

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

**COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS PARA EL
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD VASCULAR.**

Vasta, Mercedes Paola – LU 1028838

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Prof. Dra. Calabrese, Graciela.

**Laboratorio de Matriz Extracelular. Cátedra de Biología Celular y
Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Universidad de Buenos Aires.**

Co-Tutor Interno:

Dra. Angelomé, Paula Cecilia.

Centro Atómico Constituyentes. Comisión Nacional de Energía Atómica

Marzo 5, 2018



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Quiero **Dedicar** este Proyecto Final de la carrera de Licenciatura en Biotecnología, ante todo a mis padres: *Graciela y Oscar*, son los pilares en mi vida que me brindaron en todo momento su amor y apoyo incondicional para que yo pueda cumplir cada uno de mis sueños, son quienes me escuchan, me aconsejan, me dan su hombro y me acompañan en mis alegrías y tristezas, asegurándose que yo pueda realizar mis metas de vida, no solo para obtener éxitos profesionales, sino que también guiándome en el crecimiento personal y en lo humano desde el mas profundo amor, en este recorrido que vinimos a transitar los tres juntos en esta vida. Les debo todo!

También dedico este trabajo a mis tías: *Haydeé y Patricia*, junto a mi madre, representan mi ejemplo de mujeres fuertes y trabajadoras, que no bajan los brazos y siguen adelante sin importar el desafío.

Y a *mis abuelos*, desearía que estuvieran acá físicamente para verme realizada en esta meta tan importante para mí, pero siempre recordaré su amor y apoyo, por allá en esas épocas que estudiaba medicina. Desde donde estén, sé que han sido mi guía.

Quiero dar las **Gracias** a todas las personas que han contribuido a la realización de este Proyecto Final y sin las cuales no hubiese sido posible, llevarlo a cabo.

En primer lugar, y sobre todo, quiero agradecer a *mi Directora, la Prof. Dra. Graciela Calabrese*. A ella le debo todo en este trabajo, desde el lugar que me dio para poder realizarla, no solo en el espacio físico de su laboratorio y los materiales, sino que también su gran conocimiento y paciencia ilimitada, siempre acompañando en todo, agradezco infinitamente lo que me ha enseñado, que fue muchos mas allá de lo que correspondía para este trabajo, sino que también muchas cosas que atañan a mi formación profesional y crecimiento personal; pocas personas pueden ser tan generosas con su tiempo y esfuerzo, en recibir a alguien de afuera de su laboratorio para que puede desarrollarse en su carrera, y por sobre todo ser una guía de trabajo que impulsa a un equipo a ser compañeros y darse una mano siempre.

Esto me lleva también a agradecer a *Florencia Funez y Aldana Bariandarán*, bioquímicas, ayudantes de la cátedra de BCM y becarias en el laboratorio de la Dra. Calabrese, me ayudaron muchísimo en el laboratorio, les agradezco el apoyo en los congresos de SAIC e IMBS.

Quiero agradecer que me hayan permitido trabajar y usar las instalaciones en *los laboratorios de la Cátedra de Biología Celular y Molecular*, siempre *todos sus integrantes* dispuestos para lo que necesitara, también en la amabilidad de las charlas en el comedor. Es raro encontrar un grupo de trabajo que toda la gente que lo conforma tenga tan buena onda, y la verdad que en el laboratorio de la Cátedra de BCM de FFyB de la UBA, se trabaja en un ambiente en que la amabilidad se refleja en la secretaria de la cátedra, la persona encargada de la limpieza, los ayudantes, los becarios, los profesores/directores de proyectos. Muchísimas gracias por haberme abierto las puertas!

No quiero olvidarme de agradecer a la *Dra. Romina Glisoni* en la Cátedra de Nanobiotecnología de FFyB de la UBA, por su amabilidad de prestarnos el equipo para la síntesis de los PECs y por la ayuda en la caracterización de los mismos.

Agradezco a la *Dra. Nora Slobodianick* por su cariño para con mi familia y siempre darme tanto apoyo en mi carrera, atenta para lo que necesitara. Su amistad es lo más preciado para mí.

Un agradecimiento especial a Dra. Laura Lopez también.

Y por último, quiero agradecer a mis amigos y compañeros de la carrera de licenciatura en UADE: *Agostina Bianchi, Denise Wainstein y Matías Bellesi*, con quienes compartimos gran parte del camino para llegar a la meta de graduarnos, fueron muchas veces mi grupo de trabajos de laboratorio, entregas y presentaciones, tantas horas y esfuerzo! ojalá nuestros caminos sigan en la amistad, mucho mas allá de la facultad.

¡Muchas Gracias!

Mercedes Paola Vasta

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Los resultados de este Proyecto Final de Licenciatura en Biotecnología, fueron presentados en:

1. *DERMATAN SULFATE/CHITOSAN POLYELECTROLYTE COMPLEX FOR TARGETING AGENTS TO THE VESSEL WALL.*

Autores: Vasta Mercedes, Funez Florencia, Dra. Glisoni Romina, Dr. Sosnik Alejandro, Dra. Calabrese Graciela.

Congreso SAIC – NANOMED. Mar del Plata, Bs As, Argentina. Noviembre, 2016.

Publicado en revista *MEDICINA* - Buenos Aires, Volumen 76 Supl. I (2016) - Editorial Estudio SIGMA S.R.L., Argentina.

2. *DERMATAN SULFATE/ CHITOSAN POLYELECTROLYTE COMPLEX AS A NEW STRATEGY FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF THE VESSEL WALL.*

Autores: Vasta Mercedes, Bariandarán Aldana, Funez Florencia, Dra. Glisoni Romina, Dr. Sosnik Alejandro, Dra. Calabrese Graciela.

Congreso IMBS. CABA, Argentina. Noviembre, 2016.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la mayor causa de mortalidad mórbida en el mundo, sin embargo, todavía no hay tratamiento farmacéutico dirigido directamente a tratar la injuria de la pared de los vasos sanguíneos en lugar de sólo controlar los factores de riesgo de la enfermedad. Los complejos de polielectrolitos (PECs) entre el Dermatán Sulfato (DS) (polisacárido polianiónico) y el Quitosano (QT) (polisacárido policationico); resultan una potencial estrategia para el diagnóstico y tratamiento precoz de las enfermedades cardiovasculares. Los PECs DS/QT, obtenidos por complejación directa bajo condiciones controladas mostraron un diámetro hidrodinámico entre 350-600 nm. Estos nuevos nanosistemas no resultaron citotóxicos para la línea celular derivada del endotelio de corazón murino (H5V). La microscopía confocal fluorescente reveló la captación específica de los PECs marcados fluorescentemente (PECs-FITC) por las células endoteliales (CEs) cuando se incubaron solas o en co-cultivos con macrófagos murinos.

El objetivo del presente trabajo fue analizar las características moleculares de la unión los PECs DS/QT a las células endoteliales murinas.

Los PECs-FITC fueron formulados por complejación directa, empleando QT marcado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). El tamaño (D_h), la distribución de tamaños (PDI) y el potencial zeta (potencial Z) de los nanosistemas se determinó por Dynamic Light Scattering (DLS). La citotoxicidad del DS y del HA se evaluó mediante ensayos colorimétrico basados en la reducción metabólica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Células H5V fueron incubadas en presencia de PECs-FITC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, según su concentración en DS) durante 15 minutos en ausencia o en presencia de DS (37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o HA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal o de fluorescencia.

Por otra parte se estudió la interacción de los PECs con el endotelio activado por acción del lipopolisacárido (LPS) (250 mM) durante 1 hora.

Los PECs-FITC producidos por el método de gelificación ionotrópica, exhibieron una distribución de tamaño de $451,7 \pm 49,5$ nm (100%) y un valor promedio de PDI de $0,375 \pm 0,045$. En todos los casos, el potencial Z de los PECs fue altamente positivo ($> +49$ mV) ($n=3$). Las células H5V tratadas con LPS presentaron un incremento de la señal

de puntillado fluorescente homogéneo, comparada con el registro obtenido para las células no tratadas, luego de la incubación en presencia de PECs-FITC. La incorporación de dosis altas pero no tóxica de DS o HA, previa a la incubación con los PEC-FITC, bloqueó la captación de los nanosistemas.

Nuestros resultados *in vitro* muestran que (1) los PECs DS/QT fueron capaces de reconocer el endotelio normal e injuriado; (2) las moléculas de DS incluidas en la formulación de los PECs serían responsables de la interacción de los nanosistemas con el endotelio y (3) los receptores celulares superficiales para HA y DS, como el CD44, RHAMM y HARE, podrían ser responsable de esta interacción específica.

En conclusión, los PECs DS/QT podrían ser una gran estrategia para el diagnóstico y tratamiento a la enfermedad vascular.

ABSTRACT

Cardiovascular disease is the largest single cause of morbid-mortality in the world. However, there is still no pharmaceutical treatment that directly targets the blood vessel wall instead of just controlling the risk factors. Polyelectrolyte complexes (PECs) between Dermatan Sulphate (DS) (polyanionic polysaccharide) and Chitosan (QT) (polycationic polysaccharide); are a potential new strategy for the diagnosis and early treatment of cardiovascular diseases. DS/QT PECs, obtained by direct complexation under controlled conditions, showed a hydrodynamic diameter between 350-600 nm. These nanosystems were not cytotoxic to the murine-derived endothelial cell line (H5V). Fluorescent confocal microscopy revealed the specific uptake of fluorescently labeled PECs (PECs-FITC) by endothelial cells, when incubated alone or in co-cultures with murine macrophages.

The aim of the present study was to analyze the molecular characteristics of the binding of DS/QT PECs to murine endothelial cells.

FITC-PECs were prepared by direct complexation employing QT labeled with Fluorescein Isothiocyanate (FITC). The size (Dh), size distribution (PDI) and zeta potential (Z-potential) of the nanosystems were determined by Dynamic Light Scattering (DLS). DS and HA cytotoxicity was evaluated by colorimetric assay based on the metabolic reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). H5V cells were incubated with FITC-PECs (10 µg/mL, according to their DS concentration) for 30 minutes in the absence or in the presence of DS (37,5 µg/mL) or HA (50 µg/mL). Fluorescence or confocal images were collected from each sample.

Chemical hypoxia was induced by Lipopolisaccharide (LPS) (250 mM) for 1 hour.

FITC-PECs, produced by the ionotropic gelification method, exhibited a main size distribution of $451,7 \pm 49,5$ nm (100%) and an average PDI value of $0,375 \pm 0,045$. In all cases, the Z potential of the PECs was highly positive ($> +49$ mV) (n = 3).

H5V cells treated with LPS presented increment in the homogeneous green dotted signal compared to the result obtained from the cells that were not treated with LPS,

after the incubation with FITC-PECs. The previous presence of a high but nontoxic dose of DS or HA, blocked the uptake of FITC-PECs.

In vitro results show that (1) QT/DS PECs interacted with normal and injured endothelium; (2) DS molecules included in PECs formulation would be responsible for the specific binding of the nanosystem to endothelial cells and (3) Surface cell receptors for HA and DS, such as CD44, RHAMM and HARE, could be responsible for this specific interaction.

As conclusion, QT/DS PECs could be a good strategy for the diagnosis and treatment of the vascular disease.

CONTENIDO

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	2
PRESENTACIONES A CONGRESOS	4
1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	7
3. CONTENIDO	9
4. INTRODUCCIÓN	11
5. ANTECEDENTES	14
5.1. La Aterosclerosis	14
5.2. La Aterogénesis	16
5.3. La Pared Vascular y el Endotelio Vascular	20
5.4. La Disfunción y Activación Endotelial	22
5.5. La Matriz Extracelular	23
5.5.1. Componentes de la Matriz Extracelular	23
5.5.2. La Matriz Extracelular Vascular	24
5.5.3. Los Proteoglicanos de la Matriz Extracelular Vascular	26
5.5.4. La Matriz Extracelular Vascular en la Aterogénesis	30
5.6. La Nanomedicina en el Diagnóstico y Tratamiento Precoz de la Enfermedad Vascular	34
5.7. Los Complejos de Polielectrolitos de Dermatan Sulfato y Quitosano	35
6. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	37
6.1. Hipótesis	37
6.2. Objetivo general	37
6.3. Objetivos específicos	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS	38
7.1. MATERIALES	38
7.1.1. Equipos	38
7.1.2. Softwares	38

7.1.3. Filtros	38
7.1.4. Reactivos.....	38
7.1.5. Línea celular	39
7.2. MÉTODOS.....	40
7.2.1. Producción de PECs de DS/QT.....	40
7.2.2. Caracterización de los PECs de DS/QT.....	41
7.2.3. Cultivo de Células Endoteliales.....	43
7.2.4. Ensayos de Viabilidad.....	43
7.2.5. Estudio de la Captación de los Pecs-FITC con el Endotelio.....	44
7.2.6. Estudio de la Competencia de los PECs por los Receptores de Acido Hialurónico.....	44
7.2.7. Análisis Estadístico.....	45
8. RESULTADOS.....	46
8.1. Formulación y Estudio de las Características Fisicoquímicas de los Complejos de Polielectrolitos.....	46
8.2. Estudio de la Interacción de PECs-FITC con el Endotelio Normal e Injuriado.....	46
8.3. Estudio de la Participación de los Receptores de Acido Hialurónico en la Interacción entre PECs-FITC y las Células Endoteliales.....	48
8.3.1. Análisis de Citotoxicidad.....	48
8.3.2. Estudios de Competición.....	50
9. DISCUSIÓN.....	54
10. PERSPECTIVAS A FUTURO.....	59
11. CONCLUSIÓN.....	60
12. BIBLIOGRAFÍA.....	61

INTRODUCCIÓN

El importante incremento en la tasa de morbi-mortalidad asociado a las enfermedades cardiovasculares afecta tanto a los países desarrollados, como aquellos incluidos en nuestra región. Un común denominador que conlleva a este incremento se relaciona con la calidad de vida: el estrés crónico asociado al ritmo de vida acelerado; el elevado consumo de dietas hipercalóricas y alimentos procesados, sumados a la baja o nula actividad física. Características que exacerbaban la epidemia de síndrome metabólico y de diabetes tipo II. Solamente en la Argentina, se estima que junto con el cáncer, las enfermedades cardiovasculares representan más del 50% de la causa de muertes anuales.

La aterosclerosis es la enfermedad subyacente en un amplio abanico de enfermedades cardiovasculares. Esta enfermedad, actualmente considerada una enfermedad inflamatoria crónica, se produce en respuesta a la injuria vascular crónica asociada a múltiples factores de riesgo dados por la predisposición genética, edad, hipertensión, diabetes y malos hábitos como el sedentarismo y el consumo de cigarrillos, y las dietas que generan altos niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos (Hansson, 2006; Glass, 2001; Lusis, 2004).

La aterosclerosis consiste en un proceso degenerativo que lleva al endurecimiento o esclerosis de la pared arterial, caracterizada por lesiones circunscriptas denominadas placas de ateroma (Nakashima, 2007).

La mayoría de los tratamientos destinados al control y prevención de la aterosclerosis se focalizan en la modulación de los factores de riesgo asociados al desarrollo de la patología, pero pocos están orientados al control de las modificaciones que sufre la pared vascular frente a los factores de riesgo. Resulta así necesario el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad vascular basados en el estudio de los procesos bioquímicos que sufre la matriz extracelular (MEC) del endotelio vascular.

La nanomedicina es una rama dentro del campo de la medicina en la que los conocimientos y herramientas de la nanotecnología se aplican en la prevención y el tratamiento de las enfermedades, en general. El empleo de nanomedicina implica el uso de materiales a escala nanométrica y biocompatibles, tanto para diagnóstico y detección de comportamientos celulares específicos o de patologías, como así también para la distribución de drogas sitio-específico (García-García, 2017).

Varios nanomateriales han sido aprobados en ensayos clínicos por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) para la aplicación en humanos, otros están en fase de prueba (Kim, 2010). Entre los mismos, podemos citar a los liposomas formulados a partir de moléculas anfifílicas, con sus grupos hidrófobos e hidrofílicos autoensamblados en solución acuosa, empleados como sistema de distribución de drogas (Bozzuto, 2015). Por otro lado, los dendrímeros, corresponden a nanoestructuras ramificadas que contienen grupos funcionales químicos reactivos que permiten la adición de más monómeros para aumentar el tamaño de la nanoestructura. Los dendrímeros pueden unirse a su blanco en forma multivalente dado la estructura hiper-ramificada, permitiendo la síntesis de nuevos agentes antivirales en el tratamiento de HIV-1 (Vacas-Córdoba, 2016). Las más usadas por su baja reactividad y toxicidad en el organismo son las nanopartículas de oro, recubiertas por proteínas, oligonucleótidos que se usan para la distribución de fármacos (Tauran, 2013).

Los sistemas nanométricos hasta aquí descriptos agrupan sub-micro partículas de diferente morfología en un tamaño inferior a los 1000 nm. La formulación de la nanomedicina depende de la elección de sistemas poliméricos adecuados que posibiliten la mayor encapsulación y biodisponibilidad de la droga.

El quitosano (QT) es un polímero natural preparado por N-deacetilación parcial del biopolímero quitina, ampliamente utilizado en la encapsulación de drogas (Kumari, 2010; Sarmiento, 2006).

Ranney y colaboradores han demostrado el valor terapéutico y de diagnóstico de los complejos de polielectrolitos (PECs) obtenidos en su formulación con el empleo de dermatán sulfato (DS). Estas suspensiones particuladas son capaces de diferenciar el endotelio normal del endotelio neovascular presente en tumores y actuar, consecuentemente, como sistema de liberación de drogas a la matriz del tumor (Sakhalkar, 2003).

El grupo de trabajo dirigido por la Dra. Graciela Calabrese ha desarrollado un método sencillo y reproducible para la obtención de los complejos de polielectrolitos (PECs) de DS/QT, con potencial aplicación en el diagnóstico precoz y tratamiento de la enfermedad vascular. El tamaño de estos complejos es de alrededor de 450 nm, son estables en el tiempo y

capaces de interactuar con células endoteliales microvasculares murinas normales, sin producir citotoxicidad (Rasente, 2016).

Sobre la base de lo anteriormente descrito, el objetivo general de este trabajo, fue estudiar las características de la interacción de los PECs DS/QT con células endoteliales normales e injuriadas.

Para lo cual los objetivos específicos fueron:

1. Obtener y caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los PECs DS/QT y PECs DS/QT marcados con isotiocianato de fluoresceína (PECs-FITC DS/QT).
2. Estudiar *in vitro* las características de la interacción de los PECs-FITC DS/QT con las células microvasculares murinas, en condiciones normales y frente a la injuria.

ANTECEDENTES

5.1- La Aterosclerosis

La aterosclerosis, es una enfermedad cardiovascular compleja asociada a múltiples factores de riesgo. Actualmente se la define como un proceso espacial, no aleatorio y temporalmente no lineal que afecta áreas del árbol arterial atero-propensas. Esta patología degenerativa lleva al endurecimiento o esclerosis de la pared arterial donde se provocan lesiones circunscriptas denominadas placas de ateroma. En estas áreas, las células endoteliales adoptan un fenotipo disfuncional que se caracteriza por ejecutar un programa pro-inflamatorio, pro-trombótico y angiogénico.

La aterosclerosis es un proceso degenerativo que comienza tempranamente y progresa a lo largo de la vida. La progresión de la enfermedad cardiovascular está relacionada con la edad y las enfermedades inflamatorias crónicas como la obesidad y la diabetes, enfermedades que pueden exacerbar su desarrollo (Hartman, 2014).

La aterosclerosis se asocia a múltiples factores de riesgo [Fig. 1] entre los cuales adquiere relevancia la dislipidemia o alteración de la concentración de lipoproteínas plasmáticas generadas por trastornos metabólicos. Las dislipemias pueden ser de tipo primario cuando las alteraciones genéticas afectan las características fisicoquímicas de las apolipoproteínas, o las enzimas, receptores o transportadores que participan en su metabolismo. O bien dislipemias secundarias, provocadas por el tipo de alimentación y patologías de base como la diabetes mellitus, hepatopatías, hipotiroidismo, obesidad e hipertensión (Asociación Argentina de Cardiología, 2012).

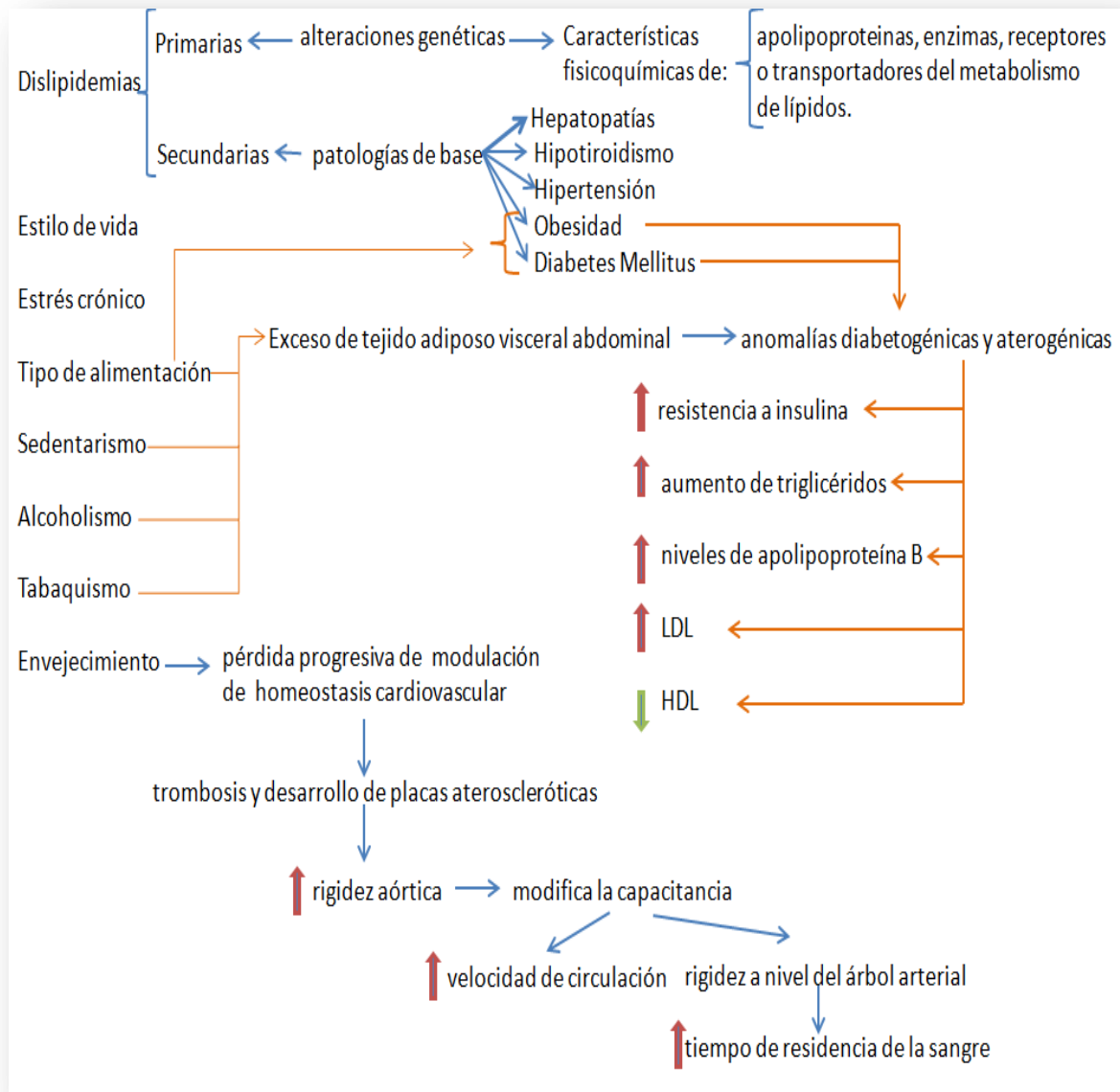


Figura 1. Factores de riesgo de la aterosclerosis

El estilo de vida contemporáneo contribuye fuertemente al desarrollo de la patología, el tipo de alimentación, el sedentarismo, alcoholismo, tabaquismo junto al estrés crónico, entre otros. Un estudio reciente, realizado sobre un grupo estadístico de 111.847 pacientes, con enfermedad cardiovascular de desarrollo crónico y estable en el tiempo, señaló a la obesidad como el factor de riesgo más fuertemente asociado a una edad temprana, seguido por el uso del tabaco (A.T. Cote, 2013).

Por su parte, Bastien y colaboradores señalan que el exceso de tejido adiposo visceral abdominal, se asocia a anomalías diabetogénicas y aterogénicas que provocan resistencia a insulina, aumento de triglicéridos y de los niveles de apolipoproteína B y colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), con disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Bastien, 2013).

Los ácidos grasos libres y los triglicéridos son las principales biomoléculas que relacionan la obesidad y la aterosclerosis. El exceso calórico crónico induce la acumulación de ácidos grasos en el tejido adiposo hasta que su capacidad de almacenamiento se satura, y los lípidos pasan a almacenarse en tejidos magros como el hígado, músculos y depósitos adiposos viscerales. Este proceso secuencial acumulativo induce un estado combinado de inflamación y resistencia a la insulina, relacionándose con otra patología de base, la diabetes mellitus (Rocha, 2009). En este contexto inflamatorio las adipocitoquinas secretadas por el tejido adiposo promueven la aterosclerosis, a través de la disfunción vasomotora endotelial y el incremento de las características pro-trombóticas (Van Gaal, 2007).

El envejecimiento produce una pérdida progresiva de la modulación de la homeostasis cardiovascular lo que desencadena, trombosis y desarrollo de placas ateroscleróticas (Palatini, 2011). En este contexto se observa un incremento de la rigidez aórtica, que modifica la capacitancia y provoca el aumento de la velocidad de circulación; pero a su vez la rigidez a nivel del árbol arterial, aumenta el tiempo de residencia de la sangre (O'Rourke, 2007).

Finalmente, otros factores de riesgo, asociados a la aterosclerosis, están dados por el tratamiento con fármacos del tipo betabloqueantes, diuréticos tiazídicos, cicloporinas A, corticoides e inhibidores de proteasas (Hartman, 2014).

5.2- La Aterogénesis

El conjunto de eventos tempranos, que conducen a la formación de la lesión ateromatosa o placa de ateroma, en el subendotelio arterial, se denomina aterogénesis [Fig. 2].

Este proceso se focaliza en áreas vasculares donde los sitios de lesión son el resultado de la influencia de los factores de riesgo antes mencionados, los cuales contribuyen

a disminuir la producción de óxido nítrico (NO) por parte de las células endoteliales (CEs), alterando las funciones protectoras del endotelio vascular y perjudicando la capacidad vasodilatadora. Paralelamente se produce un aumento en la permeabilidad vascular, que beneficia la transvasación de las LDL hacia el espacio subendotelial vascular. Es así que la interacción de las LDL con los proteoglicanos constituyentes de la matriz extracelular vascular (MECv) favorece la oxidación de las lipoproteínas por una diversidad de enzimas como la 5'-lipoxigenasa, fosfolipasa A2 y mieloperoxidasa (Hansson, 2005). Paralelamente, las CEs disfuncionales, por la disminución en la producción de NO, expresan moléculas de adhesión celular vascular y de adhesión intercelular (VCAM e ICAM), y selectinas. Este incremento en la adhesividad celular, promueve la unión de los monocitos circulantes con las CEs vasculares [Fig. 3] (Armán, 2015). Es así, que los monocitos migran hacia el subendotelio, atraídos por la proteína quimioattractante monocítica-1 (MCP-1), ya sea por transitosis endotelial directa, o atravesando las uniones gap estrechas entre las CEs, por transmigración. Estos monocitos, en el contexto inflamatorio subendotelial, se diferencian en macrófagos (Rao, 2007).

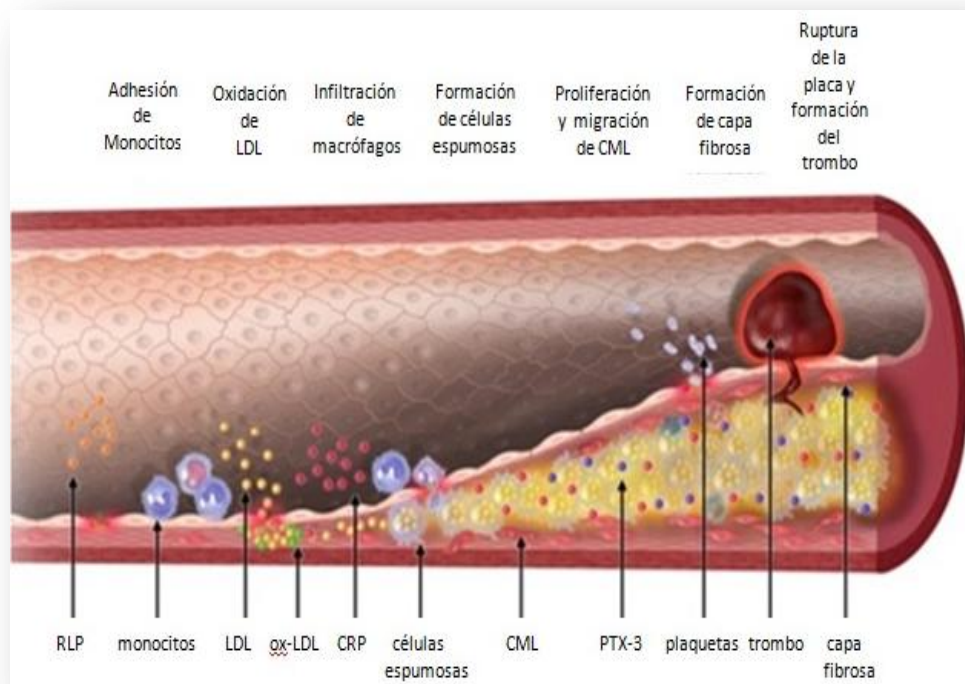


Figura 2. Esquema de la Aterogénesis en el vaso (modificado de Nelson, 2017).

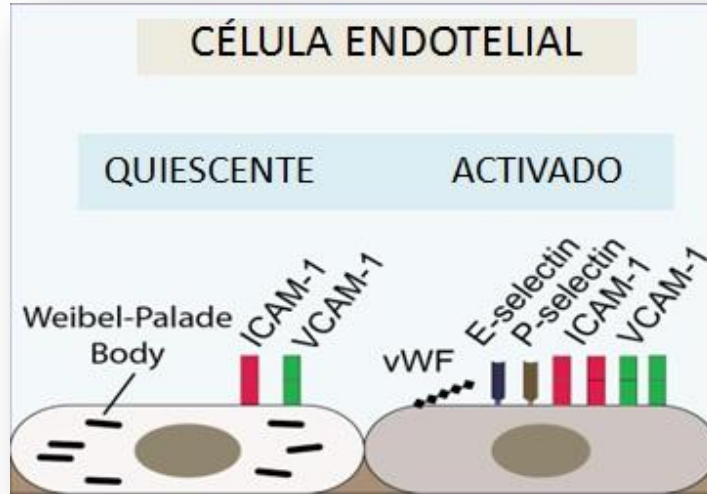


Figura 3. Esquema de células endoteliales activadas (modificado de Armán, 2015)

Los macrófagos, así diferenciados, expresan receptores SRA y CD36 a través de los cuales se internalizan las LDL modificadas (oxidadas). Esta acumulación progresiva de lípidos en la población de macrófagos, determina la formación de células espumosas en el subendotelio vascular (Devaraj, 2007).

Linfocitos T y otras células inmunitarias, mediadoras de procesos inflamatorios, se infiltran en el sitio de la lesión, atravesando la capa íntima y adventicia de la pared vascular (Virmani, 2005). Allí, las células T secretan citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento, que forman parte de la cascada inflamatoria y estimulan la producción de interleuquina-6, que a su vez estimula la producción de proteína C reactiva (PCR) y otros reactantes. Generan una señal sobre células del músculo liso para que alteren su citoesqueleto, produzcan metaloproteinasas de matriz y migren al espacio intimal, donde proliferan y segregan componentes de la matriz extracelular que forman una capa fibrosa sobre la lesión en desarrollo [Fig. 4] (Pradhan, 2004).

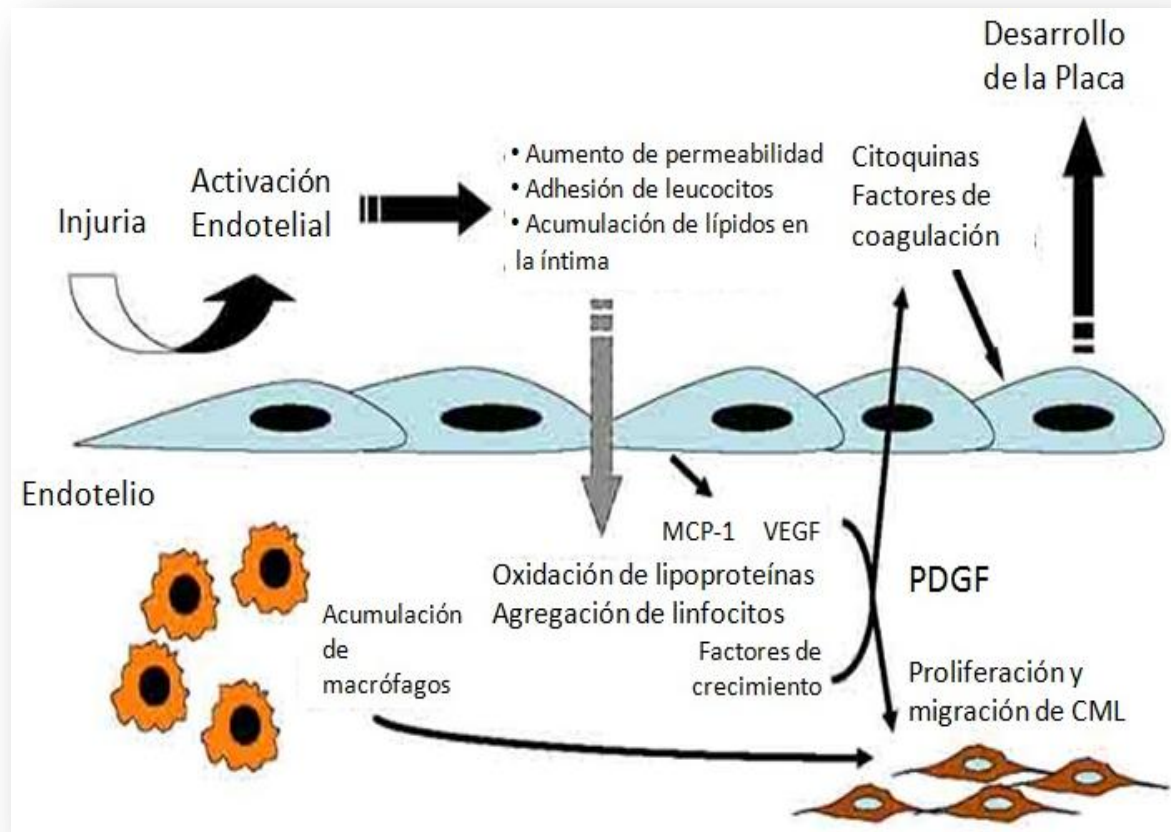


Figura 4. Desarrollo de la lesión ateromatosa (Modificado de Pradhan, 2004).

La placa de ateroma, continúa expandiéndose a través de los mecanismos descriptos. La lesión es estable si las células que la conforman tienen: núcleos lipídicos pequeños, matriz extracelular de aspecto fibrilar grueso, pocas células inflamatorias y predominio de células del músculo liso (CML) (Libby, 2007). Por el contrario, la lesión aterosclerótica tiene mayor inestabilidad y probabilidad de ruptura cuando presenta células con núcleos lipídicos grandes, matriz extracelular de aspecto fibrilar fino, abundantes macrófagos y relativamente pocas CML (Davies, 2008). Esta ruptura es mediada por la acción de metaloproteinasas de matriz extracelular secretadas por los macrófagos activados. Paralelamente, la secreción de citoquinas inflamatorias inhibe la proliferación de músculo liso, promoviendo la apoptosis de las células musculares (Tuzcu, 2007).

La ruptura de la placa de ateroma expone el contenido trombogénico de la matriz extracelular, colágeno, fosfolípidos y factor tisular. Este proceso conlleva a un

incremento de la agregación plaquetaria y coagulación por la formación de trombina, la conversión de fibrinógeno en fibrina y la liberación del factor de Von Willebrand en las plaquetas activadas. El resultado de esta cadena de eventos es la formación de un trombo, cuyo tamaño depende de la extensión de la rotura de la placa y la actividad de la vía fibrinolítica endógena. Este trombo puede ocluir parcial o totalmente el lumen del vaso sanguíneo (Burke, 2008).

El fenómeno tromboembólico se da en arterias con tendencia aterogénica, que están preferentemente en ciertas regiones del sistema circulatorio. Pueden generarse lesiones tempranas en la aorta (durante la vida fetal) y su progreso puede variar desde el cese total, a procesos muy rápidos con períodos intermedios de quiescencia relativa. Se desarrolla en arterias coronarias durante la segunda década de vida y, en arterias cerebrales, en la tercera década (Libby, 2008). El desarrollo focal de las lesiones se observa en puntos de ramificación de las arterias, con una mayor predilección en las partes proximales y curvaturas de vasos más pequeños (Napoli, 2008).

Las lesiones coronarias conducen a isquemia o infarto de miocardio. En la circulación cerebral se observan ataques isquémicos transitorios y accidentes cerebrovasculares (ACV), y las lesiones de la arteria renal resultan en isquemia, debido a reducción de la perfusión renal que dañan el parénquima renal, provocando uremia y finalmente insuficiencia renal (Smedby, 2009). La formación de trombos o hemorragia en una placa de ateroma, reduce el diámetro del lumen del vaso; este fenómeno es responsable de síndrome coronario agudo y la angina inestable (Davies, 2009).

5.3- La Pared Vascular y el Endotelio Vascular

La **pared vascular** está formada por tres capas concéntricas o tunicas: la **túnica íntima**, formada por el endotelio, la membrana basal subendotelial y la lámina elástica interna; la **túnica media**, formada por CML en los grandes vasos y pericitos en los capilares, y por la lamina elástica externa y finalmente, se encuentra la **túnica adventicia**, cuya función es la de unir los vasos sanguíneos al tejido conectivo subyacente, allí se encuentra la vasa vasorum, capilares que proveen la fuente nutricional y de oxígeno a las diferentes tunicas. [Fig.5] (Wagenseil, 2009; Chen 2013).

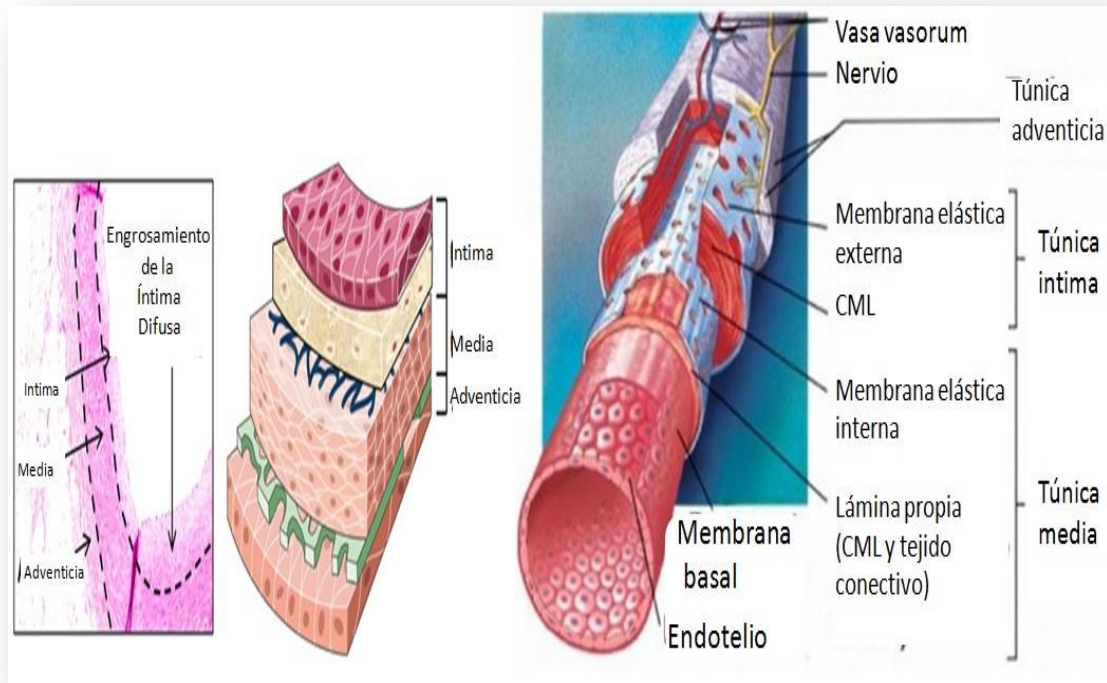


Figura 5. Estructura básica del vaso sanguíneo.
(McGraw-Hill Higher Education©, 2008; Chen, 2013)

El endotelio vascular forma el revestimiento de los vasos sanguíneos, actúa como un órgano endócrino multifuncional situado estratégicamente entre la sangre y la pared del vaso [Fig. 6], ejerciendo un papel clave en la determinación de la función vascular.

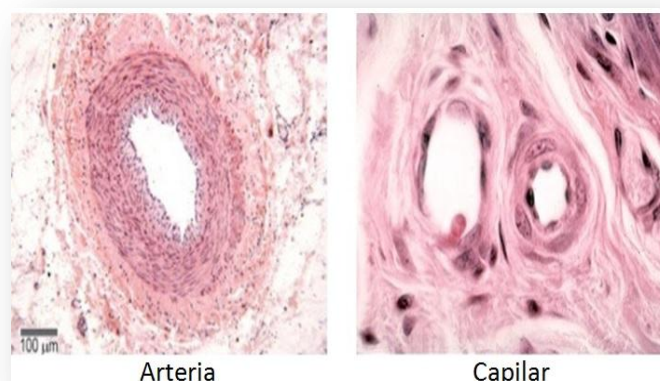


Figura 6. Microscopía de un corte transversal de arteria de mediano calibre y un capilar.
(Junqueira & Carneiro: *Histología Básica*®, 2005).

El endotelio tiene funciones homeostáticas y efectoras, gracias a receptores de membrana que participan en el transporte de lípidos, metabolitos y hormonas; rigen las interacciones célula-célula y célula-matriz (Pearson, 2010).

El endotelio vascular adulto normal es metabólicamente activo pero quiescente, regula el tono vascular, mantiene la composición de la matriz subendotelial, modula la proliferación de CML, la coagulación, la fibrinólisis, la permeabilidad de las lipoproteínas y las proteínas plasmáticas; y la adhesión y migración de las células sanguíneas (Durand, 2013).

Tradicionalmente el endotelio vascular fue considerado una fina capa celular de revestimiento. Sin embargo, actualmente se lo define como un fenotipo celular activo. El endotelio es influenciado en su expresión génica y funcional, por señales que se originan tanto en el lado luminal como abluminal. De esta manera, interpreta cambios de fuerzas mecánicas y la composición sanguínea, recibe información de los constituyentes de la matriz extracelular y de la pared del vaso (Wagner, 2008).

5.4- La Disfunción y Activación Endotelial

La angiogénesis, es la formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de capilares pre-existentes. La angiogénesis se produce en respuesta a señales específicas, principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Gimbrone, 2013). La angiogénesis requiere de la participación de una serie de eventos celulares: la migración de las CEs hacia los sitios de hipoxia tisular, la secreción de proteasas de la matriz extracelular para la degradación de la lámina basal del capilar, el incremento en el índice de proliferación celular, y la tubularización. Eventos celulares que concluyen en la formación del brote capilar hueco que hace contacto con otro capilar pre-existente y permitir que la sangre circule. Este proceso, se detiene a medida que se forman los nuevos vasos ya que con el aumento de la concentración de oxígeno, se interrumpe la producción de VEGF y se detiene la angiogénesis (Blois, 2014).

Frente a la injuria, el endotelio pierde el estado quiescente característico y ejecuta un programa pro-coagulante, pro-trombótico y angiogénico, donde el fenotipo normal quiescente se torna disfuncional y activado. Sin embargo, es muy difícil separar las vías de

señalización involucradas en la activación endotelial frente a la injuria, de las vías de señalización de la inflamación. La exposición a citoquinas inflamatorias produce cambios adaptativos rápidos, por parte del endotelio vascular, cambios que favorecen el reclutamiento de leucocitos y plaquetas en los sitios de lesión vascular.

Actualmente, la aterosclerosis se define como una enfermedad inflamatoria crónica, en la cual la respuesta inflamatoria iniciada frente a la injuria, se desregula y prolonga en el tiempo. En la aterosclerosis, la trombosis y la inflamación están íntimamente ligadas, por la secreción de quimioquinas por parte de las plaquetas y el reclutamiento de monocitos (dependientes de la P-selectina); las plaquetas activadas y su P-selectina se retro-alimentan en un círculo vicioso pro-inflamatorio (Woollard, 2006).

5.5- La Matriz Extracelular

La matriz extracelular (MEC) modula directa e indirectamente la respuesta inflamatoria en el microambiente celular.

La MEC es el soporte arquitectónico dinámico, no celular, de los tejidos y órganos. Este alto dinamismo se fundamenta en su remodelación enzimática y no enzimática, y también por la gran variedad de modificaciones post-traduccionales de sus constituyentes en respuesta a los diferentes procesos fisio-patológicos. A través de la MEC se activan o desactivan eventos celulares que se traducen en procesos fisiológicos como: desarrollo embrionario, reparación tisular o angiogénesis o, por el contrario, en su desregulación dan lugar a eventos patológicos, como algunos procesos inflamatorios, autoinmunes, degenerativos y tumorales (Frantz, 2010).

5.5.1- Componentes de la Matriz Extracelular

Los principales componentes de la MEC son el agua, las proteínas, las glicoproteínas y los proteoglicanos (PGs); los cuales presentan variaciones en su distribución tejido específica (Xu, 2014). Las principales glicoproteínas fibrosas son el colágeno, la elastina y las fibras reticulares. Por su parte, las proteínas como la fibronectina, la laminina, la tenascina y la trombospondina, participan principalmente en la adhesión célula a célula y célula-matriz (Theocharis, 2015). Por último los PGs, no sólo son responsables de las

características hidrofílicas de la MEC, sino que además actúan como moléculas secuestradoras de factores de crecimiento y citoquinas (Xu, 2014).

5.5.2- La Matriz Extracelular Vascular

La matriz extracelular vascular (MECv) se clasifica funcionalmente en **lámina basal subendotelial y la matriz intersticial**. (Wagenseil, 2009).

Las principales biomoléculas de la MECv son las proteínas fibrosas, que forman el esqueleto de la misma; esas proteínas son colágenos, elastina, fibronectina y fibrilinas; también se encuentran abundantes proteoglicanos amorfos o solubles (Hallmann, 2008). La composición química, el grosor y la arquitectura de la MECv varían dependiendo del tipo de vaso sanguíneo. Las arterias, tienen más colágeno y elastina que las venas; mientras que en los grandes vasos, se observa que la túnica adventicia se extiende más allá de la lámina elástica externa [Fig. 7] (Wagenseil, 2009; Yurdagul, 2016).

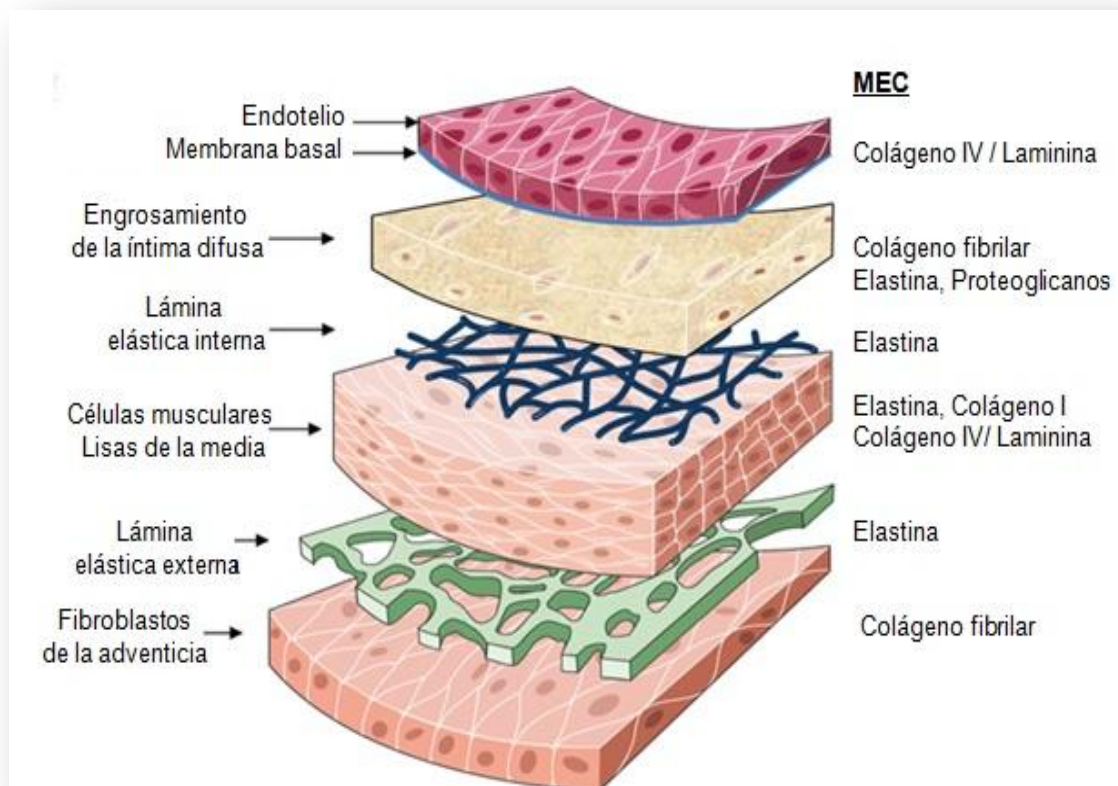


Figura 7. Componentes de en las diferentes capas arteriales (modificado de Yurdagul, 2016)

La **lámina basal subendotelial** se encuentra directamente por debajo del endotelio vascular, como soporte de las CEs. La lámina basal es sintetizada por las propias CEs y las CML (Wang, 2006).

Los principales componentes de la lámina basal subendotelial, al igual que el resto de las matrices extracelulares, son las glicoproteínas fibrosas y los proteoglicanos (PGs). Las glicoproteínas fibrosas como el colágeno tipo IV, forman una red bidimensional. Junto con las proteínas de adhesión como la laminina. Ambas redes, colágeno tipo IV y laminina, son interconectadas por proteínas multiadhesivas, las entactinas [Fig. 8] (Frantz, 2010).

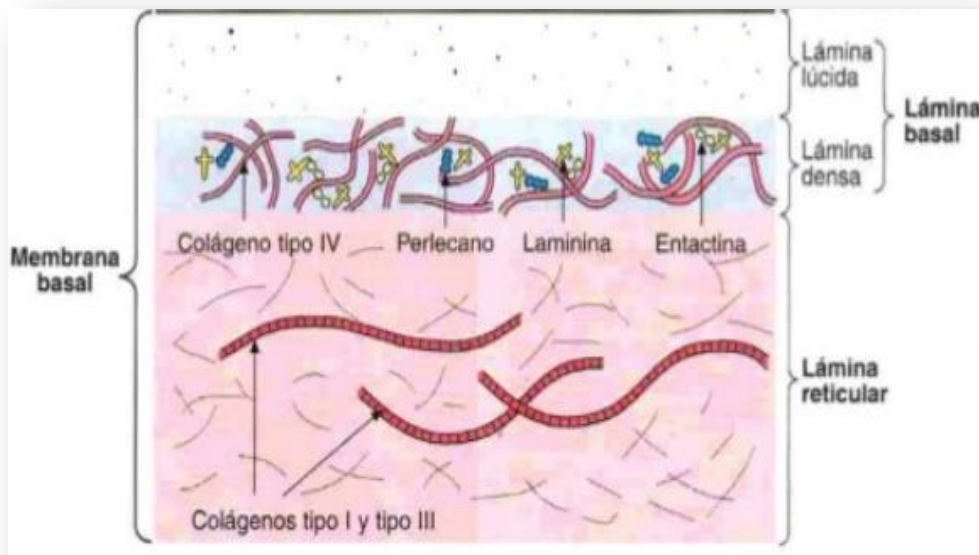


Figura 8. Componentes de la lámina basal subendotelial (MEC) (Frantz, 2010)

Los PGs de la lámina basal vascular están representados principalmente por el perlecano, un proteoglicano multidominio que cumple función de anclaje, interconectando moléculas de la MEC con moléculas de la superficie celular. Este PG además actúa como sitio de unión para muchas moléculas biológicas, como factores de crecimiento y lipoproteínas. Además del perlecano, aparecen otros PGs como los constituyentes de la familia de los pequeños PGs ricos en leucina (SLRPGs) como la decorina y el biglicano. Estos componentes de la lámina basal subendotelial limitan el crecimiento de la MECv, regulan la expresión de

genes inflamatorios, reducen la captación de LDL e inhiben la calcificación de la matriz (Yurchenco, 2011).

La MECv clasificada funcionalmente como la **matriz intersticial** es aquella que podemos encontrar en la túnica íntima, media y adventicia de los vasos sanguíneos; es de una gran variabilidad en su composición biomolecular dependiendo del tipo de vaso sanguíneo.

5.5.3- Los Proteoglicanos de la Matriz Extracelular Vascular

Los Proteoglicanos (PGs) son biomoléculas formadas por un esqueleto proteico covalentemente unido a una o más moléculas de glicosaminoglicanos (GAGs). Son sintetizados por CEs y por CML. La parte polipeptídica se ensambla en el retículo endoplásmico, donde se añaden algunos monosacáridos, mientras que en el sitio trans del complejo de Golgi, se alargan las cadenas de GAGs y se adicionan los grupos sulfato. Los PGs son exocitados al espacio extracelular o, algunos, forman parte de la membrana plasmática, insertándose entre las cadenas de ácidos grasos de los lípidos mediante una porción de la secuencia de aminoácidos hidrofóbicos en la porción del polipéptido del proteoglicano (Karamanos, 2013).

Los PGs muestran diferentes secuencias de aminoácidos y longitud de sus polipéptidos que pueden variar de 100 a 4000 aminoácidos; por esta razón ocupan gran volumen en la MEC ya que no pueden plegarse por la configuración helicoidal abierta de grandes dimensiones, donde las moléculas grandes quedan atrapadas fácilmente. (Viklund, 2007). La organización espacial y la carga negativa de los PGs, facilita la difusión selectiva de diversas moléculas y crean una red tridimensional que actúa como filtro biofísico.

Además de variar en la cantidad de aminoácidos, también varían en los GAGs que los conforman. Por ejemplo, el PG decorina está constituido por una sola molécula de GAGs, y PG agrecano puede contener más de 200 GAGs. (Baker, 2010). Las distintas funciones de los diferentes PGs están dadas principalmente por el contenido de GAGs en su estructura.

Los GAGs son polímeros lineales, no ramificados de unidades de disacáridos repetidas, generalmente constituidos por un ácido urónico (casi siempre el ácido

glucorónico) y una hexosamina (glicosamina o galactosamina). La elevada presencia de GAGs, en la estructura de los PGs de la MEC, le confiere una de sus principales características: la hidrofiliidad de la MEC, porque el agua está fuertemente asociada con las cargas eléctricas negativas de los grupos carboxilo (COO⁻) y grupos sulfato (SO₃⁻) de los disacáridos. (Song, 2007).

Los principales GAGs son el ácido hialurónico, el dermatán sulfato, el queratán sulfato, el condroitín sulfato y el heparán sulfato [Fig. 9] (Blich, 2013).

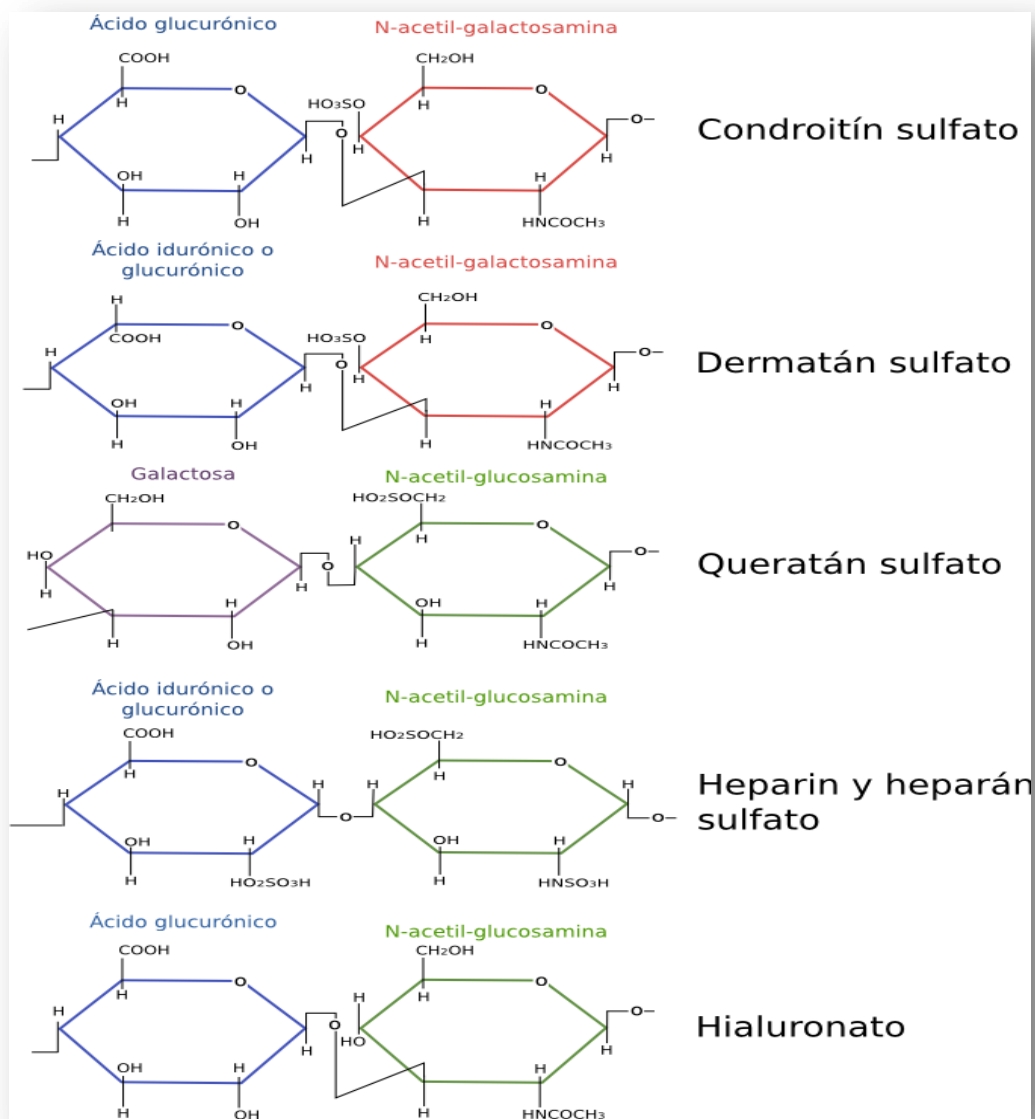


Figura 9. Estructura química de los principales GAGs (modificado de Blich, 2013)

Por ejemplo, el **hialuronato o ácido hialurónico (HA)**, es un tipo distinto de GAG, porque no forma enlaces covalentes con otras moléculas de la MEC, se sintetiza en la membrana celular, no en el complejo de Golgi y no contiene grupos sulfato. El hialuronato se compone de unidades disacáridas, ácido D-glucurónico y N-acetil-glucosamina, repetidas hasta 20.000 veces. Por lo general se asocia con colágeno tipo IV y otros tipos de PGs, para proporcionar elasticidad y resistencia en los tejidos (Falk, 2013). En lugares del cuerpo donde hay una alta tasa de proliferación celular, la producción de GAGs de ácido hialurónico es mayor, porque facilita el movimiento celular. Bioquímicamente, es una molécula que ocupa un gran volumen y proporciona espacios libres, por lo que también es abundante en los cartílagos de las articulaciones para mayor resistencia a fuertes fricciones (Bi, 2007).

Los otros GAGs (salvo el ácido hialurónico), contienen grupos sulfato y están unidos covalentemente a polipéptidos. Estas biomoléculas están constituidas por largas cadenas de unidades disacáridas repetidas. Por ejemplo en el caso del **condroitín sulfato (CS)** se compone de repeticiones de ácido N-acetil-galactosamina y ácido glucurónico, (Moreno, 2008), mientras que el **dermatán sulfato (DS)** presenta ácido glucurónico y N-acetil-galactosamina. Por su parte, el **queratán sulfato (KS)** contiene repeticiones de N-acetil-glucosamina y galactosa, con diferentes tipos de sulfatación según el monosacárido. Por último, el **heparán sulfato (HS)** sintetizado en la mayoría de las células (tiene un análogo molecular, la heparina), se forma por repeticiones de N-acetil-glucosamina y ácido glucurónico (Sarrazin, 2011).

La gran diversidad de actividades biológicas asociadas a los PGs depende de las cadenas de GAGs constituyentes ya que participan en la organización de la MECv y la modulación de la actividad de los factores de crecimiento, lipoproteínas y de las citoquinas, sobre la pared vascular (Neufeld et al., 2014).

Por ejemplo, los PGs compuestos por CS y DS tienen la capacidad de interactuar con las lipoproteína de baja densidad (LDL) y por lo tanto se las consideran moléculas pro-aterogénicas (Falk, 2013). La acumulación temprana de los lípidos en las capas más externas de la túnica íntima arterial depende de los cambios estructurales en las cadenas de GAGs. Por ejemplo, PGs producidos por las CML cultivadas en presencia de factor de

transformación de crecimiento (TGF- α 1), muestran cadenas de GAGs más largas y con mayor afinidad de unión por LDL, que las CML no tratadas (Schaefer, 2012).

Por su parte el PG decorina, conduce a la inducción de p21 por una vía independiente de MAPK, que resulta en la inhibición de la apoptosis de CEs (Schaefer, 2007). Es miembro de la familia SLRP (decorina, biglicano y fibromodulina) también pueden modular la vía TGF- β (Bi, 2007). Por ejemplo, la *decorina* modula la vía TGF- β mediante la interacción con LRP1 para regular la características mecánicas de la MEC, mediante la organización tridimensional del colágeno en la matriz y la diferenciación del músculo esquelético (Cabello-Verrugio, 2007; Schaefer, 2008).

Otro grupo importante de los PGs, que se destaca por sus propiedades anti-aterogénicas, son los **HSPGs**. Estos PGs, contienen cadenas de heparán sulfato (HS), sintetizadas por las células de la pared del vaso, incluyendo CEs y CML vascular (Karamanos, 2013).

Los HSPGs destacan en mayor parte, por sus propiedades anti-aterogénicas, tanto por su capacidad para inhibir la adhesión de monocitos y como la de inhibir el crecimiento de CML vascular (Tran-Lundmark, 2008). Por ejemplo, el *sindecano*, un HSPG relacionado con la protección de la enfermedad vascular, puede regular la expresión de todos los factores de crecimiento que se unen a la heparina, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento epitelial de heparina (EGF). Lo que sugiere que el sindecano puede tener sitios de unión específicos para los factores de crecimiento mencionados (Alexopoulou, 2007). Se ha observado que la expresión del sindecano, es regulada diferencialmente por distintas formas de onda tensión de corte, característico de las regiones susceptibles a la aterosclerosis en las arterias carótidas humanas (Koo, 2013). La expresión de sindecano se reduce en las células expuestas a la forma de onda atero-proclives, lo que sugiere un efecto anti-aterosclerótico protector del PG.

Pero también se ha observado que tienen efectos pro-aterogénicos en ratones. Por ejemplo, el *perlecano*, el HSPG principal de la MEC en la pared del vaso sanguíneo, interactúa con los componentes de la lámina basal, moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento (Karamanos, 2013). En estudios con modelos murinos, se observa

que el perlecano contribuye con la fisiopatología de lesiones ateroscleróticas. Este efecto que puede estar dado porque el perlecano tiene un dominio homólogo con el receptor de LDL, por lo que se sugiere que este HSPGs puede tener una función auxiliar en la unión de LDL (Alexopoulou, 2007).

5.5.4- La Matriz Extracelular Vascular en la Aterogénesis

La aterogénesis, es el proceso que posibilita el desarrollo de la lesión ateromatosa en áreas vasculares atero-propensas. Tres hipótesis intentan explicar los eventos moleculares tempranos implicados en la aterogénesis.

La primera de ellas conocida como hipótesis de “respuesta a la retención”, enfatiza que la interacción de las moléculas constituyentes de la MECv, en especial los PGs, y las lipoproteínas desencadenarían los eventos moleculares que conducen a la aterosclerosis temprana (Tabas, 2007). Sin embargo es importante destacar que se considera a la aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria (Ross, 1999; Tedgui, 2006), orquestada bajo la modulación de diversas citoquinas y quimioquinas a lo largo del desarrollo de la enfermedad. La unión de las citoquinas y factores de crecimiento a los PGs de la MECv, podría modificar el tiempo de residencia de estas biomoléculas en el microambiente celular, modulando de manera dinámica la actividad funcional de las mismas (Hurt-Camejo, 1995; Young, 2004). Por último, la “teoría de la oxidación” propone que como consecuencia de la hipercolesterolemia, aumenta la probabilidad de oxidación de las LDL. En esta teoría el proceso inflamatorio actúa como un agente catalítico para acelerar la velocidad de oxidación (Steinberg, 1987).

A partir del análisis de estas tres hipótesis, las mismas convergen en un denominador común: la participación de la MECv en las etapas tempranas del desarrollo de la patología.

Nakashima y colaboradores han descripto la correlación entre la distribución de lípidos y PGs en la lesión conocida como ensanchamiento difuso de la íntima (DIT).

Los PGs son un componente en la DIT con un rol importante en la aterogénesis temprana. Por ejemplo, los PGs ricos en CS, sintetizados por las CML aórticas humanas en cultivo, tienen alta afinidad con la lipoproteína A y el LDL (Lundstam, 1999). El

tratamiento de las CML con TGF- β 1 induce la elongación de las cadenas de GAGs de estos PGs con mayor afinidad de unión a las LDL (Grainger, 2007).

Es importante destacar que no sólo la elongación de las cadenas de los GAGs constituyentes tiene en rol destacado en la aterogénesis, sino que además se describen cambios en la calidad de la cadena de GAGs que lo conforman (O'Brien et al, 2004).

El biglicano, PG del tipo SLRP rico en CS o DS, tiene la capacidad de unión a lipoproteínas que contienen apo B, como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), principal transportador de triglicéridos y precursor fisiológico de las lipoproteínas de la densidad intermedia (IDL) y el LDL. Este cumple un papel fundamental en la aterogénesis temprana, al contribuir con la deposición inicial de las lipoproteínas aterogénicas en la capa externa del DIT (Angraeni et al., 2011; Oberkersch, 2014 y 2016). Por su parte, también ha sido descripta la acumulación del PG versicano en lesiones ateroscleróticas (Virmani, 2000).

El Perlecano, el HSPG principal de la MEC de la pared del vaso, se encuentra tanto en lesiones tempranas como en las lesiones avanzadas y se co-localiza con apo A-I, sugiriendo que el perlecano actúa como un factor de retención para el HDL en la formación de la lesión tipo I, pero también tiene otros papeles en la aterogénesis, como la captación de lipoproteínas y la acumulación de lípidos intracelulares (Järveläinen, 2003).

Nakashima y colaboradores [Fig.10] describieron la distribución pre-lesional de los PGs, biglicano y decorina, en las arterias coronarias humanas de sujetos jóvenes, con un patrón similar a la distribución de lípidos en la fase temprana de la lesión tipo I, lo que sugiere la participación clave de estos PGs en el proceso patológico. La unión de las lipoproteínas aterogénicas, a las cadenas de GAGs de los PGs muestran elongación en lesiones ateroscleróticas humanas tempranas (Little, Ballinger, & Osman, 2007; Theocharis, Theocharis, De Luca, Hjerpe, & Karamanos, 2002). Las cadenas hiperelongadas del CS del biglicano, pueden ser de gran relevancia en el proceso pro-aterosclerótico debido a que aumentan la afinidad de unión a VLDL (Angraeni et al., 2011). La mayor longitud de las cadenas de DS con respecto al CS de la pared vascular aórtica, muestran al DS como el principal GAG con alta afinidad de unión a las LDL (Leta, 2002). Pero además, otros factores aterogénicos, como el TGF- β , PDGF y trombina, estimulan la elongación de las cadenas de CS, lo que incrementa su afinidad de unión a las lipoproteínas (Ivey, 2008, Osman, 2012;

Little, 2012). Las aortas obtenidas a partir de ratones knockout (LDLR^{-/-}) alimentados con una dieta rica en colesterol, mostraron la elongación temprana y sostenida en el tiempo de las cadenas de CS. Así mismo se describió, en este modelo experimental, el incremento en la expresión de los RNA mensajero de las enzimas que controlan el largo de la cadena de GAG: la condroitin-4-sulfotransferasa-1 (C4ST-1) y la N-acetilgalactosamiltransferasa-2 (ChGn-2) (Anggraeni, 2011).

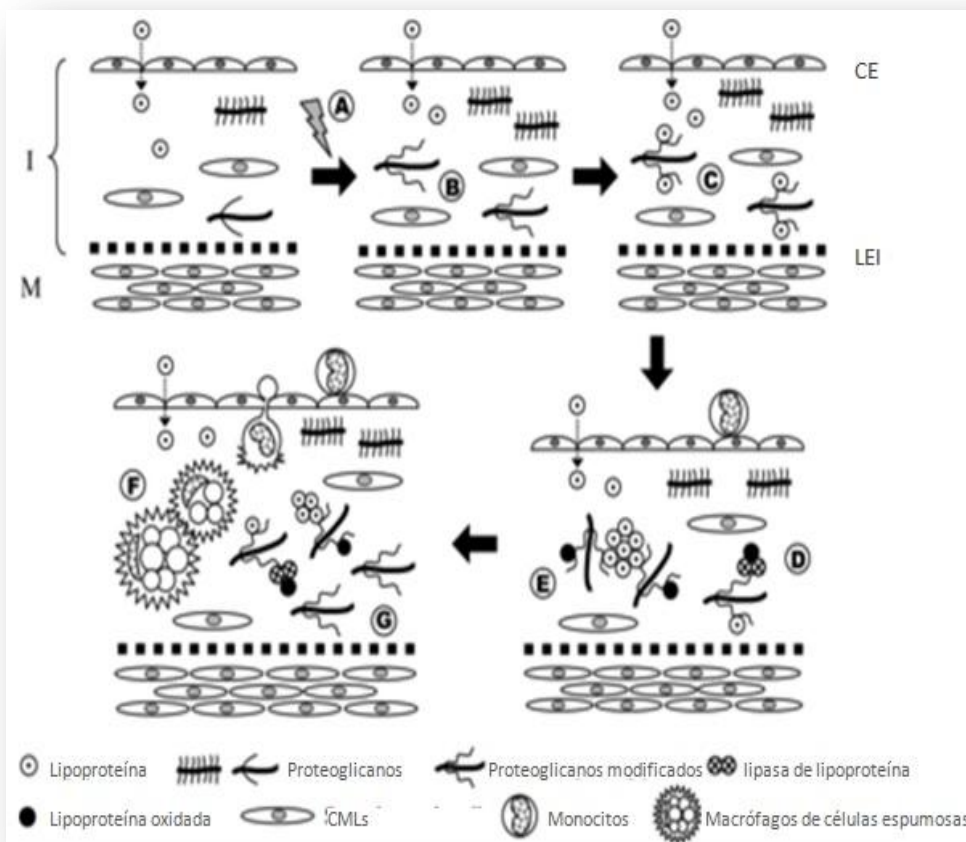


Figura 10. Esquema de la Respuesta a la Retención:

(A) estímulos predisponentes, (B) modificación de PGs, (C) unión directa de lipoproteínas y PGs, (D) unión indirecta de lipoproteínas y PGs con moléculas accesorias, modificaciones de lipoproteínas (ej: oxidación y agregación), (E) producción de PGs con una elevada afinidad de unión a lipoproteínas, (F) formación de macrófagos de células espumosa y (G) absorción de complejos de lípidos-PGs por parte de los macrófagos.

I: íntima; M: media; CE: célula endotelial; LEI: lámina elástica interna.

Todo lo expuesto pone en relieve la importancia de los PGs y su distribución en la túnica íntima, como parte del proceso en el desarrollo temprano de la patología. Esta participación no sólo se centra en la interacción con las lipoproteínas aterogénicas, sino que también muestran una activa participación en la modulación de la respuesta inflamatoria a través de la interacción con el receptor de reconocimiento de patógenos.

Durante la aterogénesis se liberan moléculas endógenas, tanto intra como extracelulares, que actúan como moléculas patrón asociadas a la injuria (DAMP), las cuales adquieren importancia en el proceso inflamatorio a través de su interacción con los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) y los tipo Toll (TLR). En el primer caso, la activación de los PRR por parte de las DAMP, activa vías dependientes del NF- κ B, de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK-p38) y la vía del interferón tipo I; esto genera un aumento de la secreción de citoquinas inflamatorias: la interleuquina 1- β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 6 (IL-6), quemoquinas como la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α) y la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1), también factores de crecimiento, como el factor transformador de crecimiento (TGF- β) y el factor estimulante de colonias (CSF) (Libby, 2013). Algunos PGs como los SLRPGs presentan, en sus secuencias de aminoácidos, regiones que actúan como poderosos DAMP activando la respuesta inflamatoria estéril (Moreth, 2012; Song, 2014). Por su parte, el PG versicano puede activar al heterodímero TLR-2/6 a través de sus cadenas de GAGs (Wight, 2014).

Además de inducir una respuesta inflamatoria estéril directa, los PGs pueden modular la respuesta inflamatoria. Esta modulación puede ser ejercida a través del secuestro de factores como TGF- β y TNF- α ; o bien mediante la activación de factores de crecimiento como FGF y VEGF (Macri, 2007). Particularmente, el CS presenta propiedades anti-inflamatorias, como quedó demostrado por la administración profiláctica del GAG en un modelo animal de aterosclerosis (Du Souich, 2009).

Actualmente, las terapias empleadas en el tratamiento y prevención de la aterosclerosis tienen como blancos principales a los factores de riesgo que contribuyen al incremento de la incidencia de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la máxima

eficacia de estos tratamientos, determinada a través de múltiples estudios clínicos, está limitada a un 30% (Little, 2011). Es así que adquiere relevancia la identificación de nuevas moléculas dianas para el diagnóstico y tratamiento precoz de la enfermedad. Los PGs de la MECv y las modificaciones estructurales de los GAGs, a lo largo de los estadios subclínicos de la aterosclerosis, pueden ser blanco de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento de esta patología multifactorial.

5.6- La Nanomedicina en el Diagnóstico y Tratamiento Precoz de la Enfermedad Vascular.

La nanomedicina es una herramienta de la nanotecnología aplicada en la prevención y el tratamiento de enfermedades. La nanomedicina se basa en el empleo de materiales a escala nanométrica que sean biocompatibles para diagnóstico y también para la distribución de drogas de forma sitio-específico (García-García, 2017). Varios tipos de nanomateriales han sido aprobados para ensayos clínicos por la Food Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) para la aplicación en humanos, mientras otros están en fase de prueba (Kim, 2010).

La biocompatibilidad de los complejos de polielectrolitos (PECs) los convierte en uno de los más prometedores nanomateriales aplicados en nanomedicina. Los PECs están formulados con policationes y polianiones, para la distribución de fármacos (Luo & Wang, 2014). Estos biomateriales de tamaño nano y submicrónicos representan una plataforma prometedora para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las patologías vasculares (Wen et al., 2012), ideal para ser utilizados en seres humanos porque entre los polímeros de cargas opuestas, se produce la asociación espontánea con enlaces electrostáticos fuertes y reversibles, conduciendo a la formación de un tipo de estructura transitoria que evita el empleo de agentes químicos tóxicos unidos covalentemente (Thakker et al., 2014).

Mediante estudios realizados por Ranney et al., 2005, se conoce que la neovascularización tumoral es más bioadhesiva que el endotelio normal, y permite que agentes

terapéutico formulados con DS y doxorubicina, puedan usarse para distribución específica de la droga (Ranney et al., 2005).

El DS es considerado un biomaterial importante por tener propiedades protectoras de la pared arterial. Las cadenas de DS pueden aumentar la tasa de inhibición de la trombina por el Cofactor II de Heparina. Las cadenas de DS regulan la coagulación, la quimioatracción y la proliferación celular contribuyendo de esta forma a la constitución de un microambiente anti-aterogénico (Rasente, Egitto & Calabrese, 2012; Tollefsen, 2010). También, se ha descrito previamente que el DS de bajo peso molecular (LMMDS) induce la entrada de las células en la fase S del ciclo celular, potenciando la actividad de la metaloproteinasa-2 (MMP2), por lo que puede modular la migración de las células endoteliales mediante mecanismos independiente del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Rasente et al., 2012).

5.7- Los Complejos de Polielectrolitos de Dermátán Sulfato y Quitosano

Con el objetivo de investigar una forma novedosa de prevenir, diagnosticar y tratar la aterosclerosis, la Dra. Rasente, bajo la dirección de la Dra. Calabrese, lograron sintetizar partículas submicrónicas estables físicamente en el tiempo: Complejos de Polielectrolitos de dermatán sulfato de bajo peso molecular (LMMDS) y quitosano (QT), para investigar y caracterizar su captación y absorción celular en las células endoteliales, como una estrategia para el targeting selectivo sobre el endotelio vascular.

El Quitosano es un biopolímero natural, un polisacárido de carga positiva que presenta característica mucoadhesiva natural. El QT es muy utilizado en la formulación de aplicaciones biomédicas por su alta biocompatibilidad (Sosnik, dasNeves, & Sarmiento, 2014). Este polímero no es tóxico, no produce reacciones alérgicas y sus productos de degradación (amino-azúcares), son metabolizados por el cuerpo humano (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004). El QT como polímero, se puede asociar con polianiones, para formar complejos de polielectrolitos conservando sus propiedades mucoadhesivas y la capacidad de interrumpir transitoriamente las uniones estrechas entre las células endoteliales (Patel, Patel, & Patel, 2010; Wilson et al., 2010).

Los PECs DS/QT obtenidos por el método de gelificación ionotrópica (Liu, Jiao, Wang, Zhou, & Zhang, 2008) fueron obtenidos a pH 3,5 (Rasente, 2016), para que los grupos amino del QT fueran protonados y los grupos carboxílicos del LMMDS queden disponibles como carboxilatos cargados negativamente, así formar interacciones electrostáticas fuertes y enlaces inter-macromoleculares adicionales entre ambos componentes, como los enlaces puente de hidrógeno, enlaces Van derWaals, enlaces dipolo-dipolo y las interacciones hidrofóbicas (Koetz & Kosmella, 2007).

Los PECs así formulados, mostraron una distribución de tamaño bimodal con un pico mayor de 729 ± 11 nm, siendo el valor PDI de $0,322 \pm 0,055$; y el potencial Z altamente positivo ($>+49$ mV) (Rasente, 2016). Estas suspensiones nanoparticuladas mostraron alta especificidad de interacción con las células endoteliales, según las pruebas realizadas en modelo murino (H5V), al endotelio humano (células endoteliales venosas de cordón umbilical humano; HUVEC) solas y en co- cultivo con macrófagos humanos, así como también en co-cultivo entre endotelio murino y macrófagos de la misma especie. Por ejemplo, un estudio realizado por la Dra. Rasente y colaboradores, demostró la absorción de los PECs de DS/QT por parte de las CEs microvasculares murinas en forma específica, dado que los PECs no fueron absorbidos por una línea celular diferente, como Raw 264.7 (Rasente, 2016).

La adición de una pequeña carga útil de LMMDS (10% p/p), permitió la focalización de los PECs hacia las células endoteliales y aprovechar la farmacodinámica de las partículas por la actividad biológica anti-aterogénica del LMMDS en estas células. La retención de los PECs por las células endoteliales durante al menos 2 hs, es relevante para las aplicaciones de las mismas en el diagnóstico y para el tratamiento de la patología, tomando en cuenta que la carga útil activa puede inhibir una vía celular específica, como podría ser la inhibición de la expresión de un gen durante varias horas o días (Rasente, 2016).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

6.1- Hipótesis

Los factores de riesgo asociados al desarrollo de la enfermedad vascular provocarían la activación de las células endoteliales y la consecuente ejecución del programa inflamatorio. Extracelularmente, una de las formas de manifestación de esta disfunción endotelial serían los cambios en el patrón de expresión de los proteoglicanos y/o modificaciones estructurales en las cadenas de los glicosaminoglicanos. Estos cambios dinámicos impactarían sobre la accesibilidad de los PECs y las interacciones del nanomaterial con el ambiente biológico y su evolución a lo largo de la patología. La interacción específica de los PECs DS/QT con las células endoteliales vasculares, dependería de la presencia de dermatán sulfato en la formulación del nanomaterial y sería mediada a través de los receptores del ácido hialurónico.

6.2- Objetivo General

El objetivo general del presente proyecto es la obtención de un nuevo nanosistema constituido por los polímeros de DS y QT para el diagnóstico precoz y/o tratamiento de la enfermedad vascular. Particularmente, el objetivo es estudiar la interacción de los PECs DS/QT con células endoteliales vasculares normales e injuriadas, para comprender los mecanismos celulares que median el reconocimiento y la distribución de las drogas a través del nuevo sistema nanoformulado.

6.3- Objetivos Específicos

- Obtener PECs DS/QT y PECs DS/QT-FITC y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas.
- Estudiar *in vitro* las características de la interacción de los PECs DS/QT-FITC con las células microvasculares murinas, en condiciones normales y frente a la injuria.
- Estudiar *in vitro* la participación de los receptores celulares a HA en la interacción entre PECs-FITC de DS/QT.

MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES

7.1.1- Equipos

Bomba de infusión, 40 mL /h. PC11U (APEMA SRL, Buenos Aires, Argentina). Zetasizer Nano ZS, con láser He-Ne (633 nm) y corrector digital ZEN3600 (Malvern Instruments, Reino Unido). Microscopio de contraste de fluorescencia e interferencia diferencial (DIC) Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments, Melville, NY, EE.UU.). Microscopio confocal de escaneo láser Olympus FV300 modelo BX61 (Olympus Corp., Tokio, Japón) equipado con láseres Arand He-Ne para apertura numérica 1.4 60X.

7.1.2- Softwares

Micrometrics SE Premium. Bioimage XD 1.0. FluoView versión 3.3. ImageJ 1.42q e Image-Pro plus versión 4.5 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

7.1.3- Filtros

Filtro cualitativo, Ø 125 mm. (Xinxing, Fuyang, Zhejiang, China).

7.1.4- Reactivos

LMMDS (PM 5 kDa) (Syntex S.A., Argentina). DS (Lote No. 082-91, Buenos Aires, Argentina. Extraído de la mucosa intestinal bovina. (Syntex S.A., Argentina). QT (viscosidad 20-300 cps, grado de desacetilación 95,5%, 448869). Medio de cultivo medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). Suero fetal bovino (SFB) (Natocor. Córdoba, Argentina). Penicilina G Sódica y Sulfato de Estreptomina (Richet, Argentina). Buffer veronal-veronal sódico Electra RHR (Helena, Argentina). EDTA (MERCK, USA). Tripsina (GIBCO, USA). Azul Tripán (MallinckrodtR, USA). Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,-5-difeniltetrazolio (MTT) (Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.). Dodecilsulfato de Sodio (SDS) (Invitrogen, USA).

7.1.5- Línea Celular

Células derivadas de endotelio de corazón murino transformado por el poliovirus mediano (H5V) (Calabrese et al., 2011).

MÉTODOS

7.2.1- Producción de PECs de DS/QT

Los PECs de DS/QT fueron preparados por el método de gelificación ionotrópica descrito por Wen et al., 2012 (Liu, Jiao, Wang, Zhou, & Zhang, 2008; Wen, 2012).

Las soluciones de partida: DS y QT fueron preparadas en condiciones de esterilidad. El LMMDS, concentración final de 0,015% p/v, se disolvió en agua destilada y se ajustó el pH a 3,5 con una solución de HCl 0,2 M. Por su parte la solución de QT, concentración final de 0,05% p/v QT de bajo peso molecular, fue diluido en solución de ácido acético al 2% v/v, ajustada a pH 3,5 con HCl 0,2 M, con agitación constante y suave durante toda la noche a temperatura ambiente.

En el caso de los protocolos experimentales que requirieron PECs marcados con fluoresceína (PECs-FITC), se empleó el mismo protocolo de obtención de las soluciones de partida descrito anteriormente pero con empleo de QT marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sarmiento, Ribeiro, Veiga, & Ferreira, 2006). En esta ocasión la preparación de los PECs requirió de una parte de QT-FITC y cuatro partes de QT sin marcar. Nuevamente la solución de QT-FITC se mantuvo con agitación constante y suave a temperatura ambiente durante toda la noche y protegido de la luz.

Una vez obtenidas las soluciones de partida se procedió a la obtención de los PECs manteniendo las condiciones de esterilidad a lo largo de todo el protocolo experimental [Fig. 11]. La solución QT o QT-FITC (6 mL en ambos casos) fueron tomadas en una jeringa estéril, la cual fue luego colocada con su respectiva aguja sobre la bomba de infusión. El goteo controlado de esta solución (40 mL/h) fue realizado sobre un vaso de precipitado estéril, que contenía la solución acuosa de DS (10 mL), con agitación suave y constante. Terminado el goteo, la suspensión se agitó durante 15 min más y se filtró a través de un papel de filtro cualitativo (Ø 125 mm, Xinxing, Fuyang, Zhejiang, China), a un tubo Falcón de 50 mL, estéril. En todos los casos, una alícuota de 1 mL fue separada para la caracterización de los PECs en DLS.

En el caso particular de los PECs-FITC las muestras fueron conservadas al resguardo de la luz.



Figura 11. *Equipo para la síntesis de las PECs. Inyector y agitador magnético en el flujo horizontal.*

7.2.2- Caracterización de los PECs de DS/QT

Las mediciones de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) se realizaron con un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) equipado con un láser He-Ne (633 nm) y un corrector digital ZEN3600 [Fig. 12]. El análisis se realizó a una temperatura de 37°C, con un ángulo de dispersión de 173° con el haz incidente y una posición fija de luz láser de 4,65 mm. En DLS, la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada por las partículas, fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las mismas. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones genera el coeficiente de difusión de la partícula y, a partir de éste se determina el tamaño hidrodinámico.



Figura 12. *Equipo Zetasizer Nano ZS, con un láser He-Ne (633 nm) y un corrector digital ZEN3600*

Con esta técnica se mide la difusión de la partícula debido al movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de la misma. El parámetro calculado se define como el coeficiente de difusión translacional (D). El tamaño de la partícula se calcula a partir de dicho coeficiente mediante la Ecuación de Stokes-Einstein (1):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi nD} \tag{1}$$

Donde, d(H) es el diámetro hidrodinámico; D es el coeficiente de difusión translacional, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y n es la viscosidad. A partir de la función de correlación usando varios algoritmos, se obtiene el tamaño (Dh), la estimación del ancho de distribución, como una medida aproximada del grado de agregación (índice de polidispersión, PDI) y el potencial Z de los PECs DS/QT.

Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media \pm SD, de al menos 3 muestras (n=3) preparadas bajo condiciones idénticas y cada una de ellas es el resultado de al menos seis carreras. La estabilidad física de los PECs

DS/QT o DS/QT-FITC se determinó en la nanosuspensión almacenada a temperatura ambiente.

7.2.3- Cultivo de Células Endoteliales

Células derivadas del endotelio del corazón murino, transformadas por el poliovirus mediano T (H5V) (Calabrese et al., 2011) fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100 UI/mL de penicilina G sódica y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, en atmósfera controlada al 5% y 37 ° C. El medio se intercambió cada 48 hs hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70-80%, momento en que se separó el medio de cultivo enriquecido en productos de secreción celular y se cosecharon las células en presencia de una solución tripsina/EDTA 0,25 % P/V en medio DMEM.

7.2.4- Ensayos de Viabilidad

La viabilidad se determinó mediante:

(1) La técnica de exclusión del colorante vital azul tripán y posterior recuento en la cámara de Neubauer.

(2) El ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante para evaluar el número de células viables (Galluzzi et al., 2009). La viabilidad celular como medida indirecta de la citotoxicidad del DS y del HA fue evaluada sobre cultivos de H5V, a través de los dos métodos descriptos. Para lo cual se cultivaron las células en ausencia o en presencia de dosis crecientes de DS: 0, 5, 10, 20 y 50 µg/mL, o HA: 0, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL; en ambos casos durante 3 hs. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (n=3) y los resultados se analizaron por método estadístico no paramétrico Kruskal Wallis, se consideraron significativos aquellos resultados con $p < 0,05$.

7.2.5- Estudio de la Captación de los PECs-FITC con el Endotelio

Las células H5V fueron cultivadas sobre cubreobjetos, en las condiciones descritas en el ítem anterior. El estudio de la captación de los PECs-FITC se realizó sobre células H5V control (no tratadas) y células activadas por Lipopolisacárido Bacteriano (LPS) (1,5 µg/mL) durante 1 hora. Finalizada la activación endotelial, las células fueron sincronizadas durante 2 hs, mediante la incubación en medio DMEM libre de suero. Transcurrido ese tiempo, los cultivos celulares control y tratados fueron incubados con los PECs-FITC (10 µg/mL, según su concentración de DS) durante 15 min (Rasente et al., 2016). Una vez finalizado el período de incubación, las células fueron fijadas en porta objeto.

Las muestras fueron estudiadas con empleo del microscopio de contraste de fluorescencia e interferencia diferencial (DIC) Nikon (Eclipse Ti, Nikon Instruments, Melville, NY, EE.UU.), utilizando el software Micrometrics SE Premium y procesado con el software BioimageXD 1.0.

En el caso de las imágenes de fluorescencia confocal se obtuvieron mediante el microscopio confocal de escaneo láser Olympus FV300 (modelo BX61, Olympus Corp., Tokio, Japón) equipado con láseres Arand He-Ne para apertura numérica 1.4 60X en aceite de inmersión. Las imágenes se tomaron con el software de adquisición FluoView versión 3.3.

Se obtuvieron imágenes de fluorescencia de un mínimo de 10 campos de cada muestra, en secciones ópticas de 0,5 µm. Las imágenes se analizaron mediante los softwares ImageJ 1.42q e Image-Pro plus versión 4.5 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), para analizar la captación de los PECs (n=3).

7.2.6- Estudio de la Competencia de los PECs por los Receptores de Acido Hialurónico.

Las células H5V cultivadas sobre cubreobjetos, según la metodología descrita en el punto anterior, fueron sincronizadas por incubación durante 3 hs en medio DMEM libre de suero. Transcurrido ese período, los cultivos fueron incubados, en ausencia o en presencia de 37,5 µg/mL de DS o 50 µg/mL de HA, durante 15 min. Tras lo cual, se

incorporó PECs-FITC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de acuerdo con su concentración de DS). Luego, los preparados fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 20 min y se procedió al montaje.

Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de contraste de interferencia diferencial y confocal de fluorescencia de cada muestra (n=3).

7.2.7- Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado (n=3). Se utilizaron los programas estadísticos Infostat y GraphPad Prim 5. Los datos de los resultados de caracterización de los PECs DS/QT se expresan como media \pm DE. El análisis estadístico para los ensayos de viabilidad celular de las H5V con DS o HA se realizó mediante el test no paramétrico Kruskal Wallis, y se consideraron significativos aquellos resultados con $p < 0,05$.

RESULTADOS

8.1- Formulación y Estudio de las Características Fisicoquímicas de los Complejos de Polielectrolitos

Los PECs DS/QT y PECs-FITC se prepararon por el método de complejación de polielectrolitos como describe Rasente et al., 2016. Las muestras se caracterizaron por Dynamic Light Scattering (DLS) para determinar el tamaño (D_h), distribución de tamaño (PDI) y potencial zeta (potencial Z) ($n = 3$).

Los PECs y PECs-FITC producidos por el método de gelificación ionotrópica, exhibieron una distribución promedio del tamaño principal (D_h) de $451,7 \pm 49,5$ nm (100%) y un valor promedio de PDI de $0,375 \pm 0,045$. En todos los casos, el potencial Z de los PECs fue altamente positivo ($> +49$ mV) [Tabla I].

Tabla I. Caracterización de PECs y PECs-FITC por DLS ($n = 3$).

Muestra	Temperatura (°C)	Diámetro Hidrodinámico Promedio (D_h)		PDI (\pm S.D.)
		Pico 1 (nm) (\pm S.D.)	% Intensidad	
1	25	563,5 (29,8)	100,0 (0,0)	0,308 (0,057)
2	25	421,8 (43,8)	100,0 (0,0)	0,399 (0,042)
3	25	369,8 (75,0)	100,0 (0,0)	0,418 (0,036)

8.2- Estudio de la Interacción de PECs-FITC con el Endotelio Normal e Injuriado

Células H5V control y tratadas con LPS (luego de 3 hs de injuria) fueron incubadas en presencia de PECs DS/QT-FITC durante 15 min, según las condiciones descriptas en el ítem 7.2.6 de la sección de Materiales y Métodos. La concentración del

nanomaterial empleado fue equivalente al contenido de DS de 10 µg/mL (Rasente et al., 2012). Las imágenes obtenidas de las muestras a través de microscopía de contraste de interferencia diferencial y confocal de fluorescencia se muestran en la Figura 13. El puntillado homogéneo que se observó en las células control [Fig. 13; Panel A.1 y A.2], se intensificó en el grupo de las células activadas por LPS [Fig. 14; Panel B.1 y B.2].

Los resultados obtenidos sugieren que la injuria endotelial desencadena la activación celular, proceso que incrementa la captación de los PECs DS/QT.

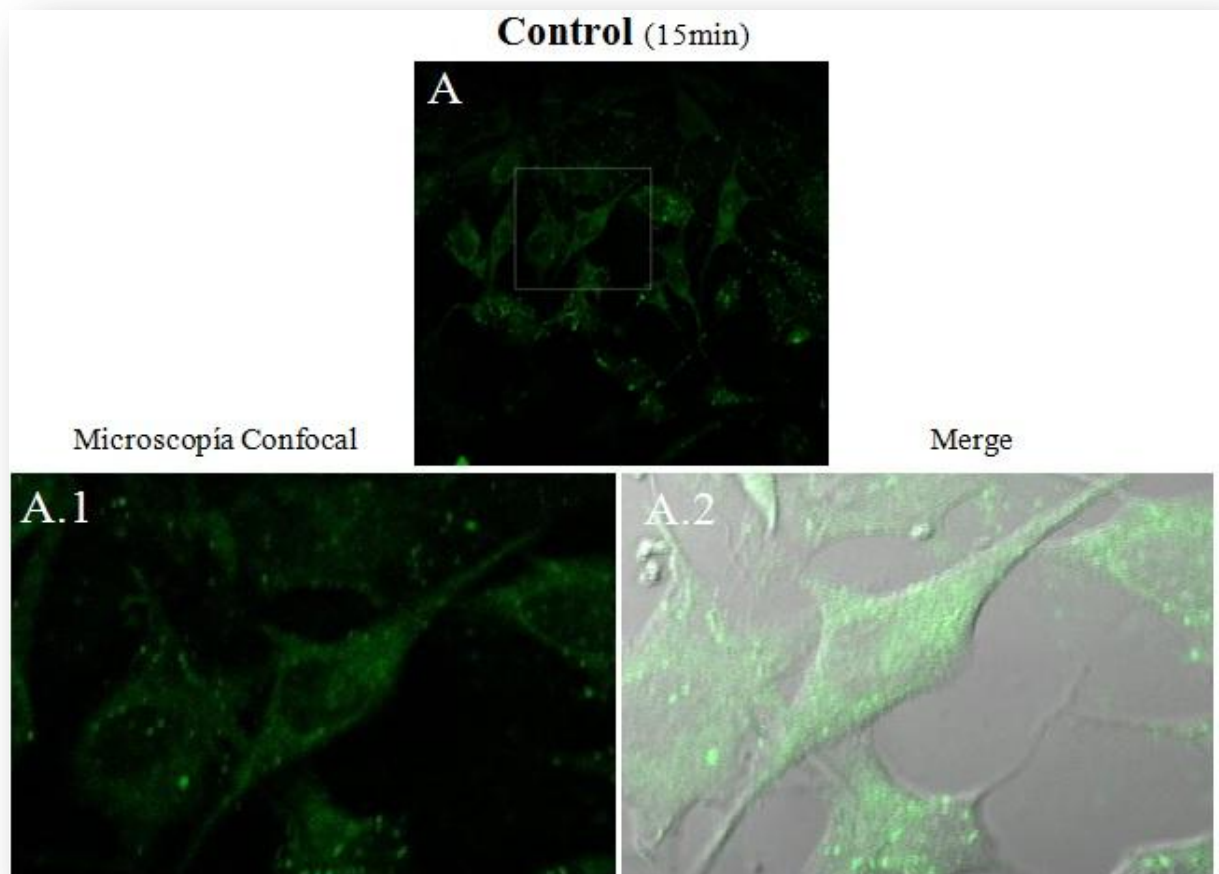


Figura 13 (A.1 y A.2). Las células H5V se incubaron en presencia de FITC-PECs (10 µg/mL) durante 15 min. Imágenes de microscopía de contraste de interferencia diferencial y confocal de fluorescencia de cada muestra (n=3). Escala de la barra: 100 µm.

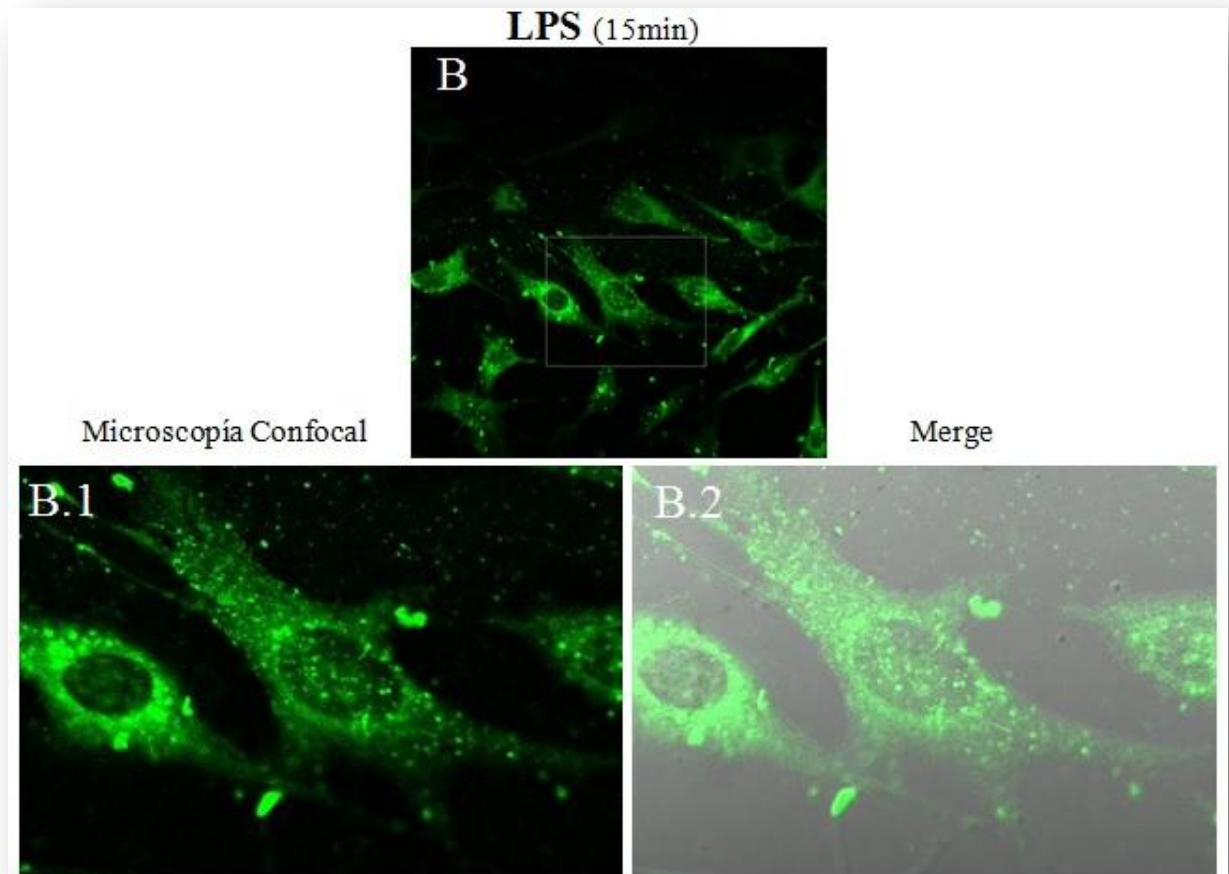


Figura 14 (B.1 y B.2). Las células H5V se incubaron en presencia de LPS ($1,5 \mu\text{g/mL}$) por 1 hora, y luego se trataron con PECs-FITC ($10 \mu\text{g/mL}$) durante 15 min. Imágenes de microscopía de contraste de interferencia diferencial y confocal de fluorescencia de cada muestra ($n=3$). Escala de la barra: 100 μm .

8.3- Estudio de la Participación de los Receptores de Acido Hialurónico en la Interacción entre PECs-FITC y las Células Endoteliales

8.3.1- Análisis de Citotoxicidad

La citotoxicidad del Acido Hialurónico y del Dermatan Sulfato fue evaluada mediante ensayos de MTT, según lo descrito en el ítem 7.2.4 (2) de la sección de Materiales y Métodos. Las células H5V se cultivaron en ausencia o en presencia, tanto de LMMDS (0-50

µg/mL) como de HA (0-100 µg/mL) durante 3 hs. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en cada punto (n=3) y los resultados se analizaron por método estadístico no paramétrico Kruskal Wallis, se consideraron significativos aquellos resultados con $p < 0,05$.

Se determinó que no hay diferencias significativas en la viabilidad celular de las CEs ($p > 0,05$) con las concentraciones usadas tanto de DS como de HA. La presencia de concentraciones crecientes de DS o de HA no afectó la viabilidad celular, bajo las condiciones experimentales del estudio [Fig.15] y [Fig.16].

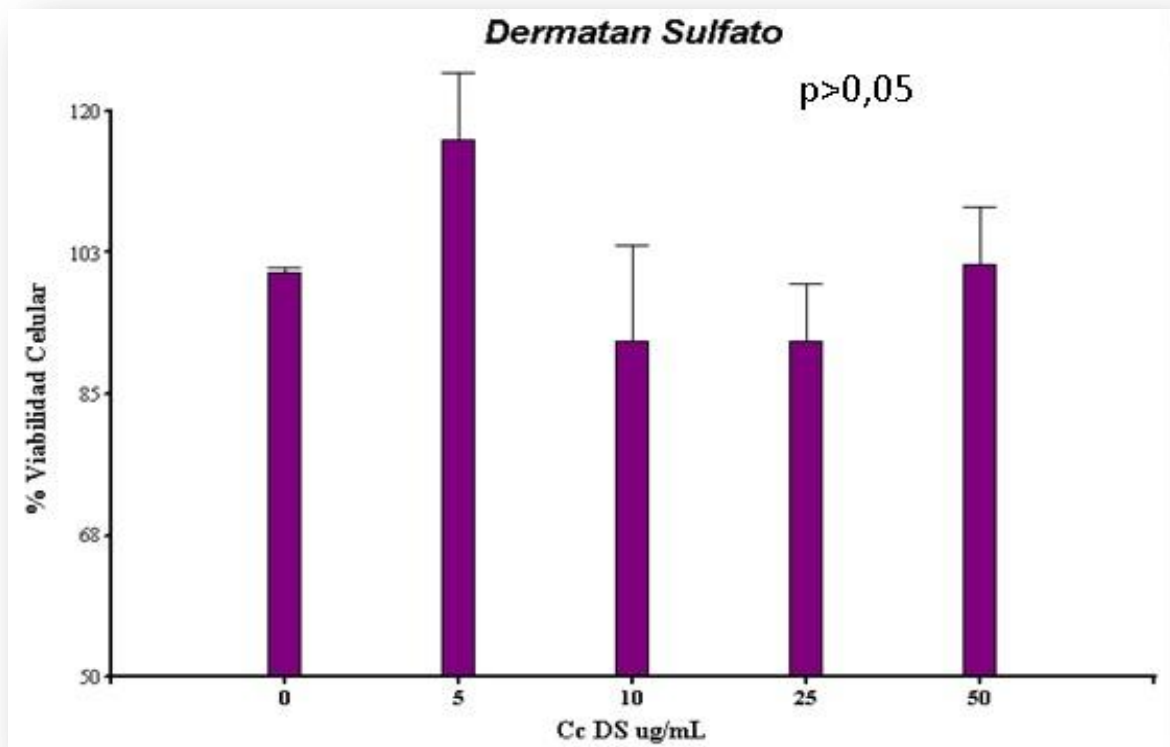


Figura 15. Ensayo de citotoxicidad MTT. Porcentaje de células H5V viables después de la incubación con LMMDS. Las células H5V se cultivaron en ausencia o en presencia de dosis crecientes de LMMDS (0-50 µg/mL), durante 3hs. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular ($p > 0,05$). (n=3, triplicado en cada punto).

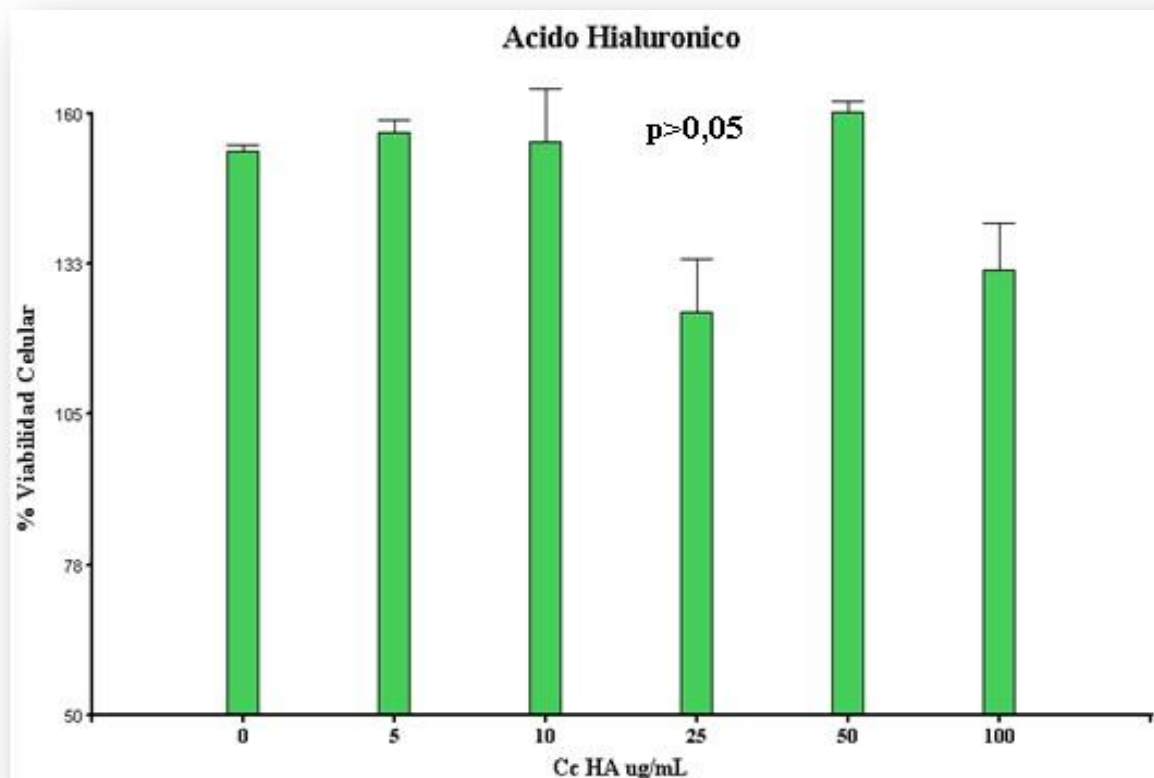


Figura 16. Ensayo de citotoxicidad MTT. Porcentaje de células H5V viables después de la incubación con HA. Las células H5V se cultivaron en ausencia o en presencia de dosis crecientes de HA (0-100 $\mu\text{g/mL}$), durante 3hs. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular ($p > 0,05$).

8.3.2- Estudios de Competición

Con el objeto de determinar la participación de los receptores de HA en la interacción de los PECs DS/QT, las células H5V fueron incubada utilizando concentraciones no citotóxicas intermedias en el rango analizado en el punto 8.3.1 para DS (37,5 $\mu\text{g/mL}$) o HA (50 $\mu\text{g/mL}$) [Fig. 15] y [Fig. 16] durante 15 min respectivamente.

El ligero puntillado distribuido dentro del límite celular observado en las células control [Fig 17, Panel A.1 y A.2], se observa que queda distribuido aleatoriamente entre las células [Fig.18, Panel B.1 y B.2] y [Fig.19; Panel C.1 y C.2].

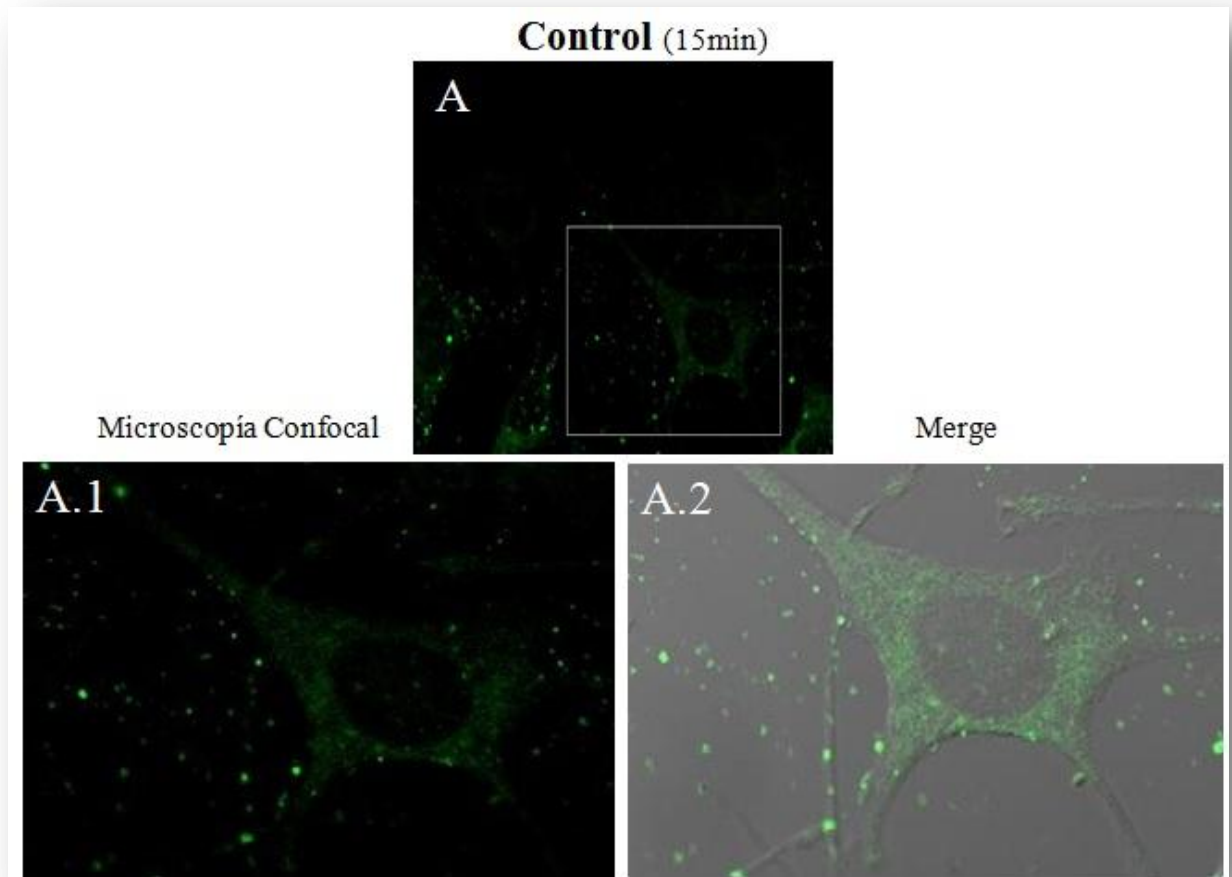


Figura 17 (A.1 y A.2). Estudio de la Competencia de los PECs por el receptor de HA. *Células H5V control, fueron tratadas con PECs DS/QT-FITC (10 µg/mL) durante 15 min. Se observa ligero puntillado distribuido dentro del límite celular en las células control. Imágenes de microscopía de contraste de interferencia diferencial y confocal de fluorescencia de cada muestra (n=3). Escala de la barra: 100 µm.*

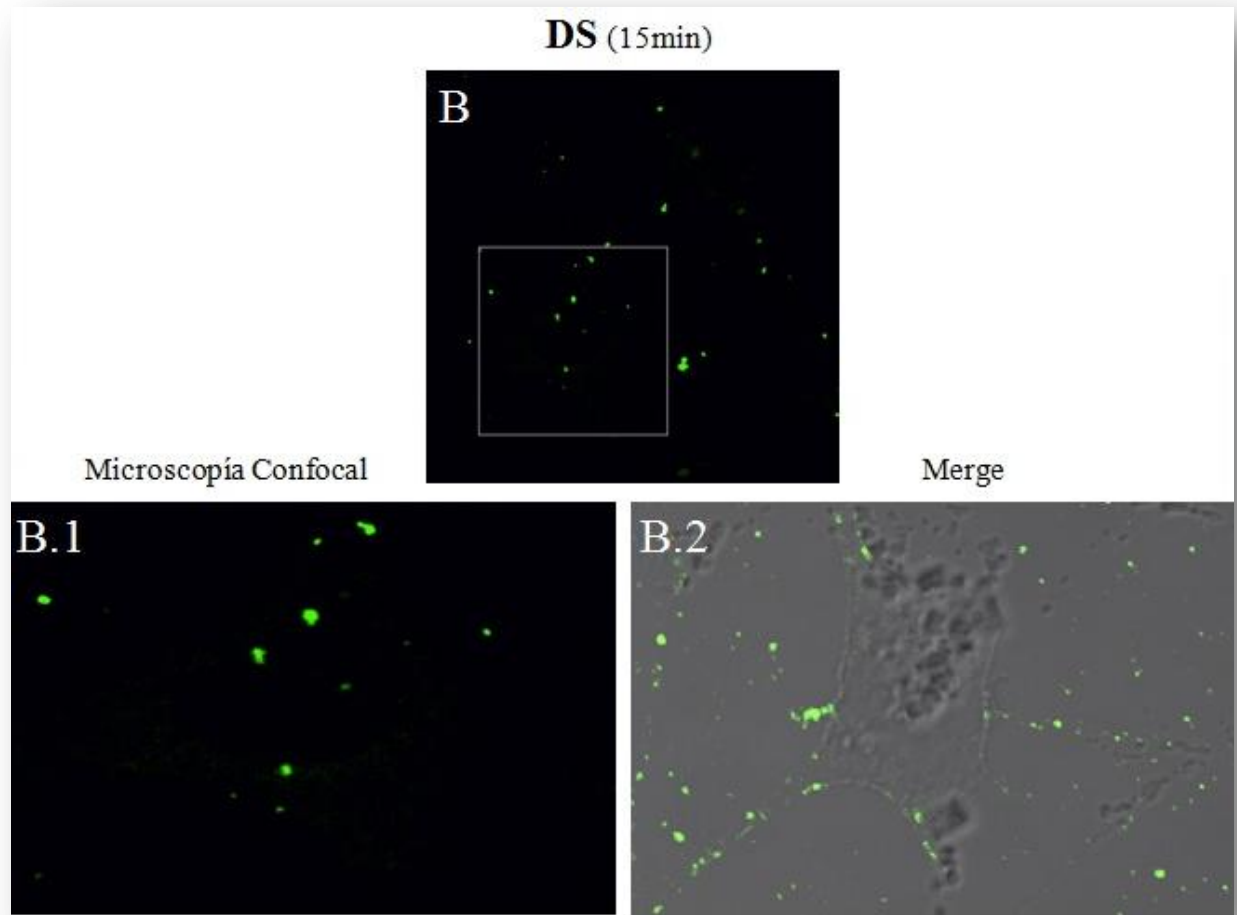


Figura 18 (B.1 y B.2). Estudio de la Competencia de los PECs por el receptor de HA. Células H5V incubadas en presencia de DS (37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fueron posteriormente tratadas con PECs DS/QT-FITC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 min. Se observa que el ligero puntillado queda distribuido aleatoriamente entre las células. Imágenes de microscopía de contraste de interferencia diferencial y confocal de fluorescencia de cada muestra ($n=3$).

Escala de la barra: 100 μm .

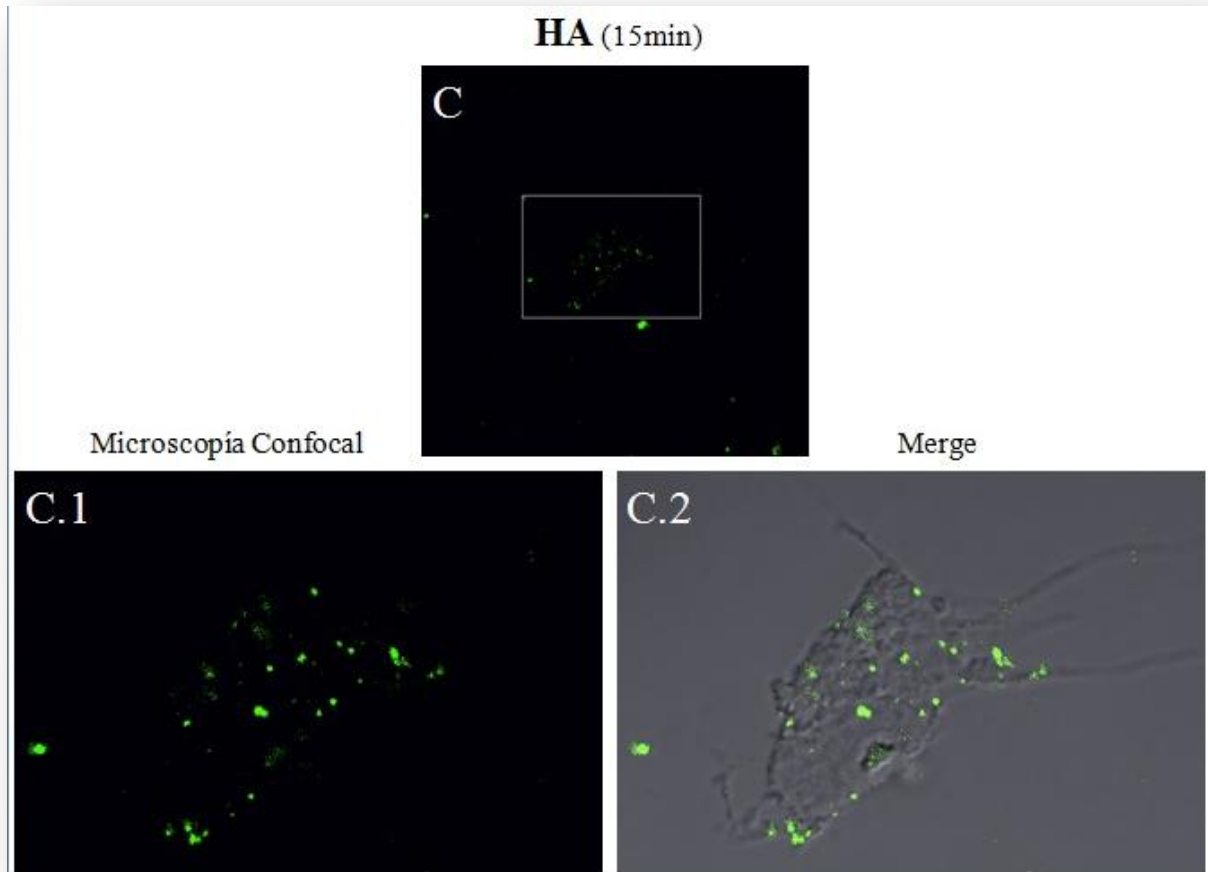


Figura 19 (C.1 y C.2). Estudio de la Competencia de los PECs por el receptor de HA. *Células H5V incubadas en presencia de HA (50 ug/ml), fueron posteriormente tratadas con PECs DS/QT-FITC (10 µg/mL) durante 15 min. Se observa que el ligero puntillado queda distribuido aleatoriamente entre las células. Imágenes de microscopía de contraste de interferencia diferencial y confocal de fluorescencia de cada muestra (n=3). Escala de la barra: 100 um.*

DISCUSIÓN

La aterosclerosis es la patología base de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares y es la principal causa de muerte mórbida en las sociedades modernas en las que culturalmente la población vive bajo mucho estrés, realiza poca actividad física, tiene preferencia por dietas hipercalóricas con alto consumo de alcohol y tabaquismo. A pesar de ser una patología que afecta la pared vascular, no existen hasta el momento, herramientas terapéuticas o de diagnóstico dirigidas directamente a identificar o tratar la disfunción y/o activación endotelial temprana que desencadena la enfermedad. Las terapias o estrategias farmacológicas actuales, están dirigidas a controlar, disminuir o tratar los factores de riesgo asociados a la patología vascular, como la hipertensión, la hiperglucemia o la hipercolesterolemia. Estos factores de riesgo, asociados al desarrollo de la enfermedad vascular, provocarían la activación de las células endoteliales y la consecuente ejecución del programa inflamatorio.

La Dra. Calabrese y colaboradores, han descripto la formulación de complejos de polielectrolitos (PECs), compuestos por un polianión natural como el dermatán sulfato (DS) y un polication, también natural, el quitosano (QT). Las características de los PECs DS/QT obtenidos exhibieron una distribución de tamaño bimodal con un pico mayor de 729 ± 11 nm (93%) y menor de 91 ± 11 nm (7%), siendo el valor PDI de $0,322 \pm 0,055$, y el potencial Z de los PECs, altamente positivo. También se determinó por análisis elemental el porcentaje (% p/p) de composición de C, H, N y S, para estimar la relación entre ambos polielectrolitos que hay en los PECs, y se estableció que el contenido relativo de QT:LMMDS era aproximadamente de 9:1. Además realizaron estudios *in vitro* en modelos murinos (H5V) y humanos (HUVEC), y de co-cultivo (H5V y Raw 264.7), en los que pudieron comprobar que los PECs DS/QT interaccionan con alta afinidad con el endotelio vascular (Rasente et al., 2016).

La formulación de estos PECs con DS y QT presenta importantes propiedades biológicas. Las cadenas de DS pueden aumentar la tasa de inhibición de la trombina por el Cofactor II de Heparina, considerando a la trombina como contribuyente pro-aterogénico capaz de influir en la coagulación, la quimioatracción y la proliferación celular; que le proporcionaría al tejido propiedades anti-aterogénicas, gracias al DS (Rasente, Egitto &

Calabrese, 2012; Tollefsen, 2010). También, se ha descrito que LMMDS puede inducir la entrada de las células en la fase S del ciclo celular, potenciando la actividad de la MMP-2, modulando la migración de las CEs mediante mecanismos independientes del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Rasente et al., 2012).

Por otra parte, el QT es un biopolímero natural, con característica mucoadhesiva natural, que presenta alta biocompatibilidad (Sosnik, dasNeves, & Sarmento, 2014), no es tóxico y es metabolizado por el cuerpo humano (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004).

También es interesante considerar desde las características fisicoquímicas de los PECs, a un parámetro como el potencial zeta (Z) de las NPs se utiliza comúnmente para caracterizar la carga superficial de ellas, es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática. Las NPs con un potencial Z por encima de ± 30 mV han demostrado ser estables en suspensión (Goldberg, 2007). En el caso de las PECs DS/QT que muestran un potencial Z positivos, esto se da por la adición del QT que no solo es capaz de dar el potencial Z positivo, sino que también de aumentar la eficiencia de encapsulación de moléculas hidrofílicas, como las proteínas. El QT también es un vehículo útil para fármacos moleculares, por la actividad antioxidante que presenta, debido a la capacidad de donación de hidrógeno que tiene el polímero (Younes y Rinaudo et al., 2015).

La sumatoria de las características fisicoquímicas, la alta afinidad por el endotelio vascular y las propiedades biológicas del DS, convierten a estos PECs en una novedosa y prometedora herramienta para el diagnóstico precoz y/o tratamiento de la aterosclerosis.

La aterosclerosis es una patología espacialmente no aleatoria, y temporalmente no lineal, que afecta regiones propensas del árbol arterial (Tabas, 2015). Algunos autores, sugieren que la mayor susceptibilidad o resistencia de los vasos sanguíneos al desarrollo de la placa ateromatosa, estaría asociada a cambios en la expresión génica, y en vías de señalización intracelular que desencadenan en el remodelado de la MECv (Talusán, 2005). Este remodelado cuali y cuantitativo, es una manifestación temprana de la disfunción endotelial. Estos cambios dinámicos, por ejemplo, en el patrón de expresión de los PGs y/o

modificaciones estructurales en las cadenas de los GAGs, impactarían sobre la accesibilidad de los PECs y las interacciones del nanomaterial con el ambiente biológico.

El presente proyecto analizó la interacción de los PECs DS/QT con células endoteliales vasculares normales e injuriadas, para comprender los mecanismos celulares que podrían mediar en el reconocimiento y la distribución del nuevo sistema nanoformulado.

Los PECs, formados por policationes y polianiones (Luo & Wang, 2014), son polímeros de cargas opuestas que permite la asociación espontánea con enlaces electroestáticos fuertes y reversibles, convirtiéndolos en un tipo de estructura ideal para la entrega de droga a la célula o tejido blanco (Thakker et al., 2014). La caracterización fisicoquímica obtenida por DLS de los PECs DS/QT, sintetizados por gelificación ionotrópica para este proyecto, exhibió un diámetro hidrodinámico principal (D_h) de $451,7 \pm 49,5$ nm (100%) y un valor promedio de PDI de $0,375 \pm 0,045$ ($n=3$) [Tabla I]. En todos los casos, el potencial Z de los PECs fue altamente positivo ($>+49$ mV). Estas nanoformulaciones marcadas con fluoresceína fueron aplicadas en estudios con células microvasculares murinas. El puntillado pequeño difuso, que se observó en las células endoteliales en las condiciones basales de cultivo, mostró un visible incremento, luego de la injuria endotelial producida por el LPS bacteriano [Fig. 12]. Estos resultados sugieren que no sólo los PECs DS/QT son capaces de interactuar con el endotelio vascular en las condiciones experimentales, sino que además son capaces de interactuar con el endotelio injuriado.

Varios receptores a HA modulan directa o indirectamente vías de señalización celulares, tal el caso de los receptores CD44, sobreexpresado tras la activación endotelial inducida en presencia de TNF- α (Mackay et al., 1993). También se considera a RHAMM, que interactúa con varias proteínas de señalización y del citoesqueleto, como Src, actina y con microtúbulos y también regula la actividad de ERK (Hamilton, 2007). Otro receptor a tomar en cuenta es el receptor a HA del tipo HARE, han sido descriptos como receptores del ácido hialurónico para endocitosis (Park, 2008), uno de los receptores scavenger (SR) para la depuración sistémica de los componentes de la matriz, liberados durante el recambio anormal o la síntesis en muchas situaciones patológicas, pocos estudios han examinado la señalización celular activada por estos productos de degradación de la matriz y sus efectos en las funciones celulares. La unión de HARE a algunos tamaños de HA,

aunque no a todos, puede estimular la señalización celular, lo que lleva a la activación de la expresión génica mediada por MAPK ERK 1/2 y NF- κ B. Ambas respuestas se producen de forma dependiente de la dosis y del tiempo. Analizando los tamaños de HA que pueden activar la señalización celular mediada por HARE, se ha encontrado que solo la captación HARE a HA de tamaño intermedio pequeño (40-400 kDa), activa las vías de señalización celular descendentes (Weigel, 2012). Aunque HARE se une y despeja para otros 12 ligandos también (distintos de HA y PS), incluidos los tipos Hep, DS y CS, y la LDL acetilada (AcLDL) (Pandey, 2014).

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, nos propusimos evaluar el rol del DS en la interacción de los PECs DS/QT con las células endoteliales.

Los resultados obtenidos muestran que cuando las células microvasculares murinas son incubadas con dosis altas no tóxicas de HA, previamente a la incorporación de los PECs marcados, no se observa el puntillado difuso sino que por el contrario, aparecen agregados fluorescentes extracelulares que quedan distribuidos aleatoriamente entre las células [Fig. 19, Panel C.1. y C.2]. Un resultado similar, al incubar las CEs con dosis altas no tóxicas de LMMDS, antes del tratamiento con los PECs-FITC [Fig. 18, Panel B.1. y B.2]. Los resultados obtenidos sugieren que el bloqueo de los receptores de HA, impide la interacción del nanomaterial. Consecuentemente podemos decir que la interacción específica de los PECs de DS/QT con las células endoteliales vasculares, dependería de la presencia de DS en la formulación del nanomaterial y sería mediada a través de los receptores celulares para HA y DS.

Numerosos autores han propuesto que la interacción del receptor HARE con sus ligandos induce la endocitosis del ligando HA por HARE estimula la vía de activación dependiente de ERK 1/2 de manera dosis y tiempo dependiente (Kyosseva, 2008). Por su parte, la interacción del DS activa la expresión de genes dependientes del factor transcripcional NF- κ B (Weigel, 2012). En este último caso, la activación del factor transcripcional es mediada por la degradación endógena de I κ B- α , mecanismo que no se evidencia cuando HARE interactúa con HA. Es importante notar que los sitios de interacción del receptor HARE para DS, son independientes de los sitios de unión de HARE con HA.

Considerando la teoría mencionada en el párrafo anterior, se considera que los receptores a HA o DS expresados en las CEs, podrían ser considerados como los responsables de la interacción y posterior endocitosis de los PECs DS/QT. Las vías de señalización activadas a través de la unión de los PECs a estos receptores contribuirían a la modulación de la respuesta inflamatoria generada frente a la injuria endotelial.

Todas estas consideraciones discutidas, hacen relevantes a los PECs DS/QT para su aplicación en el diagnóstico y tratamiento de la aterosclerosis, tomando en cuenta la actividad biológica que podría tener el DS sobre las células endoteliales como tratamiento anti-aterogénico en sí mismo, así también como la propiedad de los complejos para transporte de agentes terapéuticos anti-inflamatorios.

PERSPECTIVAS A FUTURO

El Laboratorio de Matriz Extracelular de la Cátedra de Biología Celular y Molecular en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA capitalizó los resultados obtenidos del presente proyecto, a través del estudio de la especificidad de unión de los PECs al endotelio humano (células endoteliales venosas de cordón umbilical humano; HUVEC) y macrófagos humanos. Demostrando, la unión específica de los polímeros a las células endoteliales a través del receptor CD44 y su posterior internalización celular. Asimismo, se ha reportado el empleo de los PECs como un novedoso sistema de distribución de un tetrapéptido anti-inflamatorio, en HUVEC. Estos trabajos fueron presentados recientemente en congresos nacionales a lo largo del año 2017.

Los resultados obtenidos in vitro hasta el momento; sugieren que los PECs de DS/QT constituirían una potencial y novedosa herramienta para el diagnóstico y tratamiento para la enfermedad vascular; potencialidad que requiere de la prosecución de trabajos in vivo.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente proyecto *in vitro* muestran que los PECs DS/QT fueron capaces de reconocer el endotelio normal e injuriado. Las moléculas de dermatán sulfato incluidas en la formulación de los complejos de polielectrolitos serían responsables de la interacción de los nanosistemas con el endotelio vascular, a través de receptores celulares superficiales para ácido hialurónico y dermatán sulfato, los cuales podrían ser responsables de esta interacción específica. El aporte de estos resultados a los otros ya publicados sugeriría que, de poder avanzar a estudios en animales y pacientes, el empleo de los PECs DS/QT podría ser una gran estrategia para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad vascular.

BIBLIOGRAFÍA

Adams R.H., Alitalo K. Molecular Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Nat Rev. Molec. Cell Biol.* **8**, 464–478 (2007).

Alexis F., Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molec. Pharmac.* **5**, 505–515 (2008).

Alexopoulou A.N., Multhaupt H.A, Couchman J.R. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 505–528 (2007).

Anggraeni V.Y. *et al.* Correlation of C4ST-1 and ChGn-2 expression with chondroitin sulfate chain elongation in atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res Commun* **406**, 36–41 (2011).

Aikawa M., Sivam P.N., Kuro-o M., Kimura K., Nakahara K., Takewaki S. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res* **73**, 1000-1012 (1993).

Arman M., Payne H., Ponomaryou T., Brill a. Role of Platelets in Inflammation. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 219–230 (2015).

Assmann V., Gillett C.E., Poulson R., Ryder K., Hart I.R., Hanby A.M. The pattern of expression of the microtubulebinding protein RHAMM/IHABP in mammary carcinoma suggests a role in the invasive behaviour of tumour cells. *Journal of Pathology* **195**, 191–196 (2001).

Baker A.B., Chatzizisis Y.S., Beigel R., Jonas M., Stone B.V., Coskun A.U. Regulation of heparanase expression in coronary artery disease in diabetic, hyperlipidemic swine. *Atherosclerosis* **213**, 436–442 (2010).

Baker A.B., Gibson W.J., Kolachalama V.B., Golomb M., Indolfi L., Spruell C. Heparanase regulates thrombosis in vascular injury and stent-induced flow disturbance. *J Am Coll Cardiol* **59**, 1551–1560 (2012).

Barreiro O., de la Fuente H., Mittelbrunn M., Sanchez-Madrid F. Functional Insights on the Polarized Redistribution of Leukocyte Integrins and their Ligands During Leukocyte Migration and Immune Interactions. *Immunology Review* **218**, 147–164 (2007).

Bastien M., Poirier P., Lemieux I., Després J.P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease. *Progress in Cardiovascular Diseases* **56**, 369–381 (2014).

Bergmeier W., Goerge T., Wang H.W. Mice Lacking the Signaling Molecule CalDAG-GEFI Represent a Model for Leukocyte Adhesion efficiency type III. *Journal of Clinical Investigations* **117**, 1699–1707 (2007).

Betty Y.S., Kim M.D., Rutka J.T., Warren C.W. Nanomedicine: Current Concepts. *New England Journal of Medicine* **363**, 2434-2443 (2010).

Bi Y., Ehrchiou D., Kilts T.M., Inkson C.A., Embree M.C., Sonoyama W., Li L., Leet AI., Seo B.M., Zhang L., Shi S., Young M.F. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* **10**, 1219-1227 (2007).

Blich M., Golan A., Arvatz G., Sebbag A., Shafat I., Sabo E. Macrophage activation by heparanase is mediated by TLR-2 and TLR-4 and associates with plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 56–65 (2013).

Blois S.M., Piccioni F., Freitag N., Tirado-González I. Angiogenesis Associated with Liver Fibrogenesis. *Angiogenesis Journal* **17**, 119–128 (2014).

Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).

Burke A.P., Kolodgie F.D., Farb A. Healed Plaque Ruptures and Sudden Coronary Death: Evidence that Subclinical Rupture has a Role in Plaque Progression. *Circulation* **103**, 934–940. (2008).

Cabello-Verrugio C., Brandan E. A novel modulatory mechanism of transforming growth factor-beta signaling through decorin and LRP-1. *J Biol Chem* **282**, 18842-18850 (2007).

Chen C.L., Hsieh Y.T., Chen H.C.. Adducin regulation. *J Cell Sci* **120**, 1157-1167 (2007).

Chen Q., Liang S., Thouas G.A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* **38**, 584– 671 (2013).

Chiang E.Y., Hidalgo A., Chang J., Frenette P.S. Imaging Receptor Microdomains on Leukocyte Subsets in Live Mice. *Nature Methods Journal* **4**, 219–222 (2007).

Christen, T., Delaite, J.-Y. & Camenzind, E. Subendocardial calcification leading to the fortuitous discovery of a rare coronary anomaly. *Clinical cardiology* **29**, 374 (2006).

Cote A.T., Harris K.C., Panagiotopoulos C., Sandor G.G., Devlin A.M. Childhood Obesity and Cardiovascular Dysfunction. *American College of Cardiology Journal* **62**, 1309–1319 (2013).

Cullere X., Shaw S.K., Andersson L., Hirahashi J., Lusinskas F.W., Mayadas T.N. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* **105**, 1950–1955 (2005).

Cui, X. Venous endothelial marker COUP-TFII regulates the distinct pathologic potentials of adult arteries and veins. *Sci. Rep.* **5**, 16193 (2015).

Day A.J., Prestwich G.D. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem* **277**, 4585-4588 (2008).

Davies J.R., Rudd J.H., Weissberg P.L. Molecular and Metabolic Imaging of Atherosclerosis. *Journal of Nuclear Medicine* **45**, 1898–1907 (2008).

Davies M.G., Fulton G.J., Hagen P.O. Clinical Biology of Nitric Oxide. *British Journal Surgery* **82**, 1598–1610 (2009).

Dekker R.J., Van Soest S., Fontijn R.D. Prolonged Fluid Shear Stress Induces a Distinct Set of Endothelial Cell Genes, Most Specifically Lung Kruppel-like Factor (KLF2). *Blood* **100**, 1689–1698 (2008).

Devaraj S., Rogers J., Jialal I. Statins and Biomarkers of Inflammation. *Current Atherosclerosis Report* **9**, 33–41 (2007).

Dichtl, W. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kB in endothelial cells. *Circ. Res.* **84**, 1085–1094 (1999).

Dimitroff C.J., Lee J.Y., Rafii S., Fuhlbrigge R.C., Sackstein R. CD44 is a major E-selectin Ligand on Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Journal of Cellular Biology* **153**, 1277–1286 (2008).

Drayton D.L., Liao S., Mounzer R.H., Ruddle N.H. Lymphoid Organ Development: from Ontogeny to Neogenesis. *Nature Immunology Journal* **7**, 344–353 (2007).

Du Souich P., García A. G., Vergés J., Montell E. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 1451–1463 (2009).

Durand M.J., Gutterman D.D. Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. *Microcirculation* **20**, 239–247 (2013).

Eiselein, L., Wilson, D. W., Lame, M. W. & Rutledge, J. C. Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H2745–2753 (2007).

Ellis I.R., Schor A.M., Schor S. EGF and TNF-alpha motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent processes. *Exp Cell Res* **313**, 732-741 (2007).

Falk E., Nakano M., Bentzon J.F., Finn A.V., Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J* **34**, 719–728 (2013).

Fassas A., Buffels R., Kaloyannidis P., Anagnostopoulos A. Safety of high-dose liposomal daunorubicin (daunoxome) for refractory or relapsed acute myeloblastic leukaemia. *British journal of haematology* **122**, 161–163 (2003).

Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Science* (2010).

Garcia-Cardena G, Gimbrone MA., Jr. Biomechanical Modulation of Endothelial Phenotype: Implications for Health and Disease. *Handbook of Experimental Pharmacology* **176**, 79–95 (2006).

Garcia-Garcia H.M., Azizi V., Kajita A.H. Cardiovascular Devices. *Nature Biomedical Engineering* **1**, 35 (2017).

Gimbrone M.A., Garcia-Cardena G. Vascular Endothelium, Hemodynamics, and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology* **22**, 9-15 (2013).

Glass C.K., Witztum J.L. Atherosclerosis : The Road Ahead Review. **104**, 503–516 (2001).

Goerge T., Ho-Tin-Noe B., Carbo C. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*. **111**, 4958–4964 (2008).

Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomat Sci*. **18**, 241-68 (2007).

Gosline J., Lillie M., Carrington E., Guerette P., Ortlepp C., Savage K. Elastic Protein: Biological Roles and Mechanical Properties. *Cambridge University Press*, 20-27 (2008).

Goueffic Y., Guilluy C., Guerin P., Patra P., Pacaud P., Loirand G. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation. *Cardiovasc Res* **72**, 339-348 (2006).

Grainger D.J., TGF- β and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* **74**, 213-222 (2007).

Hallmann R., Horn V., Selg M., Wendler O., Pausch F., Sorokin L. Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature, *Physiological Reviews* **88**, 979–1000 (2008).

Hamilton S.R., Fard S.F., Paiwand F.F. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 16667–16680 (2007).

Han J., Hiebert L.M. Alteration of endothelial proteoglycan and heparanase gene expression by high glucose, insulin and heparin. *Vascul Pharmacol* **59**, 112–118 (2013).

Hansson, G. K., Robertson, A.-K. L. & Söderberg-Nauclér, C. Inflammation and atherosclerosis. *Annual Review of Pathology* 297–329 (2006).

Hansson G.K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine* **352**, 1685–1695 (2005).

Harris E.N., Weigel P.H. The ligand-binding profile of HARE/Stabilin-2: hyaluronan and chondroitin sulfates A, C, and D bind to overlapping sites distinct from the sites for heparin, acetylated low-density lipoprotein and dermatan sulfate. *Glycobiology* **18**, 638–648 (2008).

Harris E.N., Parry S., Sutton-Smith M., Pandey M.S., Panico M., Morris H.R., Haslam S.M., Dell A., Weigel P.H. *Glycobiology* **20**, 991-1001 (2010).

Hartman J., Frishman W.H. Inflammation and Atherosclerosis: A Review of the Role of Interleukin-6 in the Development of Atherosclerosis and the Potential for Targeted Drug Therapy. *Cardiology in Review* **22**, 147-151 (2014).

Hatano H., Shigeishi H., Kudo Y. Overexpression of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in MC3T3-E1 cells induces proliferation and differentiation through phosphorylation of ERK1/2. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **30**, 293–303 (2012).

Hidalgo A., Peired A.J., Wild M.K., Vestweber D., Frenette P.S. Complete Identification of E-selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* **26**, 477–489 (2007).

Hoshiga M., Alpers C.E., Smith L.L., Giachelli C.M., Schwartz S.M. $\alpha v \beta 3$ integrin expression in normal and atherosclerotic artery *Circ Res* **77**, 1129 – 1135 (1995).

Hrachovinova I., Cambien B., Hafezi-Moghadam A. Interaction of P-selectin and PSGL-1 Generates Microparticles that Correct Hemostasis in a Mouse Model of Hemophilia A. *Nature Medicine Journal* **12**, 1020–1025 (2006).

Hufnagel, B. Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2Cbeta and induce apoptosis in endothelial cells. *Atherosclerosis* **180**, 245–254 (2005).

Huo Y., Ley K.F. Role of Platelets in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* **17**, 18–22 (2008).

Hurt-Camejo E. Interferon Gamma Binds to Extracellular Matrix Chondroitin-Sulfate Proteoglycans, Thus Enhancing its cellular response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1456–65 (1995).

Ivey M.E., Little P.J. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via PAR-1 and multiple downstream signalling pathways. *Thrombosis research* **123**, 288–97 (2008).

Järveläinen H., Wight T.N. Vascular proteoglycans. *Lung Biol Health Dis* **168**, 291-322 (2003)

Junqueira & Carneiro: Histología Básica, Texto y Atlas, 5^{ta} Edición ©Masson, Barcelona (2005).

Karamanos N.K., Linhardt R.J.. Special issue: proteoglycans: signaling, targeting and therapeutics: introduction. *FEBS J*, **280**, 2119-2123 (2013).

Kaufmann J.E., Oksche A., Wollheim C.B., Gunther G., Rosenthal W., Vischer U.M. Vasopressin-Induced Von Willebrand Factor Secretion from Endothelial Cells Involves V2 Receptors and cAMP. *Journal of Clinical Investigation* **106**, 107–116 (2008).

Kawakami, A. & Yoshida, M. Apolipoprotein CIII links dyslipidemia with atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **16**, 6–11 (2009).

Kenagy R.D., Fischerv J.W., Lara S., Sandy J.D., Clowes A.D., Wight T.N. Accumulation and loss of extracellular matrix during shear stress-mediated intimal growth and regression in baboon vascular grafts. *J Histochem Cytochem* **53**, 131-140(2005).

Koo A., Dewey Jr. C.F., Garcia-Cardena G. Hemodynamic shear stress characteristic of atherosclerosis-resistant regions promotes glycocalyx formation in cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **304**, 137–146 (2013).

Kooistra M.R., Corada M., Dejana E., Bos J.L. Epc1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett* **579**, 4966 – 4972 (2005).

Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **75**, 1–18 (2010).

Kyosseva S.V., Harris E.N., Weigel P.H. The hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) mediates hyaluronan-dependent signal transduction via extracellular signal-regulated kinases (ERK) *J. Biol. Chem.* **283**, 15047–15055 (2008).

Larsson C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* **18**, 276-284 (2006).

Leta G.C., Mourão P.S., Tovar A.M.F. Human venous and arterial glycosaminoglycans have similar affinity for plasma low-density lipoproteins. *Biochimica et biophysica acta* **1586**, 243–53 (2002).

Libby P., Schoenbeck U., Mach F., Selwyn A.P., Ganz P. Current Concepts in Cardiovascular Pathology: The role of LDL Cholesterol in Plaque Rupture and Stabilization. *American College of Cardiology Journal* **104**, 14S–8S (2008).

Libby P. History of discovery: Inflammation in atherosclerosis. *Atheroscler. Thromb. and Vasc. Biol.* **32**, 2045–2051 (2013).

Little P.J., Tannock L., Olin K.L., Chait A., Wight T.N. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor-1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 55– 60 (2002).

Little P.J. Genistein inhibits PDGF-stimulated proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle without blocking PDGF β receptor phosphorylation. *Archives of biochemistry and biophysics* **525**, 25–31 (2012).

Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* **60**, 1650–62 (2008).

Lundstam U., Hurt-Camejo E., Olsson G., Sartipy P., Camejo G., Wiklund O. Proteoglycans contribution to association of Lp(a) and LDL with smooth muscle cell extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1162-1167 (1999).

Lusis A.J., Mar R., Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 189–218 (2004).

Macri L., Silverstein D., Clark R.F. Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1366–1381 (2007).

Maiellaro K., Taylor W.R. The Role of the Adventitia in Vascular Inflammation. *Cardiovasc Res.* **75**, 640–648 (2012).

Matou-Nasri S., Gaffney J., Kummar S. Slevin M. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and α -adducin. *Inter Jour of Onc* **35**, 761-773 (2009).

Matsushita K., Morrell C.N., Cambien B. Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell Journal* **115**, 139–150 (2008).

Merrilees M.J., Beaumont B., Scott L.J. Comparison of deposits of versican, biglycan and decorin in saphenous vein and internal thoracic, radial and coronary arteries: correlation to patency. *Coron Artery Dis* **12**, 7-16 (2001).

Moreno M., Muñoz R., Aroca F., Labarca M., Brandan E., Larraín J. Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway. *EMBO J* **24**, 1397-1405 (2008).

Moreth K., Iozzo R.V., Schaefer L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle* **11**, 2084-2091 (2012).

Moulton S., Olsen B., Sonn S., Fukai N., Zurakowski D., Zeng X. Loss of Collagen XVIII Enhances Neovascularization and Vascular Permeability in Atherosclerosis. *Circulation* **112**, 1330–1336 (2006).

Murry C.E., Gipaya C.T., Bartosek T, Benditt E.P., Schwartz S.M. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol* **151**, 697-705 (1997).

Nakashima Y., Plump A.S., Raines E.W., Breslow J.L., Ross R. ApoE deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* **14**, 133–140 (1994).

Nakashima Y., Fujii H., Sumiyoshi S., Wight T.N., Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 1159–65 (2007).

Naor D., Vogt Sionov R., Ish-Shalom D. CD44: Structure, Function, and Association with the Malignant Process. *Advances in Cancer Research* (1997).

Napoli C., D'Armiento F.P., Corso G. Occurrence of the Same Peroxidative Compounds in Low Density Lipoprotein and in Atherosclerotic Lesions from a Homozygous Familial Hypercholesterolemic Patient. *International Journal of Cardiology* **62**, 77–85 (2008).

Nelson J.R., Wani O., May H.T., Budoff M. Potential benefits of eicosapentaenoic acid on atherosclerotic plaques. *Vascular Pharmacology* **91**, 1-9 (2017).

Norata, G. D. Gene expression and intracellular pathways involved in endothelial dysfunction induced by VLDL and oxidised VLDL. *Cardiovasc. Res.* **59**, 169–80 (2003).

Norata, G. D. Triglyceride-rich lipoproteins from hypertriglyceridemic subjects induce a pro-inflammatory response in the endothelium: Molecular mechanisms and gene expression studies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **40**, 484–94 (2006).

O'Brien K.D., Lewis K., Fischer J.W., Johnson P., Hwang J.Y., Knopp E.A., et al Smooth muscle cell biglycan overexpression results in increased lipoprotein retention on extracellular matrix: implications for the retention of lipoproteins in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **177**, 29-35 (2004).

O'Rourke M.F., Hashimoto J. Mechanical Factors in Arterial Aging. *American College of Cardiology Journal* **50**, 1-13 (2007).

Oberkersch R. Atheroprotective remodelling of vascular dermatan sulphate proteoglycans in response to hypercholesterolaemia in a rat model. *International journal of experimental pathology* (2014).

Olin K.L, Potter-Perigo S., Barrett P.H.R., Wight T.N., Chait A. Biglycan, a vascular proteoglycan, binds differently to HDL2 and HDL3. Role of ApoE. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 129-135 (2001).

Olsson, U., Bonjers, G. & Camejo, G. Fatty acids modulate the composition of extracellular matrix in cultured human arterial smooth muscle cells by altering the expression of genes for proteoglycan core protein. *Diabetes* **48**, 616–621 (1999).

Osman N. Smad2-dependent glycosaminoglycan elongation in aortic valve interstitial cells enhances binding of LDL to proteoglycans. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **22**, 146–55 (2013).

Palatini P., Casiglia E., Gąsowski J., Głuszek J., Wojciechowska W. Arterial Stiffness, Central Hemodynamics and Cardiovascular Risk in Hypertension. *Vascular Health Risk Management* **7**, 725-739 (2011).

Pandey M.S., Harris E.N., Weigel J.A., Weigel P.H. The cytoplasmic domain of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) contains multiple endocytic motifs targeting coated pit-mediated internalization. *J. Biol. Chem.* **283**, 21453–21461 (2008).

Pandey M.S., Baggenstoss B.A., Washburn J., Harris E.N., Weigel P.H. The hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) activates NF-κB-mediated gene expression in response to 40–400-kDa, but not smaller or larger, hyaluronans. *J. Biol. Chem.* **288**, 14068–14079 (2013).

Pandey M.S., Weigel P.H. A Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE) Link Domain N-Glycan Is Required for Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and Nuclear Factor-κB

(NF- κ B) Signaling in Response to the Uptake of Hyaluronan but Not Heparin, Dermatan Sulfate, or Acetylated Low Density Lipoprotein (LDL). *J of Biol Chem.* **289**,: 21807–21817 (2014).

Park S.Y., Jung M.Y., Kim H.J., Lee S.J., Kim S.Y., Lee B.H., Kwon T.H., Park R.W., Kim I.S. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ* **15**, 192–201 (2008).

Pearson J.D. Normal Endothelial Cell Function. *Lupus* **9**, 183–188 (2010).

Pentikäinen M.O., Oksjoki R., Öörni K., Kovanen P.T. Lipoprotein lipase in the arterial wall. Linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 211-217 (2002).

Pessanha B.S., Potter K., Kolodgie F.D., Farb A., Kutys R., Mont E.K., Burke A.P., O’Leary T.J., Virmani R. Characterization of Intimal Changes in Coronary Artery Specimens with MR Microscopy. *Radiology* **241**, 107–115 (2006).

Pradhan S., Sumpio B. Molecular and biological effects of hemodynamics on vascular cells. *Frontiers in Bioscience* **9**, 3276-3285 (2004).

Ranney D. Dermatan carriers for neovascular transport targeting, deep tumor penetration and improved therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **109**, 222–35 (2005).

Rao R.M., Yang L., Garcia-Cardena G. Endothelial-Dependent Mechanisms of Leukocyte Recruitment to the Vascular Wall. *Circulation Research Journal* **101**, 234–247 (2007).

Rasente R.Y., Imperiale J., Lázaro-Martínez J.M., Sosnik A., Calabrese G. Estudio de la interacción de complejos poliméricos de dermatán sulfato y quitosano con el endotelio

vascular. Congreso Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. Argentina, noviembre (2014).

Rocha V.Z., Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* **6**, 399–409 (2009).

Rondaj M.G., Bierings R., Kragt A., van Mourik J.A., Voorberg J. Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1002-1007 (2006).

Rondaj M.G., Bierings R., Kragt A., Van Mourik J.A., Voorberg J. Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **28**, 1002–1007 (2008).

Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* **340**, 115–126 (1999).

Rosenthal S.J., Chang J.C., Kovtun O., McBride J.R., Tomlinson I.D. Biocompatible Quantum Dots for Biological Applications. *Chem Biol* **18**, 10-24 (2013).

Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F., Ferreira D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **53**, 193–202 (2006).

Sarrazin S., Lamanna W.C., Esko J.D. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, (2011).

Schaefer L., Tsalastra W., Babelova A., Baliova M., Minnerup J., Sorokin L., Gröne H.J., Reinhardt D.P., Pfeilschifter J., Iozzo R.V., Schaefer R.M. Decorin-mediated regulation of

fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin. *Am J Pathol* **170**, 301-315 (2007).

Schaefer L., Iozzo R.V. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem.* **283**, 21305-21309 (2008).

Schaefer L., Iozzo R.V. Small leucine-rich proteoglycans, at the crossroad of cancer growth and inflammation. *Curr Opin Genet Dev* **22**, 56-58 (2012).

Sima A.V., Stancu C.S., Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell and tissue research* **335**, 191–203 (2009).

Slevin M., Kumar S., Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem* **277**, 41046-41059 (2002).

Slevin M., Krupinski J., Gaffney J., Matou S., West D., Delisser H., Savani R. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol* **26**, 58-68 (2007).

Sloop G.D., Weidman J.J., Shecterle L.M. The Interplay of Aging, Aortic Stiffness and Blood Viscosity in Atherogenesis. *Journal of Cardiology and Therapy* **4**, 350-354 (2015).

Smedby O. Geometric Risk Factors for Atherosclerosis in the Aortic Bifurcation: a Digitized Angiography Study. *Annals of Biomedical Engineering* **24**, 481–488 (2009).

Sociedad Argentina de Cardiología, Revista Argentina de Cardiología, Consenso de Prevención Cardiovascular, Vol **80** (2012).

Song S.J., Cool S.M., Nurcombe V. Regulated expression of syndecan-4 in rat calvaria osteoblasts induced by fibroblast growth factor-2. *J Cell Biochem* **100**, 402–411 (2007).

Song R. *et al.* Soluble biglycan induces the production of ICAM-1 and MCP-1 in human aortic valve interstitial cells through TLR2/4 and the ERK1/2 pathway. *Inflamm. Res.* **63**, 703–710 (2014).

Stenmark K.R. *et al.* The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol.* **75**, 23–47 (2013).

Steinbrecher U.P., Witztum J.L., Parthasarathy S., Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* **7**(2), 135-143 (1987).

Tabas I., Williams K. J., Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* **116**, 1832–44 (2007).

Tabas, I., Garcia-Cardena, G. & Owens, G. K. The cell biology of disease: recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell Biol.* **209**, 13–22 (2015).

Tacke F., Alvarez D., Kaplan T.J. Monocyte Subsets Differentially Employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to Accumulate Within Atherosclerotic Plaques. *Journal of Clinical Investigations* **117**, 185–194 (2007).

Takano M., Meneshian A., Sheikh E., Yamakawa Y., Bass Wilkins K., Hopkins E.A., Bulkley G.B. Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **283** (5), 2054-2061 (2002).

Talusan, P. Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1350–1357 (2005).

Tauran Y., Brioude A., Coleman A.W., Rhimi M., Kim B. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World J Biol Chem* **4(3)**, 35–63 (2013).

Tedgui A., Mallat Z., National I., Sante D. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiological Reviews* **86**, 515–581 (2006).

Telmer P.G., Tolg C., McCarthy J.B., Turley E.A. How does a protein with dual mitotic spindle and extracellularmatrix receptor functions affect tumor susceptibility and progression?. *Communicative and Integrative Biology* **4**, 182–185 (2011).

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 4–27 (2015).

Thorne R.F., Legg J.W., Isacke C.M. The role of CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci* **117**, 373-380 (2004).

Ting, H. J. *et al.* Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor-alpha. *Circ. Res.* **100**, 381–90 (2007).

Tolg C., Hamilton S.R., Nakrieko K.A. Rhamm^{-/-} fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skinwound repair,” *Journal of Cell Biology* **175**, 1017–1028 (2006).

Tran P.K., Tran-Lundmark K., Soininen R., Tryggvason K., Thyberg J., Hedin U. Increased intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation in transgenic mice with heparan sulfate-deficient perlecan. *Circ Res* **94**, 550-558 (2004).

Tran-Lundmark K., Tran P.K., Paulsson-Berne G., Friden V., Soininen R., Tryggvason K. Heparan sulfate in perlecan promotes mouse atherosclerosis: roles in lipid permeability, lipid retention, and smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* **103**, 43–52 (2008).

Tsai H.M. Microvascular Thrombosis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* **5**, 813–825 (2008).

Turley E.A., Naor D. RHAMM and CD44 peptides analytic tools and potential drugs. *Frontiers in Bioscience* **17**, 1775–1794 (2012).

Tuzcu E.M., Nicholls S.J. Targeting Inflammation by Lowering Low-Density Lipoprotein? *American College of Cardiology Journal* **49**, 2010–2012 (2007).

Vacas-Córdoba E., Maly M., De la Mata F.J., Gómez R. Antiviral mechanism of polyanionic carbosilane dendrimers against HIV-1. *Int J Nanomedicine* **11**, 1281–1294 (2016).

Van Hinsberg V.W., Engelse M.A., Quax P.H. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 716-728 (2006).

Van Gaal L.F., Mertens I.L., De Block C.E. Mechanisms Linking Obesity with Cardiovascular Disease. *Nature* **445**, 875–880 (2006).

Viklund L., Vorontsova N., Henttinen T., Salmivirta M. Syndecan-1 regulates FGF8b responses in S115 mammary carcinoma cells. *Growth Factors* **24**, 151–157 (2007).

Virmani R., Kolodgie F.D., Burke A.P., Farb A., Schwartz S.M. Lessons from sudden coronary death. A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1262–1275 (2000).

Virmani R., Kolodgie F.D., Burke A.P. Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to rupture: Angiogenesis is a source of Intraplaque Hemorrhage. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Journal* **25**, 2054–2061 (2005).

Wagenseil, J.E., Mecham R.P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* **89**, 957–989 (2009).

Wagner D., Frenette P.S. The Vessel Wall and its Interactions. *Blood* **111**, 5271-5281(2008).

Wang S. *et al.* Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J. Exp. Med.* **203**, 1519–1532 (2006).

Wang H.U., Chen Z.F., Anderson D.J. Molecular Distinction and Angiogenic Interaction Between Embryonic Arteries and Veins. *Cell* **93**, 741–753 (2008).

Wang, L. *et al.* Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis releases neutral and oxidized FFAs that induce endothelial cell inflammation. *J. Lipid Res.* **50**, 204–213 (2009).

Weigel P.H., Pandey M.S., Harris E.N. A HARE/STAB2-mediated sensing system to monitor tissue biomatrix homeostasis and stress. In Structure and Function of Biomatrix: Control of Cell Function and Gene Expression. *Matrix Biology Institute*, 293–314 (2012)

Weinbaum S., Tarbell J.M., Damiano E.R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**, 121–167 (2007).

Wen Y. *et al.* Delivery of Dermatan Sulfate from Polyelectrolyte Complex- Containing Alginate Composite Microspheres for Tissue Regeneration. *Biomacromolecules* **13**, 905–917 (2012).

Wight T.N., Kang I., Merrilees, M.J. Versican and the control of inflammation. *Matrix Biol.* **35**, 152–61 (2014).

Woollard K.J., Kling D., Kulkarni S., Dart A.M., Jackson S., Chin-Dusting J. Raised Plasma Soluble P-selectin in Peripheral Arterial Occlusive Disease Enhances Leukocyte Adhesion. *Circulation Research* **98**, 149–156 (2006).

Xu,J., Shi G.P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 2106–2119 (2014).

Yoshii Y., Okada Y., Sasaki S., Mori H., Oida K., Ishii H. Expression of Thrombomodulin in Human Aortic Smooth Muscle Cells with Special Reference to Atherosclerotic Lesion Types and Age Differences. *Med Electron Microsc* **36**, 165-172 (2003)

Yurchenco P.D. Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–27 (2011).

Yurdagul Jr A., Finney A.C., Woolard M.D., Orr A.W. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem. J.* **473**, 1281–1295 (2016).

Zago V., Gorzalczany S., Lucero D., Taira C. , Schreier L.. Role of HDL in neutralizing the VLDL effect on endothelial dysfunction. *Microvascular Research* **89**, 153–158 (2013).