated with tunicamycin did not present changes in contraction time, contraction time-to-peak (CTP) and in contraction time from peak to minimum speed (CTPMS) (Figures 9A-C). However, tunicamycin

increased cell relaxation time parameters, such as relaxation time (RT) (Figure 9D), relaxation time-to-peak (RTP) (Figure 9E), relaxation time from peak to baseline (RTPB) (Figure 9F) and the time at which the relaxation speed decayed to a 90% of its peak amplitude (T90) (Figure 9G). Consequently, tunicamycin promoted an increase in contraction-relaxation time (CRT) (Figure 9H) and in the time between contraction-relaxation maximum speed (TBC-RMS) (Figure 9I). MT treatment was able to prevent the effects of ER stress activation in all relaxation time parameters in cardiomyocytes (Figures 9D-I). Interestingly, treatment with the mitochondrial antioxidant MT was able to improve these parameters independent of the presence of tunicamycin (Figure 9A-H). Representative microphotographies of these studies are represented in Figure 8.



**Figure 9: Mitochondrial oxidative stress participates in the effects of endoplasmic reticulum stress on the relaxation time in isolated neonatal rat cardiomyocytes.** (A) Contraction Time; (B) contraction time-to-peak (CTP); (C) contraction time from peak to minimum speed (CTPMS); (D) relaxation time; (E) relaxation time-to-peak (RTP); (F) relaxation time from peak to baseline (RTPB); (G) time at which the relaxation speed decayed to a 90% of its peak amplitude (T90); (H) contraction-relaxation time (CRT); (I) contraction-relaxation maximum speed (TBC-RMS) in response to tunicamycin 100nM (TUN) for 24 hours in the presence or absence of MitoTempo 10µM (MT). Bar graphs represent the means ± SEM from of the cells from each experimental group. n=number of cardiomyocytes. Data represent results of 6 independent experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. CT; †p<0.05; †††p<0.001 vs. TUN.

Similarly, tunicamycin induced a decrease in the frequency of contraction ( $p < 0.001$ ), which was prevented in the presence of MT (Figure 10A). No changes were observed in the contraction-relaxation area or in the shortening area (Figure 10B-C, respectively). Interestingly, mitoQ was able to increase all these parameters independent of the presence of tunicamycin (Figure 10A-C).



**Figure 10: Mitochondrial oxidative stress participates in the effects of endoplasmic reticulum stress on the frequency of contraction in isolated neonatal rat cardiomyocytes.** (A) Frequency; (B) contraction-relaxation area and (C) shortening area of neonatal rat cardiomyocytes in response to tunicamycin 100nM (TUN) for 24 hours in the presence or absence of MitoTempo 10µM (MT). Bar graphs represent the means  $\pm$  SEM of cells from each experimental group. n=number of cardiomyocytes. Data represent results of 6 independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. CT; ††† $p < 0.001$  vs. TUN+MT.

#### 4. Discussion

The purpose of this study was to investigate the role of mitochondrial oxidative stress in the cardiac alterations observed in obese rats with MI. The treatment with the mitochondrial antioxidant, MitoQ, was able to ameliorate the cardiac function in infarcted-obese rats. This effect was associated with an improvement in the development of cardiac fibrosis, as well as in the activation of ER stress. In addition, mitochondrial oxidative stress participates in the contractility/relaxation alterations induced by ER stress activation in cardiac

myocytes. These results show mitochondrial oxidative stress as a possible therapeutic target in the pathological context as well as MitoQ as possible treatment for the cardiac consequences of MI associated with obesity.

Obesity, as well as MI, is associated with cardiac functional alterations. It has been described the prevalence of diastolic dysfunction in obese patients <sup>(20, 21)</sup> while MI is associated with systolic dysfunction due to the decrease in the capacity of myocardial contractility for the loss of cells <sup>(22, 23)</sup>. In the present study, infarcted-obese rats showed a decrease in FEVI values, as well as in E/A ratio, showing systolic and diastolic functional alterations. These effects on cardiac function were accompanied by the development of cardiac hypertrophy characterized by an increase in relative heart weight and LV mass. Cardiac hypertrophy has been observed in different cardiovascular pathologies including obesity and MI <sup>(24, 25)</sup>. The treatment with the mitochondrial antioxidant, MitoQ, was not able to prevent the development of cardiac hypertrophy, however, it ameliorated the cardiac functional alterations observed in the animals.

Different studies support our data that suggest the participation of mitochondrial oxidative stress in the reduction of cardiac function in infarcted-obese rats. Sverdlov AL, *et al.*, observed that diastolic dysfunction in mice fed HFD and sucrose was prevented in transgenic mice that express the antioxidant enzyme catalase in mitochondria <sup>(26)</sup>. Another study showed that treatment with MitoQ reduced cardiac dysfunction in an ischemia/reperfusion animal model <sup>(27)</sup>.

In our previous work we have described that cardiac hypertrophy in obese <sup>(13)</sup> and infarcted rats <sup>(9)</sup> was prevented by treatment with the mitochondrial antioxidant, MitoQ. Interestingly, in the present study in which obesity and MI are associated, these protective effects of MitoQ on cardiac hypertrophy were abolished. Cardiac remodeling observed in the context of MI associated with obesity seems to be complex and multifactorial. There are multiple molecular

and hemodynamic factors associated with obesity <sup>(28)</sup> and MI <sup>(23, 29)</sup> that are involved in the cardiac structure alterations.

Mitochondria are the main source of ROS in the cell which promote an oxidative environment when its levels exceed antioxidant capacities. ROS can lead to the oxidation of fatty acids in a process termed lipid peroxidation <sup>(30)</sup> generating molecules such as 4HNE, the major product of lipid peroxidation. As expected, in the present study, HFD+MI animals showed increased protein levels of 4HNE in the heart, which was prevented in MitoQ treated animals. 4HNE has high reactivity and capacity to modify enzymes like kinases, belonging to sensitive pathways of cell homeostasis such as mitochondrial bioenergetics, redox balance, ROS production, autophagy, and apoptosis <sup>(31)</sup>. In addition, 4HNE is able to generate dysfunction and death of cardiac myocytes by a mechanism involving disruption of the actin cytoskeleton and dysregulation of cellular calcium homeostasis <sup>(32)</sup>. Previous studies have reported increased levels of 4HNE in plasma from obese patients <sup>(33, 34, 35)</sup> and in patients with MI <sup>(36)</sup> and suggest that 4HNE could be involved in the pathophysiology of metabolic diseases <sup>(37)</sup>.

Cardiac oxidative stress has been widely reported as a contributing factor for cardiac dysfunction and remodeling <sup>(38, 39)</sup>. *Myocardial fibrosis is an important feature of cardiac remodeling, it being a prognostic factor of adverse cardiac outcomes in different cardiac diseases* <sup>(40, 41)</sup> *that triggers heart failure and death* <sup>(42)</sup>. MitoQ decreased the myocardial fibrosis and normalized the upregulation of Col I, TGF- $\beta$  and CTGF protein levels observed in the heart of obese rats with MI. *These effects of MitoQ on myocardial fibrosis are consistent with previous studies in models of LV pressure overload* <sup>(43)</sup>, obesity <sup>(8, 13)</sup> and myocardial ischemia <sup>(9)</sup>. Another study showed similar effects of a general antioxidant in cardiac fibrosis in obese and infarcted rats <sup>(44)</sup>. In addition, different studies suggest the participation of fibrosis as a possible mechanism involved in cardiac dysfunction in different experimental models <sup>(45, 46, 47)</sup>.

Several studies have shown that ER stress plays an important role in the development of fibrosis <sup>(48, 49)</sup>, myocardial hypertrophy <sup>(48)</sup> and apoptosis <sup>(50)</sup>. In the present study, HFD+MI rats showed ER activation characterized by the increase in BiP protein levels and activation of different ER stress pathways as ATF6 $\alpha$ , ATF4 and CHOP, which were prevented by MitoQ treatment. Evidences suggests that the mitochondria and ER are functionally and metabolically associated <sup>(51, 52)</sup>, existing an important relationship for body energy homeostasis <sup>(51)</sup>. The disruption of this homeostasis induced excessive ROS generation and ER stress activation <sup>(52, 53, 54)</sup>. Our results are consistent with previous studies of our group and others <sup>(55, 56)</sup> that described relationship between ER stress and mitochondrial oxidative stress and their role in the development of cardiac fibrosis in obese <sup>(8, 57)</sup> and in infarcted rats <sup>(9)</sup>. Another study elucidated that the pharmacological inhibition of ER stress decreased oxidative stress and apoptosis induced by myocardial ischemia and attenuated cardiac dysfunction <sup>(58, 59)</sup>. These studies confirm the interrelationship between oxidative stress and the ER stress and demonstrate a bidirectional crosstalk between mitochondria and ER. Furthermore, we observed in cardiac samples from autopsies of patients who had suffered MI an increase in BiP levels, which was correlated with elevated cardiac collagen levels in these patients <sup>(9)</sup>, showing the relevance of ER stress in the development of cardiac fibrosis. In addition, the pharmacological inhibition of ER stress in cardiac cells was able to prevent the increase in collagen I protein levels induced by the profibrotic molecule, angiotensin II <sup>(8)</sup>.

Additionally, the ER stress activation increases CHOP levels that trigger calcium release from the ER <sup>(60)</sup>, which enters into the mitochondria and causes mitochondrial alterations by increasing mitochondrial ROS production <sup>(61, 62)</sup>. Our results showed an increase in MNF1 and cyclophilin F cardiac protein levels in infarcted-obese rats indicating changes in mitochondrial functions. The MitoQ treatment was able to prevent the increase in cyclophilin F and MFN1 protein levels observed in HFD+MI animals. Similar data have been reported by our group in obesity <sup>(13)</sup> or MI <sup>(9)</sup> animal models. This increase

in MNF1 indicates mitochondrial fusion, a process considered to be an adaptive pro-survival response against stress activated in order to try to maintain energy metabolism <sup>(63, 64)</sup>. In the same way, another study suggests that MNF1 deletion in cardiac myocytes confers protection against ROS-induced mitochondrial dysfunction, showing protective effects in mitochondrial depolarization, viability, and presenting a minor mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening induced by exposure to ROS <sup>(65)</sup>. The oxidative stress can open the mPTP generating a further increase in ROS production in response to this opening and finally causes cellular injury <sup>(66, 67)</sup>. An increase in levels of cyclophilin F, a critical regulator of the mPTP, indicates opening of the mPTP <sup>(68)</sup>. Elevated levels of cyclophilin F are associated with mitochondrial damage in different pathologies <sup>(69)</sup>. In an animal model of MI, it was described that the suppression of cyclophilin F in mice was able to reduce mortality, prevent cardiac pathological remodeling such as myocardial fibrosis and preserve cardiac systolic function <sup>(70)</sup>. In this sense, our data confirm that mitochondrial oxidative stress plays an important role in mitochondrial damage observed in the context of obesity associated with MI.

Based on the results obtained *in vivo*, we have evaluated the direct effects of ER stress activation on contractility in neonatal rat cardiomyocytes and investigated the role of mitochondrial oxidative stress. Our data show that treatment with a mitochondria free radical scavenger (MitoTempo) was able to prevent the decrease in contraction-relaxation cycle frequency, relaxation speed and time of cardiomyocytes induced by the pharmacological activator of ER stress, tunicamycin. These results support the relationship between mitochondrial oxidative stress and ER stress activation <sup>(8, 9)</sup> and its implications in myocardial contractile dysfunction <sup>(71, 72, 73)</sup>. Furthermore, these findings observed in the cardiac cells corroborate the results observed in the animal model showing that the inhibition of mitochondrial oxidative stress prevented ER stress activation and the decrease in systolic and diastolic cardiac function observed in infarcted-obese rats.

Our results are also consistent with previous findings that showed an increased ER stress in myocardium from aged mice with deletion of Sirtuin 1 (*Sirt1*<sup>-/-</sup>), which promotes antioxidant and cardioprotective effects <sup>(74)</sup>. The activation of ER stress was associated with impaired contractile function. Moreover, the Protein Disulfide Isomerase (PDI) inhibition increases oxidative stress and ER stress and exacerbated cardiac contractile dysfunction in the cardiomyocytes of *Sirt1*<sup>-/-</sup> mice <sup>(72)</sup>. In another study, Yang. L *et al.*, have observed similar results with ER stress induction by tunicamycin administration in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of metallothionein (protein with antioxidant effects). In addition to the changes in cardiac contractility, tunicamycin in absence of antioxidant promoted alterations in the homeostasis of calcium, mitochondrial injury and apoptosis, resulting in a pathological cardiac remodeling and cardiac dysfunction <sup>(75)</sup>.

## 5. Conclusion

In summary, our findings provide insights into the mechanisms involved in the alterations of structure and cardiac function induced by obesity associated with MI. Our results indicate that attenuation of mitochondrial oxidative stress is associated with improved cardiac fibrosis and cardiac function in infarcted-obese rats. Moreover, the mitochondrial oxidative stress mediates the activation of ER stress in this pathological context. This activation of ER stress seems to impair cardiomyocyte contractility, which is mediated by mitochondrial oxidative stress. Together, these data pointed out mitochondrial oxidative stress and ER stress as possible therapeutic targets in a complex pathological scenario with clinical relevance such as MI in presence of obesity.

## Funding

This research was funded by Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI18/00257; PI21/00431), CIBERCV, Madrid, Spain). F.V.Souza-Neto was supported by a contract from Universidad Complutense de Madrid y Banco Santander (CT42/18-CT43/18).

## References

1. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(4):549-74.
2. Kirkman DL, Robinson AT, Rossman MJ, Seals DR, Edwards DG. Mitochondrial contributions to vascular endothelial dysfunction, arterial stiffness, and cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(5):H2080-h100.
3. Martínez-Martínez E, Buonafine M, Boukhalifa I, Ibarrola J, Fernández-Celis A, Kolkhof P, et al. Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFκB Pathway. *Hypertension.* 2017;70(6):1148-56.
4. Poetsch MS, Strano A, Guan K. Role of Leptin in Cardiovascular Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:354.
5. Cavalera M, Wang J, Frangogiannis NG. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Transl Res.* 2014;164(4):323-35.
6. Drevinge C, Karlsson LO, Stahlman M, Larsson T, Perman Sundelin J, Grip L, et al. Cholesteryl esters accumulate in the heart in a porcine model of ischemia and reperfusion. *PLoS One.* 2013;8(4):e61942.
7. Martinez-Martinez E, Fernandez-Irigoyen J, Santamaria E, Nieto ML, Bravo-San Pedro JM, Cachofeiro V. Mitochondrial Oxidative Stress Induces Cardiac Fibrosis in Obese Rats through Modulation of Transthyretin. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15).
8. Souza-Neto FV, Jimenez-Gonzalez S, Delgado-Valero B, Jurado-Lopez R, Genty M, Romero-Miranda A, et al. The Interplay of Mitochondrial Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Fibrosis in Obese Rats. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(8).
9. Souza-Neto FV, Islas F, Jiménez-González S, Luaces M, Ramchandani B, Romero-Miranda A, et al. Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Cardiac Remodeling in Myocardial Infarction through the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(7).
10. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(7):165768.

11. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(5):1066-77.
12. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):H2181-90.
13. Jimenez-Gonzalez S, Marin-Royo G, Jurado-Lopez R, Bartolome MV, Romero-Miranda A, Luaces M, et al. The Crosstalk between Cardiac Lipotoxicity and Mitochondrial Oxidative Stress in the Cardiac Alterations in Diet-Induced Obesity in Rats. *Cells.* 2020;9(2).
14. Feillet-Coudray C, Fouret G, Ebabe Elle R, Rieusset J, Bonafos B, Chabi B, et al. The mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ ameliorates metabolic syndrome features in obesogenic diet-fed rats better than Apocynin or Allopurinol. *Free Radic Res.* 2014;48(10):1232-46.
15. Coudray C, Fouret G, Lambert K, Ferreri C, Rieusset J, Blachnio-Zabielska A, et al. A mitochondrial-targeted ubiquinone modulates muscle lipid profile and improves mitochondrial respiration in obesogenic diet-fed rats. *Br J Nutr.* 2016;115(7):1155-66.
16. Marin-Royo G, Ortega-Hernandez A, Martinez-Martinez E, Jurado-Lopez R, Luaces M, Islas F, et al. The Impact of Cardiac Lipotoxicity on Cardiac Function and Mirnas Signature in Obese and Non-Obese Rats with Myocardial Infarction. *Sci Rep.* 2019;9(1):444.
17. Rivera-Barahona A, Alonso-Barroso E, Pérez B, Murphy MP, Richard E, Desviat LR. Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia. *Mol Genet Metab.* 2017;122(1-2):43-50.
18. Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM, Gómez-Viquez NL, et al. Nuclear Ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium.* 2008;44(2):230-42.
19. Scalzo S, Afonso MQL, da Fonseca NJ, Jr., Jesus ICG, Alves AP, Mendonça C, et al. Dense optical flow software to quantify cellular contractility. *Cell Rep Methods.* 2021;1(4):100044.
20. Tan YH, Lim JP, Lim WS, Gao F, Teo LLY, Ewe SH, et al. Obesity in Older Adults and Associations with Cardiovascular Structure and Function. *Obes Facts.* 2022;15(3):336-43.

21. Luaces M, Cachofeiro V, Garcia-Munoz-Najar A, Medina M, Gonzalez N, Cancer E, et al. Anatomical and functional alterations of the heart in morbid obesity. Changes after bariatric surgery. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(1):14-21.
22. Wu WY, Biery DW, Singh A, Divakaran S, Berman AN, Ayuba G, et al. Recovery of Left Ventricular Systolic Function and Clinical Outcomes in Young Adults With Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(22):2804-15.
23. van der Bijl P, Abou R, Goedemans L, Gersh BJ, Holmes DR, Jr., Ajmone Marsan N, et al. Left Ventricular Post-Infarct Remodeling: Implications for Systolic Function Improvement and Outcomes in the Modern Era. *JACC Heart Fail*. 2020;8(2):131-40.
24. Bhatti SN, Li JM. Nox2 dependent redox-regulation of Akt and ERK1/2 to promote left ventricular hypertrophy in dietary obesity of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;528(3):506-13.
25. Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res*. 2000;87(5):392-8.
26. Sverdlov AL, Elezaby A, Qin F, Behring JB, Luptak I, Calamaras TD, et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Cardiac Structural, Functional, and Mitochondrial Consequences of Diet-Induced Metabolic Heart Disease. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(1).
27. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2005;19(9):1088-95.
28. Alpert MA, Lavie CJ, Agrawal H, Aggarwal KB, Kumar SA. Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Transl Res*. 2014;164(4):345-56.
29. Oldfield CJ, Duhamel TA, Dhalla NS. Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2020;98(2):74-84.
30. Kornfeld OS, Hwang S, Disatnik MH, Chen CH, Qvit N, Mochly-Rosen D. Mitochondrial reactive oxygen species at the heart of the matter: new therapeutic approaches for cardiovascular diseases. *Circ Res*. 2015;116(11):1783-99.

31. Panisello-Roselló A, Lopez A, Folch-Puy E, Carbonell T, Rolo A, Palmeira C, et al. Role of aldehyde dehydrogenase 2 in ischemia reperfusion injury: An update. *World J Gastroenterol*. 2018;24(27):2984-94.
32. VanWinkle WB, Snuggs M, Miller JC, Buja LM. Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994;28(2):119-34.
33. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1752-61.
34. Vincent HK, Bourguignon CM, Weltman AL, Vincent KR, Barrett E, Innes KE, et al. Effects of antioxidant supplementation on insulin sensitivity, endothelial adhesion molecules, and oxidative stress in normal-weight and overweight young adults. *Metabolism*. 2009;58(2):254-62.
35. Russell AP, Gastaldi G, Bobbioni-Harsch E, Arboit P, Gobelet C, Dériaz O, et al. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? *FEBS Lett*. 2003;551(1-3):104-6.
36. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, de la Rosa A, Vargas M, Ferrer J, Garcia M. Role of endogenous interleukin-10 production and lipid peroxidation in patients with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty, interleukin-10 and primary angioplasty. *Int J Cardiol*. 2005;99(1):77-81.
37. Mak S, Lehotay DC, Yazdanpanah M, Azevedo ER, Liu PP, Newton GE. Unsaturated aldehydes including 4-OH-nonenal are elevated in patients with congestive heart failure. *J Card Fail*. 2000;6(2):108-14.
38. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):482-90.
39. Ramachandra CJA, Cong S, Chan X, Yap EP, Yu F, Hausenloy DJ. Oxidative stress in cardiac hypertrophy: From molecular mechanisms to novel therapeutic targets. *Free Radic Biol Med*. 2021;166:297-312.
40. Chan RH, Maron BJ, Olivetto I, Pencina MJ, Assenza GE, Haas T, et al. Prognostic value of quantitative contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance for the evaluation of sudden death risk in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2014;130(6):484-95.

41. Aquaro GD, De Luca A, Cappelletto C, Raimondi F, Bianco F, Botto N, et al. Prognostic Value of Magnetic Resonance Phenotype in Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(22):2753-65.
42. Tendera M. The epidemiology of heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004;5 Suppl 1:S2-6.
43. Goh KY, He L, Song J, Jinno M, Rogers AJ, Sethu P, et al. Mitoquinone ameliorates pressure overload-induced cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in mice. *Redox Biol.* 2019;21:101100.
44. Si LY, Ali SAM, Latip J, Fauzi NM, Budin SB, Zainalabidin S. Roselle is cardioprotective in diet-induced obesity rat model with myocardial infarction. *Life Sci.* 2017;191:157-65.
45. Piccoli MT, Gupta SK, Viereck J, Foinquinos A, Samolovac S, Kramer FL, et al. Inhibition of the Cardiac Fibroblast-Enriched lncRNA Meg3 Prevents Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction. *Circ Res.* 2017;121(5):575-83.
46. Li Z, Abdullah CS, Jin ZQ. Inhibition of PKC- $\theta$  preserves cardiac function and reduces fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol.* 2014;171(11):2913-24.
47. Egemnazarov B, Crnkovic S, Nagy BM, Olschewski H, Kwapiszewska G. Right ventricular fibrosis and dysfunction: Actual concepts and common misconceptions. *Matrix Biol.* 2018;68-69:507-21.
48. Zhang Y, Chen W, Wang Y. STING is an essential regulator of heart inflammation and fibrosis in mice with pathological cardiac hypertrophy via endoplasmic reticulum (ER) stress. *Biomed Pharmacother.* 2020;125:110022.
49. Guan C, Zhang HF, Wang YJ, Chen ZT, Deng BQ, Qiu Q, et al. The Downregulation of ADAM17 Exerts Protective Effects against Cardiac Fibrosis by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress and Mitophagy. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:5572088.
50. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *Febs j.* 2016;283(14):2640-52.
51. Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(12):995-1019.

52. van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(10):2253-62.
53. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, Sorianello E, Muñoz JP, Sala D, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(14):5523-8.
54. Schneeberger M, Dietrich MO, Sebastián D, Imbernón M, Castaño C, Garcia A, et al. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell*. 2013;155(1):172-87.
55. Yuan M, Gong M, Zhang Z, Meng L, Tse G, Zhao Y, et al. Hyperglycemia Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Atrial Cardiomyocytes, and Mitofusin-2 Downregulation Prevents Mitochondrial Dysfunction and Subsequent Cell Death. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:6569728.
56. Hartwick Bjorkman S, Oliveira Pereira R. The Interplay Between Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress, and Nrf2 Signaling in Cardiometabolic Health. *Antioxid Redox Signal*. 2021;35(4):252-69.
57. Li SJ, Liu CH, Chu HP, Mersmann HJ, Ding ST, Chu CH, et al. The high-fat diet induces myocardial fibrosis in the metabolically healthy obese minipigs-The role of ER stress and oxidative stress. *Clin Nutr*. 2017;36(3):760-7.
58. Jian L, Lu Y, Lu S, Lu C. Chemical Chaperone 4-Phenylbutyric Acid Reduces Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Med Sci Monit*. 2016;22:5218-27.
59. Luo T, Kim JK, Chen B, Abdel-Latif A, Kitakaze M, Yan L. Attenuation of ER stress prevents post-infarction-induced cardiac rupture and remodeling by modulating both cardiac apoptosis and fibrosis. *Chem Biol Interact*. 2015;225:90-8.
60. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004;11(4):381-9.
61. Jackson JG, Thayer SA. Mitochondrial modulation of Ca<sup>2+</sup> -induced Ca<sup>2+</sup> -release in rat sensory neurons. *J Neurophysiol*. 2006;96(3):1093-104.

62. Görlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1391-418.
63. Al Ojaimi M, Salah A, El-Hattab AW. Mitochondrial Fission and Fusion: Molecular Mechanisms, Biological Functions, and Related Disorders. *Membranes (Basel)*. 2022;12(9).
64. Schrepfer E, Scorrano L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell*. 2016;61(5):683-94.
65. Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF, Jr., Stanley WC, et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(1):H167-79.
66. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909-50.
67. Tian H, Yu D, Hu Y, Zhang P, Yang Y, Hu Q, et al. Angiotensin II upregulates cyclophilin A by enhancing ROS production in rat cardiomyocytes. *Mol Med Rep*. 2018;18(5):4349-55.
68. Murphy E. Cyclophilin D regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Curr Opin Physiol*. 2022;25.
69. Pérez MJ, Quintanilla RA. Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore. *Dev Biol*. 2017;426(1):1-7.
70. Lim SY, Hausenloy DJ, Arjun S, Price AN, Davidson SM, Lythgoe MF, et al. Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure. *J Cell Mol Med*. 2011;15(11):2443-51.
71. Pang J, Peng H, Wang S, Xu X, Xu F, Wang Q, et al. Mitochondrial ALDH2 protects against lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction by suppression of ER stress and autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(6):1627-41.
72. Hsu YJ, Hsu SC, Hsu CP, Chen YH, Chang YL, Sadoshima J, et al. Sirtuin 1 protects the aging heart from contractile dysfunction mediated through the inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in

cardiac-specific Sirtuin 1 knockout mouse model. *Int J Cardiol.* 2017;228:543-52.

73. Andersson DC, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang SJ, Katz A, et al. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the  $\beta$ -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol.* 2011;589(Pt 7):1791-801.

74. Singh V, Ubaid S. Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation.* 2020;43(5):1589-98.

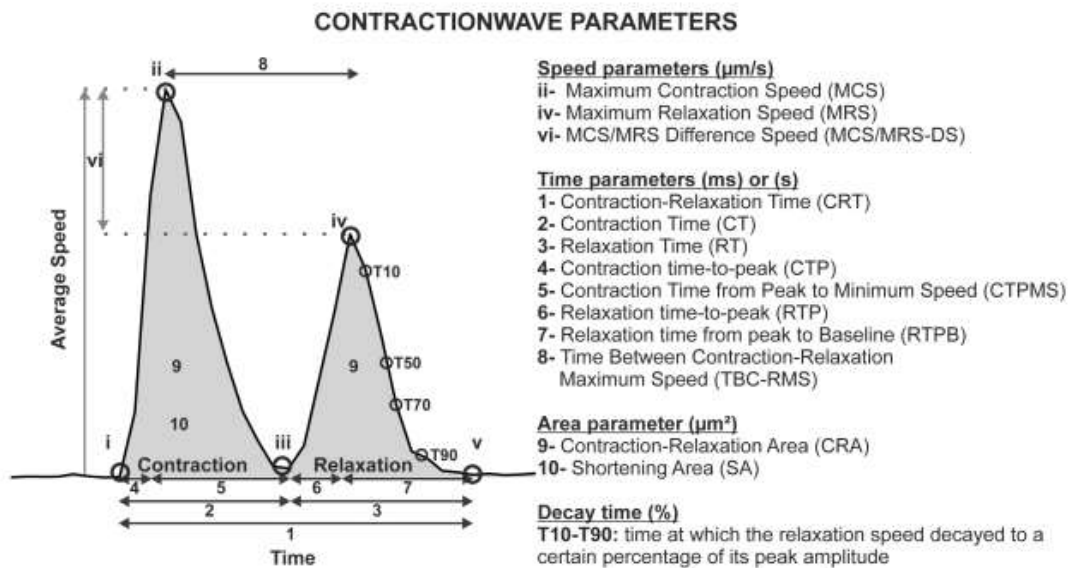
75. Yang L, Wang J, Yang J, Schamber R, Hu N, Nair S, et al. Antioxidant metallothionein alleviates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial apoptosis and contractile dysfunction. *Free Radic Res.* 2015;49(10):1187-98.

## **SUPPLEMENTARY MATERIALS**

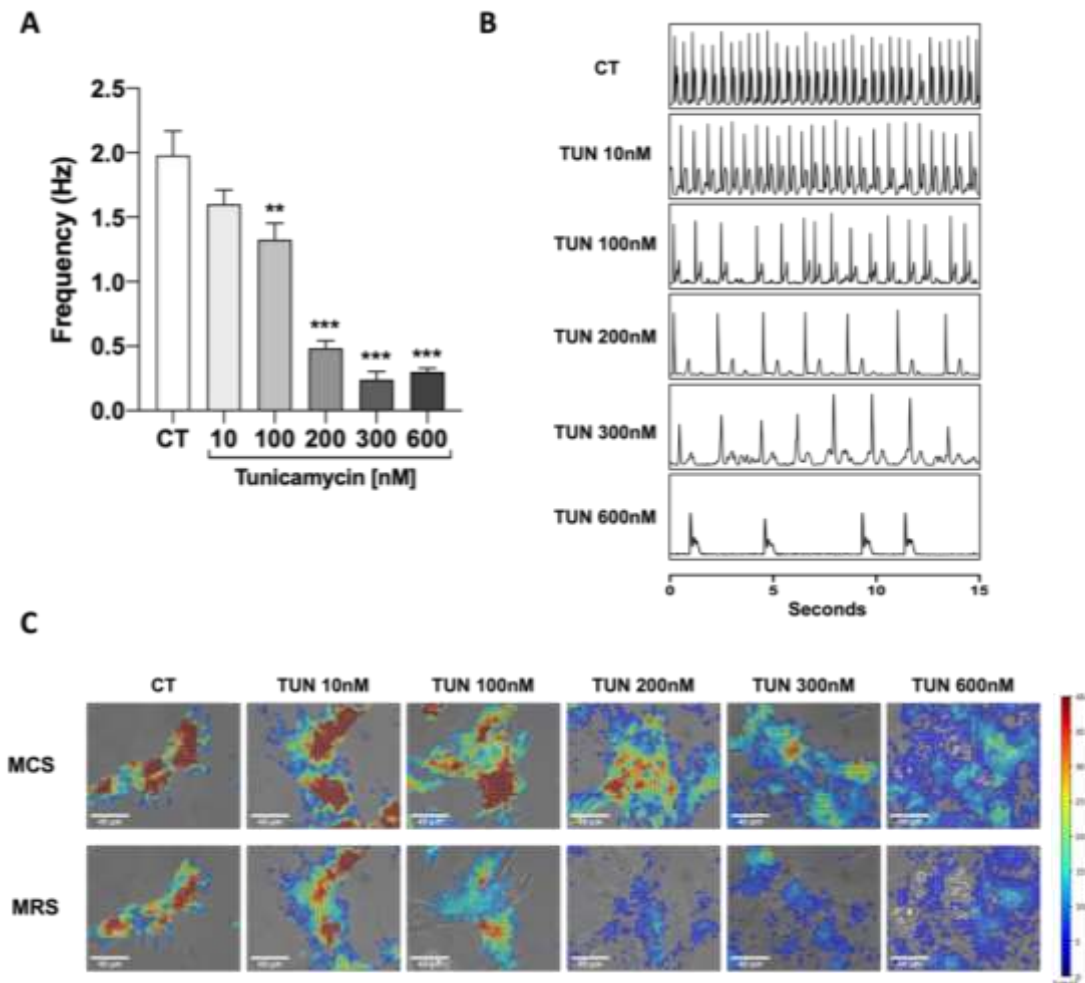
**The role of mitochondrial oxidative stress in cardiac damage induced by obesity associated with myocardial infarction in rats.**

**This file includes:**

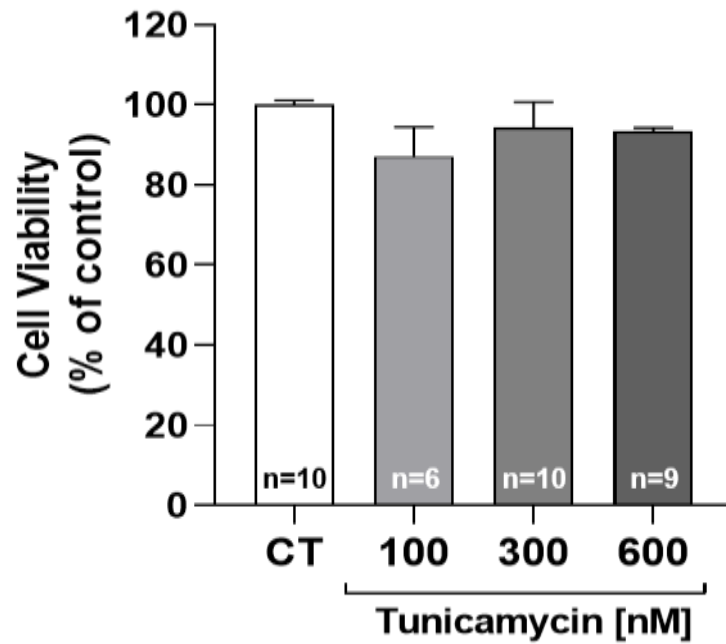
3 supplemental figures.



**Figure S1: Representation of cellular contractility parameters during a contraction-relaxation cycle of cardiomyocytes.** Left, sample average speed wave acquired from one contraction-relaxation cycle in cardiomyocytes. All points identified with roman numerals correspond to the phases of the contraction cycle. Right, a summary of CONTRACTIONWAVE parameters obtained during a contraction-relaxation cycle. i, iii and v = resting. <sup>(1)</sup>



**Figure S2: Effects of different doses of tunicamycin on the contraction frequency in isolated rat cardiomyocytes.** (A) Effects of the endoplasmic reticulum stress inductor, tunicamycin (TUN) (10-600 nM) for 24 hours on frequency of contraction. (B) Graphical detection of contraction frequency modifications recorded from tunicamycin-treated rat neonatal cardiomyocytes. (C) Cardiomyocytes maximum displacement speed in visual and numerical intensity scale detection obtained from cells treated with tunicamycin (10-600 nM). Maximum contraction speed (MCS); Maximum relaxation speed (MRS). (Magnification: 40X; scale bar: 40 $\mu$ m). Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 2-15 cells per group. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. CT.



**Figures S3: The effect of tunicamycin treatment on cell viability in isolated neonatal rat cardiomyocytes.** Cell viability (%) in isolated neonatal rat cardiomyocytes in response to tunicamycin (TUN; 100, 300 and 600 nM) for 24 hours. Bar graphs represent the means  $\pm$  SEM of the cells from each experimental group. n=number of repetitions. Data represent results of 4 independent experiments.

## References

1. Scalzo S, Afonso MQL, da Fonseca NJ, Jr., Jesus ICG, Alves AP, Mendonça C, et al. Dense optical flow software to quantify cellular contractility. *Cell Rep Methods*. 2021;1(4):100044.

# DISCUSIÓN

Existen diferentes estudios que muestran los efectos deletéreos de la obesidad y del IM sobre la salud cardiovascular. Diferentes estudios han mostrado que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo para sufrir un IM. En este contexto, se planteó este estudio con la intención de comprender los mecanismos que participan en las alteraciones cardiovasculares asociadas a la obesidad y al IM y cuyo objetivo fue investigar el papel del estrés oxidativo mitocondrial en el daño cardiovascular en el contexto de la obesidad, y su implicación en el daño cardíaco asociado al IM, así como en las alteraciones cardíacas en una situación patológica en la que ambas patologías son concomitantes. Los resultados obtenidos muestran el efecto beneficioso del empleo de un antioxidante mitocondrial en los citados contextos patológicos. El tratamiento con el antioxidante mitocondrial, MitoQ, fue capaz mejorar las alteraciones funcionales en situaciones de obesidad y/o IM, efecto que se acompañó con una reducción de la fibrosis cardíaca y una prevención de la activación del estrés del RE. Los estudios realizados en células cardíacas y vasculares mostraron que el MitoQ fue capaz de prevenir la activación del estrés del RE y la producción de componentes y mediadores de la MEC en respuesta a un factor profibrótico como la Ang II. Por tanto, los datos obtenidos muestran la relación existente entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE y su papel en procesos fibróticos, mostrando al estrés oxidativo mitocondrial como una posible diana terapéutica en el daño cardiovascular asociado a la obesidad y/o el IM.

Diferentes estudios han destacado que la obesidad y la isquemia miocárdica producen un desequilibrio redox que puede mediar las alteraciones cardiovasculares asociadas a dichas patologías. Teniendo en cuenta que la mitocondria es la principal fuente de radicales libres, se decidió utilizar el antioxidante mitocondrial MitoQ con objeto de evaluar el papel del estrés oxidativo mitocondrial sobre las alteraciones cardiovasculares en modelos de obesidad y de IM. El MitoQ es un antioxidante dirigido a las mitocondrias que puede atravesar las bicapas de fosfolípidos de la membrana mitocondrial y reducir la formación de radicales libres sin afectar la fosforilación oxidativa

mitocondrial <sup>(326, 343)</sup>. En este estudio, la eficacia del MitoQ fue comprobada por su capacidad de disminuir los niveles de aniones superóxido, una de las principales EROs, tanto en el corazón de ratas obesas como de ratas infartadas. Asimismo, el MitoQ fue capaz de prevenir el aumento de los niveles proteicos de 4HNE, un importante producto de peroxidación lipídica estimulado por el estrés oxidativo, en el corazón de ratas con IM asociado o no con la obesidad. Asimismo, en nuestro estudio *in vitro* el MitoQ fue capaz de disminuir la producción de anión superóxido inducida por la Ang II en CMLV y en fibroblastos cardíacos mostrando la eficacia del antioxidante mitocondrial. Los resultados obtenidos confirman los hallazgos de otros estudios donde se ha observado que el MitoQ disminuye la peroxidación lipídica y la producción de anión superóxido en el contexto de la obesidad y de la isquemia miocárdica <sup>(62, 344, 345)</sup>.

El estudio del papel del estrés oxidativo mitocondrial sobre las alteraciones cardíacas se ha desarrollado en diferentes modelos experimentales. El modelo experimental de obesidad inducida por la administración de una dieta rica en grasa durante 6 semanas no muestra cambios funcionales y, por tanto, cabe destacar que los efectos del MitoQ son previos a la aparición de cambios en la función cardíaca actuando sobre los mecanismos implicados en el daño cardiovascular asociado a la obesidad. Por contra, en el modelo de IM en presencia o ausencia de obesidad se trata de un modelo que presenta alteraciones funcionales tanto sistólica como diastólica, tratándose de modelos animales que permiten estudiar la repercusión del tratamiento con un antioxidante mitocondrial sobre las consecuencias funcionales en modelos de daño cardíaco.

La obesidad está asociada a cambios metabólicos, estructurales y funcionales en el miocardio en respuesta a un aumento de la adiposidad que conducen a la disfunción sistólica y/o diastólica del VI. Se ha visto que estos cambios están relacionados con la resistencia a la acción de la insulina, la dislipidemia, la hiperactivación del sistema simpático, la activación del SRAA o la mayor

producción de adipocinas por el tejido adiposo, entre otros (59, 346, 347, 348). Sin embargo, además de depender de estas alteraciones, la aparición de cambios en la función cardíaca y el desarrollo de insuficiencia cardíaca en el individuo obeso depende de otros factores como la severidad de la patología, la evolución a lo largo del tiempo y la presencia de otras enfermedades concomitantes (349, 350, 351). Además, en el caso de modelos experimentales de obesidad, la cepa de los animales y el método de inducción de la patología puede determinar la aparición de disfunción cardíaca. En este contexto, se ha visto que ratas Wistar alimentadas con dieta rica en grasa durante más tiempo al empleado en este estudio (10 semanas), desarrollan disfunción diastólica (352). Por otro lado, en otro estudio no se observó cambios en la función cardíaca de ratones alimentados con dieta rica en grasa por un periodo de 12 semanas (353).

Con relación al IM, han sido destacadas diferentes alteraciones moleculares y estructurales que conducen a la disfunción cardíaca (165, 166, 167, 168). En diferentes modelos de IM en ratas y en cerdos se observó una importante disminución de la función sistólica y diastólica (354, 355). En nuestro estudio, tanto animales infartados como infartados y obesos mostraron una reducción en la función sistólica (evaluada mediante la FEVI) y en la función diastólica con una reducción del ratio E/A. Además, los animales con IM presentaron una reducción en el *strain* miocárdico circunferencial y radial, que representa el acortamiento porcentual de la fibra miocárdica en sístole y que se considera un predictor de disfunción ventricular (356, 357). El estrés oxidativo mitocondrial parece jugar un papel importante en el desarrollo de la disfunción cardíaca en animales con IM asociado o no a la obesidad, ya que el tratamiento con MitoQ fue capaz de prevenir el descenso de la FEVI y del ratio E/A. Es importante destacar que todos estos efectos beneficiosos del tratamiento con el antioxidante mitocondrial sobre la función cardíaca, fueron en ausencia de modificaciones del tamaño del infarto.

Las alteraciones funcionales pueden ser consecuencia también de alteraciones estructurales. En este sentido, nuestros datos indican importantes alteraciones en la estructura cardíaca de animales HFD<sup>(62)</sup>, IM y IM+HFD. Todos estos animales han presentado una hipertrofia cardíaca caracterizada por el aumento del peso relativo del corazón sin modificaciones en el grosor de la pared posterior ni del SIV. Además, en animales HFD y IM se observó un aumento del área de los cardiomiocitos y los animales IM han presentado un aumento de la masa del VI, otros indicativos de hipertrofia cardíaca. La inhibición del estrés oxidativo mitocondrial con el tratamiento con MitoQ previno la hipertrofia cardíaca tanto en los animales obesos como infartados, sin embargo, no fue capaz de mejorar la hipertrofia cardíaca en animales IM+HFD. Estos datos sugieren la relevancia del estrés oxidativo mitocondrial sobre el desarrollo de hipertrofia ventricular. Diferentes estudios han destacado el estrés oxidativo como un importante mediador de la hipertrofia cardíaca en diferentes etiologías<sup>(358)</sup>, incluida la obesidad<sup>(359)</sup> y la isquemia miocárdica<sup>(360)</sup>. Se ha descrito que el estrés oxidativo puede activar diferentes vías de señalización prohipertróficas que son atenuadas por el tratamiento con diferentes antioxidantes. En consecuencia, el tratamiento con antioxidantes o, la manipulación genética de vías implicadas en el estrés oxidativo, produce una mejora del remodelado cardíaco y de las alteraciones en la función cardíaca en varios modelos experimentales<sup>(359, 360, 361, 362)</sup>. En este contexto, diferentes estudios apoyan nuestros resultados demostrando que el tratamiento con el antioxidante MitoQ tiene efectos protectores contra el desarrollo de hipertrofia cardíaca en animales hipertensos<sup>(363, 364)</sup>. Es importante destacar que este efecto es independiente de la presencia de hipertensión debido a que los datos derivados de nuestro trabajo son en animales normotensos y en ausencia de alteraciones en el área de la capa media y del lumen de la arteria aorta en los animales obesos.

Diferentes estudios han mostrado que, junto con la hipertrofia ventricular, la deposición excesiva de componentes de la MEC que conlleva al desarrollo de fibrosis es uno de los factores clave para el desarrollo de alteraciones tanto

estructurales como funcionales a nivel cardiovascular. La fibrosis es una característica común a varias patologías cardiovasculares como la obesidad, el IM, la hipertensión arterial o la aterosclerosis, entre otras <sup>(365, 366, 367)</sup>. En el sistema cardiovascular el remodelado de la MEC que resulta por un acumulo excesivo de colágeno, puede conducir a alteraciones funcionales y al desarrollo de insuficiencia cardíaca, como consecuencia de una mayor rigidez cardiovascular, disfunción contráctil y la aparición de arritmias <sup>(368, 369)</sup>. Nuestros datos muestran que la obesidad <sup>(62)</sup>, el IM y la asociación de ambas patologías (IM+HFD) generó alteraciones en la MEC resultando en el desarrollo de la fibrosis miocárdica. Además, la fibrosis cardíaca fue acompañada del aumento de la expresión proteica de colágeno I y de los mediadores profibróticos TGF- $\beta$  y CTGF, tanto en ratas obesas como en ratas con IM asociado o no a la obesidad (IM y IM+HFD). Todos estos cambios fueron mejorados con el tratamiento con MitoQ. A nivel vascular, MitoQ también previno la fibrosis aórtica y coronaria en animales obesos, sin embargo, no fue capaz de prevenir el aumento de los niveles proteicos de CTGF en la aorta de ratas obesas.

El colágeno tipo I es el subtipo de colágeno predominante en el sistema cardiovascular, constituyendo cerca de 70-75% del colágeno que forma parte de la pared arterial y aproximadamente 80% del colágeno cardíaco. El TGF- $\beta$  y el CTGF son dos mediadores profibróticos importantes <sup>(370, 371, 372)</sup>. El TGF- $\beta$  es un regulador del remodelado y de la fibrosis tisular, induciendo el crecimiento celular, la proliferación de fibroblastos y su diferenciación en miofibroblastos. La mayoría de estas respuestas inducidas por el TGF- $\beta$  implican la estimulación de CTGF. La expresión de CTGF es bastante limitada durante la edad adulta, sin embargo, aumenta frente a estímulos hormonales, citocinas, factores de crecimiento, hipoxia o estrés mecánico, entre otros <sup>(373, 374, 375, 376, 377)</sup>. Diferentes estudios han demostrado que la severidad de la fibrosis se asocia con una menor supervivencia en pacientes con insuficiencia cardíaca y otras patologías cardíacas <sup>(199, 200)</sup>. En concordancia con nuestros hallazgos, otros estudios también han observado un aumento de TGF- $\beta$ ,

CTGF y colágeno I en el contexto de la obesidad <sup>(47, 378)</sup> y del IM <sup>(379, 380, 381)</sup>. Además, se ha visto que la inhibición de CTGF en un modelo de IM fue capaz de inhibir la fibrosis miocárdica y mejorar la función cardíaca <sup>(382, 383, 384)</sup>. Del mismo modo, la inhibición de TGF- $\beta$  fue capaz de disminuir la apoptosis, el estrés oxidativo y la fibrosis cardíaca asociada al IM <sup>(380)</sup>. Asimismo, otro estudio apoya nuestros resultados al demostrar que existe una relación importante entre el aumento del TGF- $\beta$ , el estrés oxidativo y la fibrosis en la válvula mitral de pacientes y en modelos genéticos experimentales con deficiencia de enzimas antioxidantes, como es la superóxido dismutasa 1 (SOD1) <sup>(385)</sup>.

Estudios previos han demostrado que diferentes tratamientos que producen un descenso del estrés oxidativo se asocian con un efecto protector sobre el desarrollo de la fibrosis en las enfermedades cardiovasculares, como la obesidad e IM <sup>(386, 387, 388, 389)</sup>. En concordancia con estos estudios, nuestros datos sugieren que el estrés oxidativo mitocondrial media la fibrosis cardiovascular en el contexto de la obesidad, del IM y en el contexto patológico en la que ambas patologías están asociadas, debido a la capacidad del MitoQ de reducir la fibrosis cardiovascular en los diferentes contextos patológicos estudiados.

Además de los efectos protectores de la reducción de las EROs mitocondriales sobre la fibrosis cardiovascular, el MitoQ también previno la activación del estrés del RE a nivel cardiovascular en animales obesos, y a nivel cardíaco tanto en animales IM como en animales IM+HFD. Diferentes estudios apoyan nuestros datos al demostrar que tanto la obesidad <sup>(265, 267, 390)</sup> como el IM <sup>(277, 278, 281)</sup> son capaces de estimular la activación de distintas vías de la UPR en el corazón en diferentes modelos experimentales. La activación del estrés del RE genera efectos sobre el remodelado cardíaco y sobre la homeostasis del calcio, además de generar la inducción de inflamación, estrés oxidativo, o apoptosis, entre otros efectos deletéreos <sup>(250)</sup>. En este sentido, uno de los principales factores implicados en los procesos

apoptóticos es el CHOP. En nuestro estudio comprobamos la interacción entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE ya que el tratamiento con el antioxidante mitocondrial, MitoQ, fue capaz de prevenir el aumento en los niveles proteicos del marcador del estrés del RE, BiP. Además, observamos que la vía CHOP estaba aumentada en el corazón y en la aorta de animales obesos y las vías CHOP, ATF6 $\alpha$  y ATF4 estaban activadas en el corazón de animales infartados asociados o no a la obesidad. Todos estos cambios fueron prevenidos al inhibir el estrés oxidativo mitocondrial mediante el tratamiento con MitoQ.

De manera similar a nuestros datos, en un estudio con cerdos alimentados con dieta rica en grasa se observó una importante fibrosis cardíaca, que se acompañó con la activación del estrés del RE caracterizada por un aumento de la vía CHOP <sup>(267)</sup>. Además, se ha descrito que la isquemia o la hipoxia prolongada también produce la activación de la vía PERK resultando en el aumento de la expresión génica y proteica del factor de transcripción proapoptótico CHOP <sup>(282, 283)</sup>. Del mismo modo, se ha descrito que la vía ATF6 parece estar implicada en las consecuencias cardíacas estructurales y funcionales asociadas a la lesión miocárdica inducida por la isquemia/reperfusión en ratas <sup>(287)</sup>. La activación de la vía PERK resulta en el aumento de ATF4 que estimula la expresión de CHOP <sup>(391)</sup>, que puede desempeñar, a su vez, un papel importante en la apoptosis inducida por el estrés del RE en células cardíacas en diferentes contextos patológicos <sup>(392)</sup> a través de la supresión de la proteína de supervivencia Bcl2 <sup>(393)</sup>. Se ha sugerido que ATF4 puede jugar un papel clave en la producción de las EROs y en la activación de fibroblastos cardíacos, lo que podría resultar en el desarrollo de fibrosis miocárdica <sup>(394)</sup>. Asimismo, se ha visto en varios modelos de daño cardíaco que la inhibición del estrés del RE se acompañó con una reducción de la fibrosis cardíaca. En animales obesos, la inhibición del estrés del RE fue capaz de mejorar la fibrosis auricular y la aparición de arritmias <sup>(265)</sup>, atenuar el remodelado cardíaco, el deterioro en la función cardíaca y el aumento de la presión arterial sistólica <sup>(266)</sup>. Diferentes estudios han mostrado

que la deficiencia de CHOP en el corazón de ratones mejoró el daño cardíaco asociado a la isquemia miocárdica <sup>(284)</sup>, atenuó la hipertrofia y la disfunción cardíaca inducida por sobrecarga de presión <sup>(285)</sup>.

A nivel vascular también se ha descrito la participación del estrés del RE en el daño vascular asociado a la obesidad <sup>(101, 254, 274, 275)</sup>. Diferentes estudios han sugerido una relación entre la activación del RE en el síndrome metabólico y la disfunción endotelial. Además, han destacado el importante papel que el estrés oxidativo mitocondrial juega en las alteraciones vasculares <sup>(395)</sup>. Del mismo modo, han sugerido que el estrés del RE también induce la fibrosis vascular ya que la inhibición del estrés del RE disminuyó el aumento de la expresión génica y proteica del mediador profibrótico TGF- $\beta$  observado en la aorta de ratones que recibieron una infusión de Ang II <sup>(254)</sup>.

En conjunto, estos estudios apoyan nuestros hallazgos que indican una asociación entre la fibrosis cardiovascular en animales obesos y la activación del estrés del RE. En este sentido, los animales obesos presentaron una asociación positiva entre la fibrosis miocárdica y los niveles de BiP, PDIA6 y CHOP. Del mismo modo, la fibrosis de la capa media de la arteria coronaria descendente de estos animales se asoció con los niveles elevados de BiP y PDIA6.

Como se ha mencionado anteriormente, la activación del SRAA puede favorecer la generación de las EROs en el miocardio <sup>(396)</sup> que pueden participar en el desarrollo de daño cardiovascular. Se ha descrito que la Ang II, un factor profibrótico bien conocido a nivel cardíaco y vascular <sup>(397, 398)</sup>, está elevado en pacientes obesos <sup>(399)</sup>. De acuerdo con estos antecedentes, hemos observado un aumento en los niveles plasmáticos de Ang II en las ratas obesas, que se normalizó con el tratamiento con MitoQ. En nuestro estudio *in vitro* con fibroblastos cardíacos y CMLV, la Ang II además de aumentar la producción de anión superóxido, promovió un aumento en los niveles proteicos de colágeno I que fue acompañado de un aumento de la expresión proteica de TGF- $\beta$  y CTGF. La presencia de MitoQ previno no sólo los efectos

prooxidantes de la Ang II, sino que también previno sus efectos profibróticos. Estos datos muestran que el estrés oxidativo mitocondrial media los efectos profibróticos y prooxidantes de Ang II y sugieren su participación en el remodelado de la MEC en el contexto de la obesidad, confirmando los resultados obtenidos en los modelos animales. Es importante destacar que los fibroblastos cardíacos y las CMLV expuestas a Ang II presentaron la activación del estrés RE caracterizada por un aumento de los niveles proteicos de los marcadores del estrés RE (BiP y PDIA6). Este efecto se observó previamente en adipocitos<sup>(400)</sup>, en podocitos<sup>(401)</sup> y en células  $\beta$  pancreáticas<sup>(402)</sup>. En nuestro estudio, mostramos por primera vez que la Ang II promueve la activación del estrés del RE en fibroblastos cardíacos y CMLV a través de la producción de estrés oxidativo mitocondrial, ya que el MitoQ previno dicha activación. Sin embargo, es importante mencionar que la activación del estrés del RE parece implicar diferentes vías en los fibroblastos cardíacos y en las CMLV, ya que el aumento de los niveles de las proteínas CHOP y ATF6 $\alpha$  observado en fibroblastos cardíacos tratados con Ang II no se observó en CMLV.

Un estudio previo demostró que la inhibición farmacológica del estrés del RE es capaz de prevenir la fibrosis cardíaca inducida por la infusión de Ang II en ratones<sup>(254)</sup>. En este contexto, hemos demostrado que el tratamiento con el inhibidor de estrés del RE, el 4-PBA, previene el aumento de la producción de MEC inducidas por Ang II tanto en fibroblastos cardíacos como en CMLV. El papel del estrés del RE en la producción de MEC fue confirmado por el inductor farmacológico del estrés del RE, la tunicamicina. Las CMLV expuestas a tunicamicina presentaron un aumento en los niveles de ARN mensajero de colágeno tipo I y TGF- $\beta$ . Estos datos apoyan la asociación entre la fibrosis cardiovascular y la activación del estrés del RE que observamos en ratas obesas. De manera interesante, observamos que la inhibición del estrés del RE con 4-PBA en fibroblastos cardíacos y en CMLV estimulados con Ang II también previno el aumento de la producción de anión superóxido. De igual manera, la activación del estrés del RE inducida por la tunicamicina promovió

un aumento en la producción de las EROs en CMLV, lo que respalda la idea de que existe una relación directa entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE. La relación existente entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE también es fundamentada por la capacidad del MitoQ de inhibir el estrés del RE en los diferentes modelos experimentales de nuestro estudio *in vivo*.

Diferentes estudios han demostrado la relación que existe entre el estrés del RE y el estrés oxidativo <sup>(403, 404, 405)</sup>. Los efectos de las EROs como segundo mensajero en la regulación del transporte de calcio del RE podrían explicar esta relación. Curiosamente, el estrés oxidativo puede modular los reguladores clave de la homeostasis del calcio intracelular. Las EROs pueden inducir la activación de los receptores de rianodina (RyR) y el receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R), aumentando la concentración de calcio citoplasmática y su biodisponibilidad para las mitocondrias. Por otro lado, las EROs suprimen la actividad calcio-ATPasa (SERCA), bloqueando la entrada del calcio desde el citoplasma hacia el RE lo que conduce a un aumento de su concentración intracelular. Además, las alteraciones en la homeostasis del calcio inducidas por las EROs pueden afectar a la síntesis y a la liberación de proteínas y, como consecuencia generar el acumulo de proteínas desplegadas y/o mal plegadas en el lumen del RE, resultando en la activación de vías de la UPR. En este contexto, la activación del estrés del RE favorece el aumento de la concentración de calcio en las mitocondrias, lo que induce a una mayor producción de las EROs, creando un círculo vicioso <sup>(406)</sup>. En este sentido, los efectos beneficiosos del tratamiento con el antioxidante mitocondrial sobre la activación del estrés del RE en animales con IM también se reflejan en los niveles de la proteína calreticulina (CALRT), una de las chaperonas de RE que se une al calcio y cuyos niveles están aumentados en respuesta al estrés del RE en el corazón <sup>(407)</sup>. Se ha descrito que su expresión aumenta durante la activación del estrés del RE en cardiomiocitos promoviendo el desarrollo de cardiomiopatía, arritmias y, finalmente la aparición de insuficiencia cardíaca <sup>(408)</sup>. Estos efectos pueden ser debidos, a

la relación existente entre el estrés del RE, la CALRT y la acumulación de componentes de la MEC a través de diferentes mecanismos, incluidos la modulación de los efectos de TGF- $\beta$  <sup>(409)</sup>. Además, la CALRT puede mediar la hipertrofia y la apoptosis inducidas por el estrés del RE, lo que puede desempeñar un papel clave en el remodelado cardíaco en el contexto de la isquemia miocárdica <sup>(407, 410)</sup>. Sin embargo, los datos muestran que el MitoQ no fue capaz de prevenir todas las alteraciones relacionadas con la homeostasis del calcio ya que no fue capaz de prevenir el aumento de los niveles proteicos de Calpaína 1 en el corazón de animales infartados. La Calpaína 1 es una proteasa dependiente de calcio presente en el citosol y en las mitocondrias, que tiene un papel importante en el procesamiento y en la degradación de proteínas. Su expresión está aumentada en condiciones patológicas asociadas a la sobrecarga de calcio, incluido el IM, y contribuye al desarrollo de la lesión cardíaca asociada a la isquemia <sup>(411, 412, 413)</sup>. Se ha descrito que la Calpaína 1 está activada en diferentes procesos biológicos como el remodelado del citoesqueleto, la ruptura de la adhesión entre células y la muerte de los cardiomiocitos que ocurren en respuesta a la isquemia miocárdica <sup>(414)</sup>. Su sobreexpresión promueve el deterioro de la función mitocondrial, induce la apoptosis y el remodelado cardíaco patológico, mientras que se ha demostrado que su inhibición promueve efectos beneficiosos en el contexto del IM <sup>(411, 413)</sup>.

En concordancia con nuestros hallazgos, se ha visto que el uso de un antioxidante general fue capaz de disminuir las EROs de origen mitocondrial, efecto que se acompañó con un descenso de la activación del estrés del RE. Dicho efecto fue acompañado de la prevención del deterioro de la función cardíaca (FE, FA y ratio E/A), reducción de la hipertrofia y de la fibrosis cardíaca en un modelo de cardiopatía diabética <sup>(415)</sup>.

Teniendo en cuenta que el estrés del RE es considerado un mecanismo crucial involucrado en las alteraciones en el manejo del calcio intracelular, lo que puede dar lugar a alteraciones en la contractilidad miocárdica y disfunción

cardíaca <sup>(416, 417, 418)</sup>, hemos evaluado los efectos directos de la activación del estrés del RE sobre la contractilidad de cardiomiocitos de ratas neonatales e investigado la implicación del estrés oxidativo mitocondrial.

Nuestros datos muestran que el tratamiento con otro antioxidante mitocondrial, el MitoTempo <sup>(419)</sup>, fue capaz de prevenir la disminución de la frecuencia del ciclo de contracción-relajación, así como la disminución de la velocidad y tiempo de relajación de cardiomiocitos tratados con el activador farmacológico del estrés del RE, la tunicamicina. Nuestros resultados confirman la existencia de una relación entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del RE, la cual no se asocia únicamente con el desarrollo de fibrosis, sino que también altera la contractilidad cardíaca.

Nuestros resultados también son consistentes con estudios anteriores que mostraron un aumento del estrés del RE en el miocardio de ratones envejecidos con delección de Sirtuin 1 (*Sirt1*<sup>-/-</sup>), la cual ejerce acciones antioxidantes y cardioprotectoras <sup>(420)</sup>. En dicho estudio, el estrés del RE se asoció con alteraciones en la función contráctil del corazón de ratones *Sirt1*<sup>-/-</sup> <sup>(421)</sup>. Yang y col., han observado resultados similares con la inducción del estrés del RE por la administración de tunicamicina en ratones con sobreexpresión de metalotioneína (proteína con acciones antioxidantes) en el corazón. Además de los cambios en la contractilidad cardíaca, en ausencia de la sobreexpresión del antioxidante, la tunicamicina promovió una alteración en la homeostasis del calcio, del daño mitocondrial y de la apoptosis, lo que resultó en un remodelado y disfunción cardíaca. Dichos efectos deletéreos derivados de la activación del estrés del RE mejoraron en los animales que sobreexpresaban metalotioneína a nivel cardíaco. Además, la tunicamicina empeoró parámetros de contractilidad de los cardiomiocitos como la disminución de la contracción celular, disminución tanto de la velocidad máxima de contracción como de relajación y disminución del tiempo de relajación sin cambios en el tiempo de contracción <sup>(417)</sup>.

Los efectos nocivos del estrés oxidativo pueden ser consecuencia directa de su interacción con diferentes moléculas celulares debido a su elevada capacidad oxidativa <sup>(422)</sup>. Las EROs pueden interactuar con el ADN de las células y causar modificaciones que conducen a la aparición de mutaciones genéticas <sup>(423)</sup>, oxidar y desnaturalizar proteínas, oxidar los lípidos de las membranas celulares provocando un aumento de su permeabilidad a productos nocivos como el malondialdehído (MDA), que dañan, aún más, las células <sup>(424)</sup>. Además, las EROs pueden dañar las propias mitocondrias al inducir el aumento de la expresión de importantes proteínas como la ciclofilina F, que está implicada en la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) y, en consecuencia, puede desencadenar el aumento de la permeabilidad mitocondrial. Esto puede amplificar la producción de las EROs al dañar las mitocondrias circundantes y, finalmente causar daño celular <sup>(425)</sup>. Las mitocondrias responden a los desequilibrios redox <sup>(426)</sup> y adaptan su morfología promoviendo la fusión con otras mitocondrias <sup>(427)</sup> para mantener su eficiencia energética. Una de las proteínas implicadas en dicho proceso adaptativo es la MFN <sup>(428)</sup>. Sin embargo, este cambio en la morfología mitocondrial impacta en la respuesta celular al estrés y sus interacciones con otros orgánulos como el RE. En este sentido, se ha descrito que los niveles de ciclofilina F aumentan de forma dependiente de los niveles de las EROs <sup>(429)</sup>, generando alteraciones mitocondriales. Estudios previos han observado un aumento de MFN1 y alteraciones en su actividad en el infarto de miocardio y en la insuficiencia cardíaca <sup>(430, 431)</sup>. Se ha visto que la inhibición de la MFN en el corazón de ratones resultó en efectos beneficiosos en un modelo de IM mediante la mejora de la sobrecarga de calcio y del estrés oxidativo <sup>(431)</sup>. Del mismo modo, la eliminación genética de ciclofilina F resultó en efectos cardioprotectores tras el IM, como la disminución del área del infarto, una mejora en la función sistólica del VI, una menor dilatación del VI, una menor hipertrofia de cardiomiocitos y una reducción en la fibrosis intersticial. Además, la inhibición farmacológica de la ciclofilina F redujo la proliferación de fibroblastos cardíacos <sup>(432)</sup> lo que confirma su implicación en el desarrollo de la fibrosis cardíaca. En el presente

estudio, el tratamiento con MitoQ fue capaz de prevenir el aumento de los niveles proteicos de ciclofilina F y MFN1 que estaban aumentados en el corazón de animales con IM, independientemente de la obesidad. Esto respalda una reducción en el mecanismo compensatorio para mantener la capacidad energética de las mitocondrias a fin de garantizar la homeostasis celular <sup>(433)</sup>. Además, estos datos muestran al estrés oxidativo mitocondrial como un mecanismo implicado en las modificaciones mitocondriales que podrían estar asociadas a las alteraciones en la función y estructura cardíaca en animales infartados. Dichas alteraciones mitocondriales no solo están presentes en el IM, sino que también han sido descritas en el contexto de la obesidad <sup>(434, 435)</sup>.

La interrelación entre el estrés oxidativo y el estrés del RE fue confirmada mediante un estudio que realizamos con pacientes que sufrieron su primer IM como por un estudio con necropsias de corazón de pacientes que habían sufrido un IM. En nuestro estudio hemos observado que tras el IM los pacientes presentaron fibrosis miocárdica que ocupaba el 40% del VI y que se acompañó con una reducción de la función cardíaca. Los pacientes presentaron, además, un aumento de los niveles plasmáticos de mieloperoxidasa (MPO), un marcador de estrés oxidativo que se asociaron con la fracción de volumen extracelular (VEC) miocárdica, un marcador subrogado de fibrosis intersticial. Los niveles elevados de MPO son predictores de la enfermedad de las arterias coronarias <sup>(436)</sup> y del riesgo de sufrir un IM <sup>(437)</sup>. Este valor predictivo se explica por sus acciones proinflamatorias y prooxidantes. La MPO conduce a alteraciones en el equilibrio redox a través de reducciones en los niveles de antioxidantes, incluidos los niveles de glutatión <sup>(438)</sup>. El hecho de que los niveles de MPO se asociaran con el VEC, un marcador subrogado de la fibrosis miocárdica (31838882), sugiere el papel potencial del estrés oxidativo en la fibrosis intersticial en el contexto de la isquemia miocárdica. Los datos clínicos obtenidos reafirman, por tanto, nuestros estudios experimentales en animales con IM. Después del seguimiento de 12 meses tras el IM, los pacientes

presentaron una mejoría en los cambios estructurales como la disminución del grosor del SIV y de la PP del VI y un descenso del área del infarto. Sin embargo, no se observaron mejoras ni en el VEC ni en la función cardíaca. Estos resultados confirman la relevancia de la fibrosis miocárdica en las alteraciones en la función cardíaca y apoyan nuestro estudio con ratas infartadas en la que una mejora de la fibrosis miocárdica se acompañó de mejoras en la función y estructura cardíaca.

De manera interesante, hemos observado niveles elevados tanto de colágeno como de BiP en muestras de necropsias de tejidos cardíacos de pacientes que sufrieron un IM en comparación con aquellos que habían muerto por diferentes causas. Estos resultados también respaldan nuestro estudio *in vivo* que sugiere la participación del estrés del RE en el desarrollo de fibrosis cardíaca en el contexto de la isquemia miocárdica.

En conjunto, los datos obtenidos muestran como el estrés oxidativo mitocondrial participa en el desarrollo de fibrosis y la disminución de la capacidad contráctil en el corazón en situaciones de IM y de obesidad. Dichos efectos parecen estar mediados por la activación del estrés del RE que se da en ambos contextos patológicos y que pueden conllevar al desarrollo de las alteraciones funcionales. Por tanto, el estrés oxidativo mitocondrial y/o el estrés del RE emergen como nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

# CONCLUSIONES

1. El estrés oxidativo mitocondrial media las alteraciones tanto de la función sistólica como diastólica asociadas al infarto de miocardio independientemente de la presencia de obesidad.
2. El estrés oxidativo mitocondrial media el remodelado cardíaco patológico en una situación de isquemia miocárdica u obesidad.
3. La fibrosis cardiovascular asociada a la obesidad y/o isquemia miocárdica es mediada por el estrés oxidativo mitocondrial, tanto en ausencia como en presencia de cambios funcionales.
4. El estrés oxidativo mitocondrial media las alteraciones de la contractibilidad cardíaca inducidas por la activación del estrés del retículo endoplásmico.
5. El estrés oxidativo mitocondrial ejerce sus efectos deletéreos en el contexto de la obesidad, del infarto de miocardio y en la concomitancia de ambas patologías, al menos en parte, a través de la activación del estrés del retículo endoplásmico.
6. Las alteraciones cardiovasculares asociadas a la obesidad y/o isquemia miocárdica parecen ser consecuencia de la interacción entre el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del retículo endoplásmico.
7. Nuestros datos sugieren que tanto el estrés oxidativo mitocondrial y el estrés del retículo endoplásmico emergen como posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de la obesidad y del infarto de miocardio.

# BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Obesidad y sobrepeso. Datos y cifras. 2021.
2. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Bluher M, Kovacs P, Bottcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*. 2019;92:37-50.
3. Martínez-Sanguinetti MA, Petermann-Rocha F, Villagrán M, Ulloa N, Nazar G, Troncoso-Pantoja C, et al. Desde una mirada global al contexto chileno: ¿Qué factores han repercutido en el desarrollo de obesidad en Chile? (Parte 2). *Revista chilena de nutrición*. 2020;47(2):307-16.
4. González H. Classification. *Managing Patients with Obesity*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 31-41.
5. Shahnazaryan U, Wojcik M, Bednarczuk T, Kurylowicz A. Role of Obesogens in the Pathogenesis of Obesity. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(9).
6. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85(9):660-7.
7. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S102-38.
8. OMS. A healthy lifestyle - WHO recommendations 2010 [Available from: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle---who-recommendations>].
9. Mladenova S, Andreenko E. Prevalence of underweight, overweight, general and central obesity among 8-15-years old Bulgarian children and adolescents (Smolyan region, 2012-2014). *Nutr Hosp*. 2015;31(6):2419-27.
10. Neovius M, Linne Y, Rossner S. BMI, waist-circumference and waist-hip-ratio as diagnostic tests for fatness in adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(2):163-9.
11. Onat A, Avci GS, Barlan MM, Uyarel H, Uzunlar B, Sansoy V. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(8):1018-25.
12. Taylor RW, Jones IE, Williams SM, Goulding A. Evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio, and the conicity index as screening tools for

high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3-19 y. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2):490-5.

13. Goh LG, Dhaliwal SS, Welborn TA, Lee AH, Della PR. Anthropometric measurements of general and central obesity and the prediction of cardiovascular disease risk in women: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 2014;4(2):e004138.

14. Krakauer NY, Krakauer JC. Untangling Waist Circumference and Hip Circumference from Body Mass Index with a Body Shape Index, Hip Index, and Anthropometric Risk Indicator. *Metab Syndr Relat Disord.* 2018;16(4):160-5.

15. Alvin J, Km DG. Correlation between Central Obesity and Liver Function in Young Adults—A Cross-Sectional Study. *Journal of Health and Allied Sciences NU.* 2022;13(02):273-7.

16. Consenso SEEDO 2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Medicina Clínica.* 2000;115(15):587-97.

17. Bergman RN, Stefanovski D, Buchanan TA, Sumner AE, Reynolds JC, Sebring NG, et al. A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(5):1083-9.

18. Valdez R. A simple model-based index of abdominal adiposity. *J Clin Epidemiol.* 1991;44(9):955-6.

19. Valdez R, Seidell JC, Ahn YI, Weiss KM. A new index of abdominal adiposity as an indicator of risk for cardiovascular disease. A cross-population study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1993;17(2):77-82.

20. Lobstein T, Brinsden, H., Neveux, M. World Obesity Atlas 2022 2022. Available from: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2022>.

21. Aranceta J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, et al. [Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study]. *Med Clin (Barc).* 2003;120(16):608-12.

22. Aranceta-Bartrina J, Perez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, Ramos-Carrera N, Lazaro-Masedo S. Prevalence of General Obesity and Abdominal Obesity in the Spanish Adult Population (Aged 25-64 Years) 2014-2015: The ENPE Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2016;69(6):579-87.

23. Encuesta europea de salud en España. Encuesta Europea de Salud 2020. Determinantes de salud: Cifras relativas. Características físicas. Índice de masa corporal población adulta según sexo y grupo de edad. Población de 18 y más años. [Internet]. 2020 [cited 5 Oct 2022]. Available from: <https://www.ine.es/jaxi/Tabla.htm?path=/t15/p420/a2019/p06/10/&file=01001.px&L=0>.
24. Rubio Herrera MA, Breton Lesmes I. Obesity in the COVID era: A global health challenge. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*. 2021;68(2):123-9.
25. Collaborators GBDO, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2017;377(1):13-27.
26. Piche ME, Poirier P, Lemieux I, Despres JP. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Prog Cardiovasc Dis*. 2018;61(2):103-13.
27. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Despres JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, et al. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(21):e984-e1010.
28. Sahakyan KR, Somers VK, Rodriguez-Escudero JP, Hodge DO, Carter RE, Sochor O, et al. Normal-Weight Central Obesity: Implications for Total and Cardiovascular Mortality. *Ann Intern Med*. 2015;163(11):827-35.
29. Rosen ED. Two paths to fat. *Nat Cell Biol*. 2015;17(4):360-1.
30. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(2):283-91.
31. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7.
32. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1785-8.
33. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354(6):610-21.
34. Frasca D, Blomberg BB, Paganelli R. Aging, Obesity, and Inflammatory Age-Related Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:1745.

35. Muller C, Zidek LM, Eichwald S, Kortman G, Koster MH, Calkhoven CF. Enhanced C/EBP $\beta$  function promotes hypertrophic versus hyperplastic fat tissue growth and prevents steatosis in response to high-fat diet feeding. *Elife*. 2022;11.
36. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*. 2006;74:443-77.
37. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):1023-33.
38. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
39. Wang Q, Wu H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. *Front Immunol*. 2018;9:2509.
40. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;320(3):C375-C91.
41. Feijoo-Bandin S, Aragon-Herrera A, Morana-Fernandez S, Anido-Varela L, Tarazon E, Rosello-Lleti E, et al. Adipokines and Inflammation: Focus on Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
42. Viridis A, Colucci R, Bernardini N, Blandizzi C, Taddei S, Masi S. Microvascular Endothelial Dysfunction in Human Obesity: Role of TNF- $\alpha$ . *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(2):341-8.
43. Panee J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine*. 2012;60(1):1-12.
44. Zhao S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res*. 2021;128(1):136-49.
45. Yanai H, Yoshida H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).
46. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).

47. Martínez-Martínez E, Jurado-López R, Valero-Munoz M, Bartolomé MV, Ballesteros S, Luaces M, et al. Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity. *J Hypertens*. 2014;32(5):1104-14; discussion 14.
48. Martínez-Martínez E, Miana M, Jurado-López R, Bartolomé MV, Souza Neto FV, Saldaña M, et al. The potential role of leptin in the vascular remodeling associated with obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(12):1565-72.
49. Rajpathak SN, Kaplan RC, Wassertheil-Smoller S, Cushman M, Rohan TE, McGinn AP, et al. Resistin, but not adiponectin and leptin, is associated with the risk of ischemic stroke among postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative. *Stroke*. 2011;42(7):1813-20.
50. Weikert C, Westphal S, Berger K, Dierkes J, Mohlig M, Spranger J, et al. Plasma resistin levels and risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2647-53.
51. Park HK, Kwak MK, Kim HJ, Ahima RS. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J Intern Med*. 2017;32(2):239-47.
52. Fontana A, Spadaro S, Copetti M, Spoto B, Salvemini L, Pizzini P, et al. Association between resistin levels and all-cause and cardiovascular mortality: a new study and a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120419.
53. Souza-Neto FV, Jimenez-Gonzalez S, Delgado-Valero B, Jurado-López R, Genty M, Romero-Miranda A, et al. The Interplay of Mitochondrial Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Fibrosis in Obese Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(8).
54. Cheng YW, Zhang ZB, Lan BD, Lin JR, Chen XH, Kong LR, et al. PDGF-D activation by macrophage-derived uPA promotes AngII-induced cardiac remodeling in obese mice. *J Exp Med*. 2021;218(9).
55. Masi S, Uliana M, Viridis A. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation. *Vascul Pharmacol*. 2019;115:13-7.
56. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):93-100.
57. Naylor C, Petri WA, Jr. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends Mol Med*. 2016;22(2):88-98.

58. Bluher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism*. 2015;64(1):131-45.
59. Martinez-Martinez E, Jurado-Lopez R, Cervantes-Escalera P, Cachofeiro V, Miana M. Leptin, a mediator of cardiac damage associated with obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;18(1):3-14.
60. Bodary PF, Shen Y, Ohman M, Bahrou KL, Vargas FB, Cudney SS, et al. Leptin regulates neointima formation after arterial injury through mechanisms independent of blood pressure and the leptin receptor/STAT3 signaling pathways involved in energy balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):70-6.
61. Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT. Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):e119-22.
62. Jimenez-Gonzalez S, Marin-Royo G, Jurado-Lopez R, Bartolome MV, Romero-Miranda A, Luaces M, et al. The Crosstalk between Cardiac Lipotoxicity and Mitochondrial Oxidative Stress in the Cardiac Alterations in Diet-Induced Obesity in Rats. *Cells*. 2020;9(2).
63. Poirier P. Exploring the spectrum of diseases influenced by excess adiposity. *Transl Res*. 2014;164(4):278-83.
64. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):367-77.
65. Rada CR, Rodriguez AC, Roldán CC, Marcos MLT, de Ávila MR, López PJT. Análisis de la relación entre Diabetes Mellitus tipo 2 y la obesidad con los factores de riesgo cardiovascular. *Journal of Negative and No Positive Results: JONNPR*. 2021;6(2):411-33.
66. Alpert MA, Lavie CJ, Agrawal H, Aggarwal KB, Kumar SA. Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Transl Res*. 2014;164(4):345-56.
67. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the

Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006;113(6):898-918.

68. Alpert MA, Karthikeyan K, Abdullah O, Ghadban R. Obesity and Cardiac Remodeling in Adults: Mechanisms and Clinical Implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 2018;61(2):114-23.

69. Li L, Zhao Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol*. 2018;68-69:490-506.

70. Royer CA, Ropp T, Scarlata SF. Solution studies of the interactions between the histone core proteins and DNA using fluorescence spectroscopy. *Biophys Chem*. 1992;43(2):197-211.

71. de la Maza MP, Estevez A, Bunout D, Klenner C, Oyonarte M, Hirsch S. Ventricular mass in hypertensive and normotensive obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1994;18(4):193-7.

72. Morgan HE, Baker KM. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation*. 1991;83(1):13-25.

73. Le Jemtel TH, Samson R, Jaiswal A, Lewine EB, Oparil S. Regression of Left Ventricular Mass After Bariatric Surgery. *Curr Hypertens Rep*. 2017;19(9):68.

74. Woodiwiss AJ, Libhaber CD, Majane OH, Libhaber E, Maseko M, Norton GR. Obesity promotes left ventricular concentric rather than eccentric geometric remodeling and hypertrophy independent of blood pressure. *Am J Hypertens*. 2008;21(10):1144-51.

75. Di Tullio MR, Zwas DR, Sacco RL, Sciacca RR, Homma S. Left ventricular mass and geometry and the risk of ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34(10):2380-4.

76. Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, et al. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases. *Eur Heart J*. 2015;36(13):795-805a.

77. Nauta JF, Hummel YM, Tromp J, Ouwerkerk W, van der Meer P, Jin X, et al. Concentric vs. eccentric remodelling in heart failure with reduced ejection fraction: clinical characteristics, pathophysiology and response to treatment. *Eur J Heart Fail*. 2020;22(7):1147-55.

78. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2001;141(3):334-41.
79. Galderisi M, Cosyns B, Edvardsen T, Cardim N, Delgado V, Di Salvo G, et al. Standardization of adult transthoracic echocardiography reporting in agreement with recent chamber quantification, diastolic function, and heart valve disease recommendations: an expert consensus document of the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2017;18(12):1301-10.
80. Echocardiographic Normal Ranges Meta-Analysis of the Left Heart C. Ethnic-Specific Normative Reference Values for Echocardiographic LA and LV Size, LV Mass, and Systolic Function: The EchoNoRMAL Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8(6):656-65.
81. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Bohm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42(36):3599-726.
82. Lavine SJ, Al Balbissi K. Adverse Cardiac Events and the Impaired Relaxation Left Ventricular Filling Pattern. *J Am Soc Echocardiogr*. 2016;29(7):699-708.
83. Appleton CP, Firstenberg MS, Garcia MJ, Thomas JD. The echo-Doppler evaluation of left ventricular diastolic function. A current perspective. *Cardiol Clin*. 2000;18(3):513-46, ix.
84. Nagueh SF. Left Ventricular Diastolic Function: Understanding Pathophysiology, Diagnosis, and Prognosis With Echocardiography. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020;13(1 Pt 2):228-44.
85. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, 3rd, Dokainish H, Edvardsen T, et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2016;29(4):277-314.
86. Tan YH, Lim JP, Lim WS, Gao F, Teo LLY, Ewe SH, et al. Obesity in Older Adults and Associations with Cardiovascular Structure and Function. *Obes Facts*. 2022;15(3):336-43.
87. Russo C, Jin Z, Homma S, Rundek T, Elkind MS, Sacco RL, et al. Effect of obesity and overweight on left ventricular diastolic function: a community-based study in an elderly cohort. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(12):1368-74.

88. Luaces M, Cachofeiro V, Garcia-Munoz-Najar A, Medina M, Gonzalez N, Cancer E, et al. Anatomical and functional alterations of the heart in morbid obesity. Changes after bariatric surgery. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(1):14-21.
89. Ippisch HM, Inge TH, Daniels SR, Wang B, Khoury PR, Witt SA, et al. Reversibility of cardiac abnormalities in morbidly obese adolescents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(14):1342-8.
90. Labazi H, Trask AJ. Coronary microvascular disease as an early culprit in the pathophysiology of diabetes and metabolic syndrome. *Pharmacol Res*. 2017;123:114-21.
91. Leopold JA. Cellular and molecular mechanisms of arterial stiffness associated with obesity. *Hypertension*. 2013;62(6):1003-4.
92. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*. 2007;45 Suppl A:A25-32.
93. McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, et al. New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol*. 2005;90(4):469-75.
94. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):581-7.
95. Kruger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
96. Viridis A, Masi S, Colucci R, Chiriaco M, Uliana M, Puxeddu I, et al. Microvascular Endothelial Dysfunction in Patients with Obesity. *Curr Hypertens Rep*. 2019;21(4):32.
97. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753-67.
98. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol*. 2015;7(11):719-41.
99. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci*. 2015;30(9):1213-25.

100. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(1):5-12.
101. Martinez-Martinez E, Souza-Neto FV, Jimenez-Gonzalez S, Cachofeiro V. Oxidative Stress and Vascular Damage in the Context of Obesity: The Hidden Guest. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(3).
102. Cai Z, Gong Z, Li Z, Li L, Kong W. Vascular Extracellular Matrix Remodeling and Hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2021;34(10):765-83.
103. Tyagi SC. Physiology and homeostasis of extracellular matrix: cardiovascular adaptation and remodeling. *Pathophysiology*. 2000;7(3):177-82.
104. Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, et al. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:23-47.
105. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, et al. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996;28(3):505-6.
106. van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet*. 2012;3:290.
107. Briones AM, Aras-Lopez R, Alonso MJ, Salaices M. Small artery remodeling in obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12(3):427-37.
108. Burla AK, Lobato NS, Fortes ZB, Oigman W, Neves MF. Cardiac fibrosis and vascular remodeling are attenuated by metformin in obese rats. *Int J Cardiol*. 2013;165(3):483-7.
109. Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, et al. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(9):1969-85.
110. Grymyr LMD, Nadirpour S, Gerds E, Nedrebo BG, Hjertaas JJ, Matre K, et al. One-year impact of bariatric surgery on left ventricular mechanics: results from the prospective FatWest study. *Eur Heart J Open*. 2021;1(2):oeab024.

111. Lavie CJ, Alpert MA, Arena R, Mehra MR, Milani RV, Ventura HO. Impact of obesity and the obesity paradox on prevalence and prognosis in heart failure. *JACC Heart Fail.* 2013;1(2):93-102.
112. Wong C, Marwick TH. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4(8):436-43.
113. Itoh H, Kaneko H, Kiriya H, Kamon T, Fujiu K, Morita K, et al. Metabolically Healthy Obesity and the Risk of Cardiovascular Disease in the General Population - Analysis of a Nationwide Epidemiological Database. *Circ J.* 2021;85(6):914-20.
114. Johansen MO, Nielsen SF, Afzal S, Vedel-Krogh S, Davey Smith G, Nordestgaard BG. Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol May Mediate a Substantial Component of the Effect of Obesity on Myocardial Infarction Risk: The Copenhagen General Population Study. *Clin Chem.* 2021;67(1):276-87.
115. Lind L, Riserus U, Arnlov J. Impact of the Definition of Metabolically Healthy Obesity on the Association with Incident Cardiovascular Disease. *Metab Syndr Relat Disord.* 2020;18(6):302-7.
116. Katsoulis M, Stavola BD, Diaz-Ordaz K, Gomes M, Lai A, Lagiou P, et al. Weight Change and the Onset of Cardiovascular Diseases: Emulating Trials Using Electronic Health Records. *Epidemiology.* 2021;32(5):744-55.
117. Zhu Y, Zheng R, Hu C, Qin G, Wang B, Wang T, et al. Association of early adulthood weight and subsequent weight change with cardiovascular diseases: Findings from REACTION study. *Int J Cardiol.* 2021;332:209-15.
118. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, 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):5341-9.
119. Thygesen K. 'Ten Commandments' for the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction 2018. *Eur Heart J.* 2019;40(3):226.
120. Tamis-Holland JE, Jneid H, Reynolds HR, Agewall S, Brilakis ES, Brown TM, et al. Contemporary Diagnosis and Management of Patients With Myocardial Infarction in the Absence of Obstructive Coronary Artery Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2019;139(18):e891-e908.

121. Agewall S, Beltrame JF, Reynolds HR, Niessner A, Rosano G, Caforio AL, et al. ESC working group position paper on myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries. *Eur Heart J*. 2017;38(3):143-53.
122. Liu C, Ferrari VA, Han Y. Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging and Heart Failure. *Curr Cardiol Rep*. 2021;23(4):35.
123. Al-Sabeq B, Nabi F, Shah DJ. Assessment of myocardial viability by cardiac MRI. *Curr Opin Cardiol*. 2019;34(5):502-9.
124. Simion P, Artene B, Achitei I, Matei IT, Petris AO, Tesloianu ND. Myocardial Infarction with Non-Obstructive Coronary Artery Disease: The Labyrinth of Investigations. Case Report and Review of the Literature. *Life (Basel)*. 2021;11(11).
125. Warren J, Mehran R, Yu J, Xu K, Bertrand ME, Cox DA, et al. Incidence and impact of totally occluded culprit coronary arteries in patients presenting with non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2015;115(4):428-33.
126. Mahrholdt H, Wagner A, Judd RM, Sechtem U, Kim RJ. Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2005;26(15):1461-74.
127. OnlineMEdEd. Acute Coronary Syndrome. In: OnlineMEdEd, editor.
128. Ojha N, Dhmoon AS. Myocardial Infarction. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2023.
129. Mechanic OJ, Gavin M, Grossman SA. Acute Myocardial Infarction. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2023.
130. Aengevaeren VL, Baggish AL, Chung EH, George K, Kleiven O, Mingels AMA, et al. Exercise-Induced Cardiac Troponin Elevations: From Underlying Mechanisms to Clinical Relevance. *Circulation*. 2021;144(24):1955-72.
131. Starnberg K, Jeppsson A, Lindahl B, Hammarsten O. Revision of the troponin T release mechanism from damaged human myocardium. *Clin Chem*. 2014;60(8):1098-104.
132. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):e618-e51.

133. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2017;376(21):2053-64.
134. Baron T, Hambraeus K, Sundstrom J, Erlinge D, Jernberg T, Lindahl B, et al. Type 2 myocardial infarction in clinical practice. *Heart*. 2015;101(2):101-6.
135. Wereski R, Kimenai DM, Bularga A, Taggart C, Lowe DJ, Mills NL, et al. Risk factors for type 1 and type 2 myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2022;43(2):127-35.
136. Sagris M, Antonopoulos AS, Theofilis P, Oikonomou E, Siasos G, Tsalamandris S, et al. Risk factors profile of young and older patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2022;118(10):2281-92.
137. Virtanen M, Vahtera J, Singh-Manoux A, Elovainio M, Ferrie JE, Kivimaki M. Unfavorable and favorable changes in modifiable risk factors and incidence of coronary heart disease: The Whitehall II cohort study. *Int J Cardiol*. 2018;269:7-12.
138. Nauta ST, van Domburg RT, Nuis RJ, Akkerhuis M, Deckers JW. Decline in 20-year mortality after myocardial infarction in patients with chronic kidney disease: evolution from the prethrombolysis to the percutaneous coronary intervention era. *Kidney Int*. 2013;84(2):353-8.
139. Deckers JW, van Domburg RT, Akkerhuis M, Nauta ST. Relation of admission glucose levels, short- and long-term (20-year) mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2013;112(9):1306-10.
140. Nauta ST, Deckers JW, Akkerhuis KM, van Domburg RT. Short- and long-term mortality after myocardial infarction in patients with and without diabetes: changes from 1985 to 2008. *Diabetes Care*. 2012;35(10):2043-7.
141. Sellers AM, Alam F, Bennetts JS, Lehman SJ, Sinhal AR. Obesity-induced vena cava compression syndrome: a case report of a rare precipitant of a type 2 myocardial infarction in a patient with critical aortic stenosis. *Eur Heart J Case Rep*. 2023;7(1):ytac465.
142. Velazquez G, Gomez TMA, Asemota I, Akuna E, Ojemolon PE, Eseaton P. Obesity Impacts Mortality and Rate of Revascularizations Among Patients With Acute Myocardial Infarction: An Analysis of the National Inpatient Sample. *Cureus*. 2020;12(12):e11910.

143. Jiménez FJL, Bergoderi MC. Obesidad y corazón. *Revista Española de cardiología*. 2011;64(2):140-9.
144. Chew NWS, Kong G, Venisha S, Chin YH, Ng CH, Muthiah M, et al. Long-Term Prognosis of Acute Myocardial Infarction Associated With Metabolic Health and Obesity Status. *Endocr Pract*. 2022;28(8):802-10.
145. Chi JH, Lee BJ. Association of myocardial infarction and angina pectoris with obesity and biochemical indices in the South Korean population. *Sci Rep*. 2022;12(1):13769.
146. Alqahtani SA, Omeish AM, Ghulam EM, Alsalim WM, Momenkhan HJ, Vriz O, et al. Correlation Between Different Parameters of Acute Myocardial Infarction and Obesity. *Cureus*. 2022;14(8):e28572.
147. Hadadi M, Mohseni-Badalabadi R, Hosseinsabet A. Effects of obesity on left atrial phasic functions in patients with chronic ischemic heart disease and preserved left ventricular ejection fraction without recent myocardial infarction: a two-dimensional speckle-tracking echocardiography study. *J Ultrasound*. 2022;25(3):521-7.
148. Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2017;389(10065):197-210.
149. Jayaraj JC, Davatyan K, Subramanian S, Priya J. Epidemiology of myocardial infarction. *Myocardial Infarction*. 2019;10.
150. Sendra JM, Sarria-Santamera A, Inigo J, Regidor E. [Factors associated with acute myocardial infarction in-hospital mortality. Results of an observational study]. *Med Clin (Barc)*. 2005;125(17):641-6.
151. Corazón FE. ESFEC 2021. Encuesta de Salud de la Fundación Española del Corazón 2021 [Available from: file:///Users/netovasconcelos/Downloads/Encuesta%20de%20Salud%20de%20la%20Fundacin%20Espaola%20del%20Corazn%20ESFEC%202021%20(1).pdf].
152. Priori SG, Blomstrom-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J*. 2015;36(41):2793-867.

153. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J*. 2014;35(42):2950-9.
154. Bernal JL, Barrabes JA, Iniguez A, Fernandez-Ortiz A, Fernandez-Perez C, Bardaji A, et al. Clinical and Administrative Data on the Research of Acute Coronary Syndrome in Spain. Minimum Basic Data Set Validity. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2019;72(1):56-62.
155. Degano IR, Elosua R, Marrugat J. Epidemiology of acute coronary syndromes in Spain: estimation of the number of cases and trends from 2005 to 2049. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2013;66(6):472-81.
156. Kim Y, Zharkinbekov Z, Sarsenova M, Yeltay G, Saparov A. Recent Advances in Gene Therapy for Cardiac Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17).
157. Raziyeva K, Smagulova A, Kim Y, Smagul S, Nurkesh A, Saparov A. Preconditioned and Genetically Modified Stem Cells for Myocardial Infarction Treatment. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19).
158. Hashimoto H, Olson EN, Bassel-Duby R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(10):585-600.
159. Hara H, Takeda N, Komuro I. Pathophysiology and therapeutic potential of cardiac fibrosis. *Inflamm Regen*. 2017;37:13.
160. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;70:74-82.
161. van den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(1):30-7.
162. Ripplinger CM, Lou Q, Li W, Hadley J, Efimov IR. Panoramic imaging reveals basic mechanisms of induction and termination of ventricular tachycardia in rabbit heart with chronic infarction: implications for low-voltage cardioversion. *Heart Rhythm*. 2009;6(1):87-97.
163. Francis Stuart SD, De Jesus NM, Lindsey ML, Ripplinger CM. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;91:114-22.

164. Kohl P, Gourdie RG. Fibroblast-myocyte electrotonic coupling: does it occur in native cardiac tissue? *J Mol Cell Cardiol.* 2014;70(100):37-46.
165. Bacmeister L, Schwarzl M, Warnke S, Stoffers B, Blankenberg S, Westermann D, et al. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2019;114(3):19.
166. Shah AK, Bhullar SK, Elimban V, Dhalla NS. Oxidative Stress as A Mechanism for Functional Alterations in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(6).
167. Oldfield CJ, Duhamel TA, Dhalla NS. Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020;98(2):74-84.
168. Curley D, Lavin Plaza B, Shah AM, Botnar RM. Molecular imaging of cardiac remodelling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2018;113(2):10.
169. Hanna A, Frangogiannis NG. The Role of the TGF-beta Superfamily in Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:140.
170. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4-27.
171. Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;50(2):97-116.
172. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562-73.
173. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491-4.
174. Nagase H. Metalloproteases. *Curr Protoc Protein Sci.* 2001;Chapter 21:21 4 1- 4 13.
175. Azevedo A, Prado AF, Antonio RC, Issa JP, Gerlach RF. Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014;115(4):301-14.
176. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):265sr6.

177. Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggar A, Duncan SR. Fibrosis: ultimate and proximate causes. *J Clin Invest*. 2014;124(11):4673-7.
178. Distler JHW, Gyorfi AH, Ramanujam M, Whitfield ML, Konigshoff M, Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(12):705-30.
179. Aydin MM, Akcali KC. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol*. 2018;29(1):14-21.
180. Diez J, Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R. Clinical aspects of hypertensive myocardial fibrosis. *Curr Opin Cardiol*. 2001;16(6):328-35.
181. Kruszewska J, Cudnoch-Jedrzejewska A, Czarzasta K. Remodeling and Fibrosis of the Cardiac Muscle in the Course of Obesity-Pathogenesis and Involvement of the Extracellular Matrix. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8).
182. Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*. 2018;61(1):21-8.
183. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ*. 2018;360:j5492.
184. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can J Cardiol*. 2016;32(5):659-68.
185. Deb A, Ubil E. Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;70:47-55.
186. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*. 2010;225(3):631-7.
187. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens*. 2004;22(1):47-50.
188. Hinderer S, Schenke-Layland K. Cardiac fibrosis - A short review of causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;146:77-82.
189. Cavalera M, Wang J, Frangogiannis NG. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Transl Res*. 2014;164(4):323-35.

190. Zhang MJ, Zhou Y, Chen L, Wang YQ, Wang X, Pi Y, et al. An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation. *Histochem Cell Biol.* 2016;145(2):119-30.
191. Reddy YNV, Melenovsky V, Redfield MM, Nishimura RA, Borlaug BA. High-Output Heart Failure: A 15-Year Experience. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(5):473-82.
192. Gutierrez-Tenorio J, Marin-Royo G, Martinez-Martinez E, Martin R, Miana M, Lopez-Andres N, et al. The role of oxidative stress in the crosstalk between leptin and mineralocorticoid receptor in the cardiac fibrosis associated with obesity. *Sci Rep.* 2017;7(1):16802.
193. Zaman AK, Fujii S, Goto D, Furumoto T, Mishima T, Nakai Y, et al. Salutary effects of attenuation of angiotensin II on coronary perivascular fibrosis associated with insulin resistance and obesity. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(2):525-35.
194. Ni T, Huang X, Pan S, Lu Z. Dihydrolycorine Attenuates Cardiac Fibrosis and Dysfunction by Downregulating Runx1 following Myocardial Infarction. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:8528239.
195. Scalise RFM, De Sarro R, Caracciolo A, Lauro R, Squadrito F, Carerj S, et al. Fibrosis after Myocardial Infarction: An Overview on Cellular Processes, Molecular Pathways, Clinical Evaluation and Prognostic Value. *Med Sci (Basel).* 2021;9(1).
196. Marin-Royo G, Ortega-Hernandez A, Martinez-Martinez E, Jurado-Lopez R, Luaces M, Islas F, et al. The Impact of Cardiac Lipotoxicity on Cardiac Function and Mirnas Signature in Obese and Non-Obese Rats with Myocardial Infarction. *Sci Rep.* 2019;9(1):444.
197. Liu L, Jin X, Hu CF, Zhang YP, Zhou Z, Li R, et al. Amphiregulin enhances cardiac fibrosis and aggravates cardiac dysfunction in mice with experimental myocardial infarction partly through activating EGFR-dependent pathway. *Basic Res Cardiol.* 2018;113(2):12.
198. Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):563-81.
199. Li Y, Liu X, Yang F, Wang J, Xu Y, Fang T, et al. Prognostic value of myocardial extracellular volume fraction evaluation based on cardiac magnetic resonance T1 mapping with T1 long and short in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Radiol.* 2021;31(7):4557-67.

200. Raiker N, Vullaganti S, Collins JD, Allen BD, Choudhury L. Myocardial tissue characterization by gadolinium-enhanced cardiac magnetic resonance imaging for risk stratification of adverse events in hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2020;36(6):1147-56.
201. Karukonda SR, Flynn TC, Boh EE, McBurney EI, Russo GG, Millikan LE. The effects of drugs on wound healing: part 1. *Int J Dermatol*. 2000;39(4):250-7.
202. Kakutani N, Takada S, Nambu H, Matsumoto J, Furihata T, Yokota T, et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibitor prevents skeletal muscle fibrosis in myocardial infarction mice. *Skelet Muscle*. 2020;10(1):11.
203. da Silva-Bertani DCT, Vileigas DF, Mota GAF, de Souza SLB, Sant'Ana PG, Freire PP, et al. Increased angiotensin II from adipose tissue modulates myocardial collagen I and III in obese rats. *Life Sci*. 2020;252:117650.
204. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):184-95.
205. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2000;46(2):264-8.
206. Daud E, Ertracht O, Bandel N, Moady G, Shehadeh M, Reuveni T, et al. The impact of empagliflozin on cardiac physiology and fibrosis early after myocardial infarction in non-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20(1):132.
207. D'Souza K, Nzirorera C, Kienesberger PC. Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861(10):1513-24.
208. Sletten AC, Peterson LR, Schaffer JE. Manifestations and mechanisms of myocardial lipotoxicity in obesity. *J Intern Med*. 2018;284(5):478-91.
209. Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab*. 2012;15(6):805-12.
210. da Silva AA, do Carmo JM, Li X, Wang Z, Mouton AJ, Hall JE. Role of Hyperinsulinemia and Insulin Resistance in Hypertension: Metabolic Syndrome Revisited. *Can J Cardiol*. 2020;36(5):671-82.

211. Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(10):394-403.
212. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF-alpha and obesity. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11:145-56.
213. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963;1(7285):785-9.
214. Alrob OA, Sankaralingam S, Ma C, Wagg CS, Fillmore N, Jaswal JS, et al. Obesity-induced lysine acetylation increases cardiac fatty acid oxidation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res.* 2014;103(4):485-97.
215. Lopaschuk GD, Barr R, Thomas PD, Dyck JR. Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. *Circ Res.* 2003;93(3):e33-7.
216. Aasum E, Hafstad AD, Severson DL, Larsen TS. Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice. *Diabetes.* 2003;52(2):434-41.
217. 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 U S A.* 2000;97(4):1784-9.
218. Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, et al. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation.* 2004;109(18):2191-6.
219. Mehlem A, Palombo I, Wang X, Hagberg CE, Eriksson U, Falkevall A. PGC-1alpha Coordinates Mitochondrial Respiratory Capacity and Muscular Fatty Acid Uptake via Regulation of VEGF-B. *Diabetes.* 2016;65(4):861-73.
220. Drosatos K, Schulze PC. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Curr Heart Fail Rep.* 2013;10(2):109-21.
221. Vincent HK, Powers SK, Dirks AJ, Scarpace PJ. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(3):378-88.

222. Shimabukuro M, Okawa C, Yamada H, Yanagi S, Uematsu E, Sugawara N, et al. The pathophysiological role of oxidized cholesterols in epicardial fat accumulation and cardiac dysfunction: a study in swine fed a high caloric diet with an inhibitor of intestinal cholesterol absorption, ezetimibe. *J Nutr Biochem*. 2016;35:66-73.
223. McGavock JM, Lingvay I, Zib I, Tillery T, Salas N, Unger R, et al. Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation*. 2007;116(10):1170-5.
224. Szczepaniak LS, Dobbins RL, Metzger GJ, Sartoni-D'Ambrosia G, Arbique D, Vongpatanasin W, et al. Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med*. 2003;49(3):417-23.
225. Ferrara D, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F. Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases. *J Cell Physiol*. 2019;234(12):21630-41.
226. Wende AR, Symons JD, Abel ED. Mechanisms of lipotoxicity in the cardiovascular system. *Curr Hypertens Rep*. 2012;14(6):517-31.
227. Lin Y, Chiba S, Suzuki A, Yamaguchi S, Nakanishi T, Matsumoto H, et al. Vascular smooth muscle cells isolated from adipose triglyceride lipase-deficient mice exhibit distinct phenotype and phenotypic plasticity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(3):534-40.
228. Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Fujii M, Maeda Y, et al. Reduced expression of adipose triglyceride lipase enhances tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells via protein kinase C-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32045-53.
229. Drevinge C, Karlsson LO, Stahlman M, Larsson T, Perman Sundelin J, Grip L, et al. Cholesteryl esters accumulate in the heart in a porcine model of ischemia and reperfusion. *PLoS One*. 2013;8(4):e61942.
230. Perman JC, Bostrom P, Lindbom M, Lidberg U, StAhlman 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(7):2625-40.
231. Park TS, Yamashita H, Blaner WS, Goldberg IJ. Lipids in the heart: a source of fuel and a source of toxins. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18(3):277-82.

232. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, et al. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem*. 2006;281(44):33789-801.
233. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14890-5.
234. Oakes SA. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *Am J Pathol*. 2020;190(5):934-46.
235. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:173-94.
236. So JS. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells*. 2018;41(8):705-16.
237. Martins AS, Alves I, Helguero L, Domingues MR, Neves BM. The Unfolded Protein Response in Homeostasis and Modulation of Mammalian Immune Cells. *Int Rev Immunol*. 2016;35(6):457-76.
238. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1133-49.
239. Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(6):411-21.
240. Read A, Schroder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*. 2021;10(5).
241. Frakes AE, Dillin A. The UPR(ER): Sensor and Coordinator of Organismal Homeostasis. *Mol Cell*. 2017;66(6):761-71.
242. Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(2):150-6.
243. Loi M, Molinari M. Mechanistic insights in recov-ER-phagy: micro-ER-phagy to recover from stress. *Autophagy*. 2020;16(2):385-6.
244. Sun M, Kotler JLM, Liu S, Street TO. The endoplasmic reticulum (ER) chaperones BiP and Grp94 selectively associate when BiP is in the ADP conformation. *J Biol Chem*. 2019;294(16):6387-96.

245. Brown MK, Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front Physiol.* 2012;3:263.
246. Luo J, Xie M, Peng C, Ma Y, Wang K, Lin G, et al. Protein disulfide isomerase A6 promotes the repair of injured nerve through interactions with spastin. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:950586.
247. Eletto D, Eletto D, Dersh D, Gidalevitz T, Argon Y. Protein disulfide isomerase A6 controls the decay of IRE1alpha signaling via disulfide-dependent association. *Mol Cell.* 2014;53(4):562-76.
248. Chhabra NF, Amend AL, Bastidas-Ponce A, Sabrautzki S, Tarquis-Medina M, Sachs S, et al. A point mutation in the Pdia6 gene results in loss of pancreatic beta-cell identity causing overt diabetes. *Mol Metab.* 2021;54:101334.
249. Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem.* 2012;151(3):217-9.
250. Ren J, Bi Y, Sowers JR, Hetz C, Zhang Y. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(7):499-521.
251. Liu Z, Zhang Y, Tang Z, Xu J, Ma M, Pan S, et al. Matrine attenuates cardiac fibrosis by affecting ATF6 signaling pathway in diabetic cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol.* 2017;804:21-30.
252. Maamoun H, Abdelsalam SS, Zeidan A, Korashy HM, Agouni A. Endoplasmic Reticulum Stress: A Critical Molecular Driver of Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disturbances Associated with Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7).
253. Bal NB, Han S, Kiremitci S, Sadi G, Uludag O, Demirel-Yilmaz E. Hypertension-induced cardiac impairment is reversed by the inhibition of endoplasmic reticulum stress. *J Pharm Pharmacol.* 2019;71(12):1809-21.
254. Kassan M, Galan M, Partyka M, Saifudeen Z, Henrion D, Trebak M, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(7):1652-61.
255. Yao Y, Lu Q, Hu Z, Yu Y, Chen Q, Wang QK. A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure. *Nat Commun.* 2017;8(1):133.

256. Galan M, Kassan M, Kadowitz PJ, Trebak M, Belmadani S, Matrougui K. Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(6):1063-75.
257. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation*. 2004;110(6):705-12.
258. Kubra KT, Akhter MS, Uddin MA, Barabutis N. Unfolded protein response in cardiovascular disease. *Cell Signal*. 2020;73:109699.
259. Read DE, Gupta A, Ladilov Y, Samali A, Gupta S. miRNA signature of unfolded protein response in H9c2 rat cardiomyoblasts. *Cell Biosci*. 2014;4(1):56.
260. Kim JA, Montagnani M, Chandrasekran S, Quon MJ. Role of lipotoxicity in endothelial dysfunction. *Heart Fail Clin*. 2012;8(4):589-607.
261. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-17.
262. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 2006;313(5790):1137-40.
263. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1201-15.
264. Sommerweiss D, Gorski T, Richter S, Garten A, Kiess W. Oleate rescues INS-1E beta-cells from palmitate-induced apoptosis by preventing activation of the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(4):770-6.
265. Zhang Y, Yang S, Fu J, Liu A, Liu D, Cao S. Inhibition of endoplasmic reticulum stress prevents high-fat diet mediated atrial fibrosis and fibrillation. *J Cell Mol Med*. 2020;24(23):13660-8.
266. Ceylan-Isik AF, Sreejayan N, Ren J. Endoplasmic reticulum chaperon tauroursodeoxycholic acid alleviates obesity-induced myocardial contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(1):107-16.

267. Li SJ, Liu CH, Chu HP, Mersmann HJ, Ding ST, Chu CH, et al. The high-fat diet induces myocardial fibrosis in the metabolically healthy obese minipigs-The role of ER stress and oxidative stress. *Clin Nutr*. 2017;36(3):760-7.
268. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med*. 2009;15(12):1383-91.
269. Tufanli O, Telkoparan Akillilar P, Acosta-Alvear D, Kocaturk B, Onat UI, Hamid SM, et al. Targeting IRE1 with small molecules counteracts progression of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(8):E1395-E404.
270. Yang MY, Wang YB, Han B, Yang B, Qiang YW, Zhang Y, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase 2 slows down the progression of atherosclerosis via attenuation of ER stress and apoptosis in smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(1):48-58.
271. Kedi X, Ming Y, Yongping W, Yi Y, Xiaoxiang Z. Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):123-30.
272. Cheng WP, Hung HF, Wang BW, Shyu KG. The molecular regulation of GADD153 in apoptosis of cultured vascular smooth muscle cells by cyclic mechanical stretch. *Cardiovasc Res*. 2008;77(3):551-9.
273. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol*. 2004;24(24):10703-17.
274. Cheang WS, Tian XY, Wong WT, Lau CW, Lee SS, Chen ZY, et al. Metformin protects endothelial function in diet-induced obese mice by inhibition of endoplasmic reticulum stress through 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor delta pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):830-6.
275. Lu Y, Cheng J, Chen L, Li C, Chen G, Gui L, et al. Endoplasmic reticulum stress involved in high-fat diet and palmitic acid-induced vascular damages and fenofibrate intervention. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(1):1-7.

276. Tampakakis E, Tabit CE, Holbrook M, Linder EA, Berk BD, Frame AA, et al. Intravenous Lipid Infusion Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Endothelial Cells and Blood Mononuclear Cells of Healthy Adults. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(1).
277. Wang MX, Liu X, Li JM, Liu L, Lu W, Chen GC. Inhibition of CACNA1H can alleviate endoplasmic reticulum stress and reduce myocardial cell apoptosis caused by myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(24):12887-95.
278. Liu Z, Zhang Y, Pan S, Qiu C, Jia H, Wang Y, et al. Activation of RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress associates with exacerbated postmyocardial infarction ventricular arrhythmias in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2021;320(3):E539-E50.
279. Rong X, Ge D, Yu L, Li L, Chu M, Lv H. Enalapril attenuates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury induced by myocardial infarction via activation of the TAK1/NFAT pathway in mice. *Exp Ther Med.* 2020;19(2):972-80.
280. Zhang C, He S, Li Y, Li F, Liu Z, Liu J, et al. Bisoprolol protects myocardium cells against ischemia/reperfusion injury by attenuating unfolded protein response in rats. *Sci Rep.* 2017;7(1):11859.
281. Wang X, Xu L, Gillette TG, Jiang X, Wang ZV. The unfolded protein response in ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;117:19-25.
282. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(4):1406-11.
283. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 2006;99(3):275-82.
284. Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, Horio E, Miura M, Tsujita K, et al. C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):1124-32.
285. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation.* 2010;122(4):361-9.

286. Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura T, et al. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(6):1280-9.
287. Yang YF, Wang H, Song N, Jiang YH, Zhang J, Meng XW, et al. Dexmedetomidine Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Inflammation and Apoptosis Through Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress Signaling. *J Inflamm Res.* 2021;14:1217-33.
288. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med.* 2011;32(4-6):234-46.
289. Han F, Li S, Yang Y, Bai Z. Interleukin-6 promotes ferroptosis in bronchial epithelial cells by inducing reactive oxygen species-dependent lipid peroxidation and disrupting iron homeostasis. *Bioengineered.* 2021;12(1):5279-88.
290. Steven S, Frenis K, Oelze M, Kalinovic S, Kuntic M, Bayo Jimenez MT, et al. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7092151.
291. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:9829176.
292. Sarniak A, Lipinska J, Tytman K, Lipinska S. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016;70(0):1150-65.
293. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715-48.
294. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017;11:613-9.
295. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011;194(1):7-15.
296. Wang W, Kang PM. Oxidative Stress and Antioxidant Treatments in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(12).
297. Martinez-Martinez E, Cachafeiro V. Oxidative Stress in Obesity. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(4).

298. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(7):165768.
299. Pinheiro LC, Oliveira-Paula GH. Sources and Effects of Oxidative Stress in Hypertension. *Curr Hypertens Rev.* 2020;16(3):166-80.
300. Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16(1):120.
301. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019;11(9).
302. Nishida M, Schey KL, Takagahara S, Kontani K, Katada T, Urano Y, et al. Activation mechanism of Gi and Go by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9036-42.
303. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(6):615-21.
304. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, Chang DL, Pagano PJ, Singh K, et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res.* 1999;85(2):147-53.
305. Sawyer DB, Colucci WS. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited. *Circ Res.* 2000;86(2):119-20.
306. Song H, Ren J. Protocatechuic acid attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts through inhibiting the NOX4/ROS/p38 signaling pathway. *Phytother Res.* 2019;33(9):2440-7.
307. Jakubiak GK, Osadnik K, Lejawa M, Osadnik T, Golawski M, Lewandowski P, et al. "Obesity and Insulin Resistance" Is the Component of the Metabolic Syndrome Most Strongly Associated with Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel).* 2021;11(1).
308. Jia XJ, Liu LX, Tian YM, Wang R, Lu Q. The correlation between oxidative stress level and intra-abdominal fat in obese males. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(7):e14469.

309. Mohseni R, Arab Sadeghabadi Z, Goodarzi MT, Teimouri M, Nourbakhsh M, Razzaghy Azar M. Evaluation of Mn-superoxide dismutase and catalase gene expression in childhood obesity: its association with insulin resistance. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;31(7):727-32.
310. Metere A, Graves CE, Pietraforte D, Casella G. The Effect of Sleeve Gastrectomy on Oxidative Stress in Obesity. *Biomedicines.* 2020;8(6).
311. Carmona-Maurici J, Amigo N, Cuello E, Bermudez M, Baena-Fustegueras JA, Peinado-Onsurbe J, et al. Bariatric surgery decreases oxidative stress and protein glycosylation in patients with morbid obesity. *Eur J Clin Invest.* 2020;50(11):e13320.
312. Asplund K. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Intern Med.* 2002;251(5):372-92.
313. Mongioi LM, La Vignera S, Cannarella R, Cimino L, Compagnone M, Condorelli RA, et al. The Role of Resveratrol Administration in Human Obesity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9).
314. Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation.* 1997;96(7):2414-20.
315. Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res.* 2000;87(5):392-8.
316. Gu XS, Wang ZB, Ye Z, Lei JP, Li L, Su DF, et al. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure. *Genet Mol Res.* 2014;13(1):323-35.
317. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, et al. Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway. *Am J Pathol.* 2013;182(3):701-13.
318. Xuan W, Wu B, Chen C, Chen B, Zhang W, Xu D, et al. Resveratrol improves myocardial ischemia and ischemic heart failure in mice by antagonizing the detrimental effects of fractalkine\*. *Crit Care Med.* 2012;40(11):3026-33.

319. Chen YR, Yi FF, Li XY, Wang CY, Chen L, Yang XC, et al. Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-term survival in rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2008;22(6):479-85.
320. Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012;50(3):179-87.
321. Sun Y, Rawish E, Nording HM, Langer HF. Inflammation in Metabolic and Cardiovascular Disorders-Role of Oxidative Stress. *Life (Basel).* 2021;11(7).
322. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(6):453-71.
323. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S170-80.
324. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* 2015;6:472-85.
325. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13.
326. Murphy MP, Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:629-56.
327. Dhanasekaran A, Kotamraju S, Kalivendi SV, Matsunaga T, Shang T, Keszler A, et al. Supplementation of endothelial cells with mitochondria-targeted antioxidants inhibit peroxide-induced mitochondrial iron uptake, oxidative damage, and apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37575-87.
328. Ismail H, Shakkour Z, Tabet M, Abdelhady S, Kobaisi A, Abedi R, et al. Traumatic Brain Injury: Oxidative Stress and Novel Anti-Oxidants Such as Mitoquinone and Edaravone. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(10).
329. Chronic Kidney Disease and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: The Role of Mitochondrial Dysfunction. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03960073>.

330. Cortes-Rojo C, Rodriguez-Orozco AR. Importance of oxidative damage on the electron transport chain for the rational use of mitochondria-targeted antioxidants. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(7):625-32.
331. Smith RA, Murphy MP. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1201:96-103.
332. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4588-96.
333. Marin-Royo G, Rodriguez C, Le Pape A, Jurado-Lopez R, Luaces M, Antequera A, et al. The role of mitochondrial oxidative stress in the metabolic alterations in diet-induced obesity in rats. *FASEB J*. 2019;33(11):12060-72.
334. Ribeiro Junior RF, Dabkowski ER, Shekar KC, KA OC, Hecker PA, Murphy MP. MitoQ improves mitochondrial dysfunction in heart failure induced by pressure overload. *Free Radic Biol Med*. 2018;117:18-29.
335. Goh KY, He L, Song J, Jinno M, Rogers AJ, Sethu P, et al. Mitoquinone ameliorates pressure overload-induced cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in mice. *Redox Biol*. 2019;21:101100.
336. Ning R, Li Y, Du Z, Li T, Sun Q, Lin L, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ attenuated PM(2.5)-induced vascular fibrosis via regulating mitophagy. *Redox Biol*. 2021;46:102113.
337. Gioscia-Ryan RA, LaRocca TJ, Sindler AL, Zigler MC, Murphy MP, Seals DR. Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice. *J Physiol*. 2014;592(12):2549-61.
338. Rossman MJ, Santos-Parker JR, Steward CAC, Bispham NZ, Cuevas LM, Rosenberg HL, et al. Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertension*. 2018;71(6):1056-63.
339. Pung YF, Rocic P, Murphy MP, Smith RA, Hafemeister J, Ohanyan V, et al. Resolution of mitochondrial oxidative stress rescues coronary collateral growth in Zucker obese fatty rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(2):325-34.

340. Martinez-Revelles S, Avendano MS, Garcia-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Perez-Giron JV, et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(1):51-65.
341. Dare AJ, Logan A, Prime TA, Rogatti S, Goddard M, Bolton EM, et al. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34(11):1471-80.
342. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2005;19(9):1088-95.
343. Smith RA, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5407-12.
344. Martinez-Martinez E, Fernandez-Irigoyen J, Santamaria E, Nieto ML, Bravo-San Pedro JM, Cachofeiro V. Mitochondrial Oxidative Stress Induces Cardiac Fibrosis in Obese Rats through Modulation of Transthyretin. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15).
345. Ji Y, Leng Y, Lei S, Qiu Z, Ming H, Zhang Y, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing PINK1/Parkin-mediated mitophagy in type 2 diabetic rats. *Cell Stress Chaperones*. 2022;27(4):353-67.
346. Alpert MA, Chan EJ. Left ventricular morphology and diastolic function in severe obesity: current views. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(1):1-3.
347. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):911-9; quiz 20.
348. Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation*. 2003;108(6):754-9.
349. Alpert MA, Lavie CJ, Agrawal H, Kumar A, Kumar SA. Cardiac Effects of Obesity: PATHOPHYSIOLOGIC, CLINICAL, AND PROGNOSTIC CONSEQUENCES-A REVIEW. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2016;36(1):1-11.
350. Voulgari C, Tentolouris N, Dilaveris P, Tousoulis D, Katsilambros N, Stefanadis C. Increased heart failure risk in normal-weight people with

metabolic syndrome compared with metabolically healthy obese individuals. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(13):1343-50.

351. Nakajima T, Fujioka S, Tokunaga K, Hirobe K, Matsuzawa Y, Tarui S. Noninvasive study of left ventricular performance in obese patients: influence of duration of obesity. *Circulation*. 1985;71(3):481-6.

352. Kang KW, Kim OS, Chin JY, Kim WH, Park SH, Choi YJ, et al. Diastolic Dysfunction Induced by a High-Fat Diet Is Associated with Mitochondrial Abnormality and Adenosine Triphosphate Levels in Rats. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015;30(4):557-68.

353. Kondo H, Abe I, Gotoh K, Fukui A, Takanari H, Ishii Y, et al. Interleukin 10 Treatment Ameliorates High-Fat Diet-Induced Inflammatory Atrial Remodeling and Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2018;11(5):e006040.

354. Li K, Wagner L, Moctezuma-Ramirez A, Vela D, Perin E. A Robust Percutaneous Myocardial Infarction Model in Pigs and Its Effect on Left Ventricular Function. *J Cardiovasc Transl Res*. 2021;14(6):1075-84.

355. Gao H, Huang X, Tong Y, Jiang X. Urolithin B improves cardiac function and reduces susceptibility to ventricular arrhythmias in rats after myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*. 2020;871:172936.

356. Halliday BP, Senior R, Pennell DJ. Assessing left ventricular systolic function: from ejection fraction to strain analysis. *Eur Heart J*. 2021;42(7):789-97.

357. Flachskampf FA, Blankstein R, Grayburn PA, Kramer CM, Kwong RYK, Marwick TH, et al. Global Longitudinal Shortening: A Positive Step Towards Reducing Confusion Surrounding Global Longitudinal Strain. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2019;12(8 Pt 1):1566-7.

358. Sasagawa S, Nishimura Y, Okabe S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, et al. Downregulation of GSTK1 Is a Common Mechanism Underlying Hypertrophic Cardiomyopathy. *Front Pharmacol*. 2016;7:162.

359. Bhatti SN, Li JM. Nox2 dependent redox-regulation of Akt and ERK1/2 to promote left ventricular hypertrophy in dietary obesity of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;528(3):506-13.

360. Zhai M, Liu Z, Zhang B, Jing L, Li B, Li K, et al. Melatonin protects against the pathological cardiac hypertrophy induced by transverse aortic

constriction through activating PGC-1beta: In vivo and in vitro studies. *J Pineal Res.* 2017;63(3).

361. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(4):425-35.

362. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.* 2007;93(8):903-7.

363. McLachlan J, Beattie E, Murphy MP, Koh-Tan CH, Olson E, Beattie W, et al. Combined therapeutic benefit of mitochondria-targeted antioxidant, MitoQ10, and angiotensin receptor blocker, losartan, on cardiovascular function. *J Hypertens.* 2014;32(3):555-64.

364. Graham D, Huynh NN, Hamilton CA, Beattie E, Smith RA, Cocheme HM, et al. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2009;54(2):322-8.

365. Ortega-Hernandez A, Martinez-Martinez E, Gomez-Gordo R, Lopez-Andres N, Fernandez-Celis A, Gutierrez-Miranda B, et al. The Interaction between Mitochondrial Oxidative Stress and Gut Microbiota in the Cardiometabolic Consequences in Diet-Induced Obese Rats. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(7).

366. Martinez-Martinez E, Brugnolaro C, Ibarrola J, Ravassa S, Buonafine M, Lopez B, et al. CT-1 (Cardiotrophin-1)-Gal-3 (Galectin-3) Axis in Cardiac Fibrosis and Inflammation. *Hypertension.* 2019;73(3):602-11.

367. Martinez-Martinez E, Buonafine M, Boukhalfa I, Ibarrola J, Fernandez-Celis A, Kolkhof P, et al. Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFkappaB Pathway. *Hypertension.* 2017;70(6):1148-56.

368. Gulati A, Japp AG, Raza S, Halliday BP, Jones DA, Newsome S, et al. Absence of Myocardial Fibrosis Predicts Favorable Long-Term Survival in New-Onset Heart Failure. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2018;11(9):e007722.

369. Ferreira JP, Machu JL, Girerd N, Jaisser F, Thum T, Butler J, et al. Rationale of the FIBROTARGETS study designed to identify novel biomarkers of myocardial fibrosis. *ESC Heart Fail.* 2018;5(1):139-48.

370. Johnston EF, Gillis TE. Transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1) stimulates collagen synthesis in cultured rainbow trout cardiac fibroblasts. *J Exp Biol.* 2017;220(Pt 14):2645-53.
371. McNulty M, Mahmud A, Spiers P, Feely J. Collagen type-I degradation is related to arterial stiffness in hypertensive and normotensive subjects. *J Hum Hypertens.* 2006;20(11):867-73.
372. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J.* 1999;13(13):1774-86.
373. Xue X, Chen Q, Zhao G, Zhao JY, Duan Z, Zheng PS. The Overexpression of TGF-beta and CCN2 in Intrauterine Adhesions Involves the NF-kappaB Signaling Pathway. *PLoS One.* 2015;10(12):e0146159.
374. Mendes FA, Coelho Aguiar JM, Kahn SA, Reis AH, Dubois LG, Romao LF, et al. Connective-Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) Induces Astrogenesis and Fibronectin Expression of Embryonic Neural Cells In Vitro. *PLoS One.* 2015;10(8):e0133689.
375. Kubota S, Takigawa M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2015;128(3):181-96.
376. Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003;278(15):13008-15.
377. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(10):1805-19.
378. Feriani A, Bizzarri M, Tir M, Aldawood N, Alobaid H, Allagui MS, et al. High-fat diet-induced aggravation of cardiovascular impairment in permethrin-treated Wistar rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;222:112461.
379. Zhao K, Xu T, Mao Y, Wu X, Hua D, Sheng Y, et al. Alamandine alleviated heart failure and fibrosis in myocardial infarction mice. *Biol Direct.* 2022;17(1):25.

380. Liang B, Zhang XX, Li R, Zhu YC, Tian XJ, Gu N. Guanxin V alleviates acute myocardial infarction by restraining oxidative stress damage, apoptosis, and fibrosis through the TGF-beta1 signalling pathway. *Phytomedicine*. 2022;100:154077.
381. Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, et al. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(11):2411-22.
382. Vainio LE, Szabo Z, Lin R, Ulvila J, Yrjola R, Alakoski T, et al. Connective Tissue Growth Factor Inhibition Enhances Cardiac Repair and Limits Fibrosis After Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4(1):83-94.
383. Huang DD, Huang HF, Yang Q, Chen XQ. Liraglutide improves myocardial fibrosis after myocardial infarction through inhibition of CTGF by activating cAMP in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(14):4648-56.
384. Chen L, Ji Q, Zhu H, Ren Y, Fan Z, Tian N. miR-30a attenuates cardiac fibrosis in rats with myocardial infarction by inhibiting CTGF. *Exp Ther Med*. 2018;15(5):4318-24.
385. Hagler MA, Hadley TM, Zhang H, Mehra K, Roos CM, Schaff HV, et al. TGF-beta signalling and reactive oxygen species drive fibrosis and matrix remodelling in myxomatous mitral valves. *Cardiovasc Res*. 2013;99(1):175-84.
386. Ding J, Zhang Z, Li S, Wang W, Du T, Fang Q, et al. Mdivi-1 alleviates cardiac fibrosis post myocardial infarction at infarcted border zone, possibly via inhibition of Drp1-Activated mitochondrial fission and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 2022;718:109147.
387. Vilahur G, Casani L, Pena E, Crespo J, Juan-Babot O, Ben-Aicha S, et al. Silybum marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis. *Int J Cardiol*. 2018;270:28-35.
388. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2014;16(1):378-400.
389. Purnomo Y, Piccart Y, Coenen T, Prihadi JS, Lijnen PJ. Oxidative stress and transforming growth factor-beta1-induced cardiac fibrosis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2013;13(2):165-72.

390. Li S, Zhang L, Ni R, Cao T, Zheng D, Xiong S, et al. Disruption of calpain reduces lipotoxicity-induced cardiac injury by preventing endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(11):2023-33.
391. Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(6):1105-10.
392. Bourdier G, Flore P, Sanchez H, Pepin JL, Belaidi E, Arnaud C. High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(2):H279-89.
393. Fribley A, Zhang K, Kaufman RJ. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol*. 2009;559:191-204.
394. Xin Y, Wu W, Qu J, Wang X, Lei S, Yuan L, et al. Inhibition of Mitofusin-2 Promotes Cardiac Fibroblast Activation via the PERK/ATF4 Pathway and Reactive Oxygen Species. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3649808.
395. Safiedeen Z, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Dialogue between endoplasmic reticulum and mitochondria as a key actor of vascular dysfunction associated to metabolic disorders. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;77(Pt A):10-4.
396. Garcia N, Zazueta C, Aguilera-Aguirre L. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:5853238.
397. Martin R, Miana M, Jurado-Lopez R, Martinez-Martinez E, Gomez-Hurtado N, Delgado C, et al. DIOL triterpenes block profibrotic effects of angiotensin II and protect from cardiac hypertrophy. *PLoS One*. 2012;7(7):e41545.
398. Wang W, Huang XR, Canlas E, Oka K, Truong LD, Deng C, et al. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. *Circ Res*. 2006;98(8):1032-9.
399. Cabandugama PK, Gardner MJ, Sowers JR. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Obesity and Hypertension: Roles in the Cardiorenal Metabolic Syndrome. *Med Clin North Am*. 2017;101(1):129-37.
400. Menikdiwela KR, Ramalingam L, Allen L, Scoggin S, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Angiotensin II Increases Endoplasmic Reticulum Stress in Adipose Tissue and Adipocytes. *Sci Rep*. 2019;9(1):8481.

401. Ha TS, Park HY, Seong SB, Ahn HY. Angiotensin II induces endoplasmic reticulum stress in podocyte, which would be further augmented by PI3-kinase inhibition. *Clin Hypertens*. 2015;21:13.
402. Manoury PM, Binet JL, Rousseau J, Lefevre-Borg F, Cavero IG. Synthesis of a series of compounds related to betaxolol, a new beta 1-adrenoceptor antagonist with a pharmacological and pharmacokinetic profile optimized for the treatment of chronic cardiovascular diseases. *J Med Chem*. 1987;30(6):1003-11.
403. Wang Y, Cui J, Zheng G, Zhao M, Hao Z, Lian H, et al. Ochratoxin A induces cytotoxicity through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway in human gastric epithelium cells. *Toxicology*. 2022;479:153309.
404. Wang H, Chen J, Bai G, Han W, Guo R, Cui N. mTOR Modulates the Endoplasmic Reticulum Stress-Induced CD4(+) T Cell Apoptosis Mediated by ROS in Septic Immunosuppression. *Mediators Inflamm*. 2022;2022:6077570.
405. Wang HF, Wang ZQ, Ding Y, Piao MH, Feng CS, Chi GF, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates oxygen-glucose deprivation-induced parthanatos in human SH-SY5Y cells via improvement of intracellular ROS. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(1):29-38.
406. Liu X, Hussain R, Mehmood K, Tang Z, Zhang H, Li Y. Mitochondrial-Endoplasmic Reticulum Communication-Mediated Oxidative Stress and Autophagy. *Biomed Res Int*. 2022;2022:6459585.
407. Stoner MW, McTiernan CF, Scott I, Manning JR. Calreticulin expression in human cardiac myocytes induces ER stress-associated apoptosis. *Physiol Rep*. 2020;8(8):e14400.
408. Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, et al. Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(2):e56387.
409. Owusu BY, Zimmerman KA, Murphy-Ullrich JE. The role of the endoplasmic reticulum protein calreticulin in mediating TGF-beta-stimulated extracellular matrix production in fibrotic disease. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(1):289-99.
410. Zhang ZY, Liu XH, Hu WC, Rong F, Wu XD. The calcineurin-myocyte enhancer factor 2c pathway mediates cardiac hypertrophy induced by endoplasmic reticulum stress in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(5):H1499-509.

411. Li L, Thompson J, Hu Y, Lesnefsky EJ, Willard B, Chen Q. Calpain-mediated protein targets in cardiac mitochondria following ischemia-reperfusion. *Sci Rep.* 2022;12(1):138.
412. Wan F, Letavernier E, Le Saux CJ, Houssaini A, Abid S, Czibik G, et al. Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(11):H1883-93.
413. Mani SK, Balasubramanian S, Zavadzkas JA, Jeffords LB, Rivers WT, Zile MR, et al. Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(5):H1744-51.
414. Kudo-Sakamoto Y, Akazawa H, Ito K, Takano J, Yano M, Yabumoto C, et al. Calpain-dependent cleavage of N-cadherin is involved in the progression of post-myocardial infarction remodeling. *J Biol Chem.* 2014;289(28):19408-19.
415. He Y, Zhou L, Fan Z, Liu S, Fang W. Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by N-acetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):568.
416. Pang J, Peng H, Wang S, Xu X, Xu F, Wang Q, et al. Mitochondrial ALDH2 protects against lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction by suppression of ER stress and autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(6):1627-41.
417. Yang L, Wang J, Yang J, Schamber R, Hu N, Nair S, et al. Antioxidant metallothionein alleviates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial apoptosis and contractile dysfunction. *Free Radic Res.* 2015;49(10):1187-98.
418. Guo R, Ma H, Gao F, Zhong L, Ren J. Metallothionein alleviates oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress and myocardial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(2):228-37.
419. Liu M, Liu H, Dudley SC, Jr. Reactive oxygen species originating from mitochondria regulate the cardiac sodium channel. *Circ Res.* 2010;107(8):967-74.
420. Singh V, Ubaid S. Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation.* 2020;43(5):1589-98.

421. Hsu YJ, Hsu SC, Hsu CP, Chen YH, Chang YL, Sadoshima J, et al. Sirtuin 1 protects the aging heart from contractile dysfunction mediated through the inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in cardiac-specific Sirtuin 1 knockout mouse model. *Int J Cardiol.* 2017;228:543-52.
422. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018;13:757-72.
423. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;80:50-64.
424. Rottenberg H, Hoek JB. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. *Aging Cell.* 2017;16(5):943-55.
425. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94(3):909-50.
426. Willems PH, Rossignol R, Dieteren CE, Murphy MP, Koopman WJ. Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab.* 2015;22(2):207-18.
427. Shutt T, Geoffrion M, Milne R, McBride HM. The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* 2012;13(10):909-15.
428. Sabouny R, Shutt TE. Reciprocal Regulation of Mitochondrial Fission and Fusion. *Trends Biochem Sci.* 2020;45(7):564-77.
429. Tian H, Yu D, Hu Y, Zhang P, Yang Y, Hu Q, et al. Angiotensin II upregulates cyclophilin A by enhancing ROS production in rat cardiomyocytes. *Mol Med Rep.* 2018;18(5):4349-55.
430. Ferreira JCB, Campos JC, Qvit N, Qi X, Bozi LHM, Bechara LRG, et al. A selective inhibitor of mitofusin 1-beta1IPKC association improves heart failure outcome in rats. *Nat Commun.* 2019;10(1):329.
431. Hall AR, Burke N, Dongworth RK, Kalkhoran SB, Dyson A, Vicencio JM, et al. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death Dis.* 2016;7(5):e2238.

432. Lim SY, Hausenloy DJ, Arjun S, Price AN, Davidson SM, Lythgoe MF, et al. Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure. *J Cell Mol Med.* 2011;15(11):2443-51.
433. Schrepfer E, Scorrano L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell.* 2016;61(5):683-94.
434. Dai W, Jiang L. Dysregulated Mitochondrial Dynamics and Metabolism in Obesity, Diabetes, and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:570.
435. Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ. Cyclophilin D deficiency prevents diet-induced obesity in mice. *FEBS Lett.* 2011;585(4):677-82.
436. Oyenuga AO, Couper D, Matsushita K, Boerwinkle E, Folsom AR. Association of monocyte myeloperoxidase with incident cardiovascular disease: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205310.
437. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1595-604.
438. Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;48(1):8-19.