

TESIS DOCTORAL

Nrf2 y Kv1.3, nuevos mediadores de la inflamación y el daño cardiovascular asociado a hipertensión

Autor:

Marta Martínez Casales

Director/es:

María Jesús Alonso Gordo
Raquel Hernanz Martín

Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

2022



TESIS DOCTORAL

Nrf2 y Kv1.3, nuevos mediadores de la inflamación y el daño cardiovascular asociado a hipertensión

Autor:

Marta Martínez Casales

Director/es:

María Jesús Alonso Gordo
Raquel Hernanz Martín

Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de

Doctorado

2022

Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2015-69294_R; PID2020-116498RB-I00), Instituto de Salud Carlos III (CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CB16.11.00286), y Universidad Rey Juan Carlos (Programa Propio de Fomento y Desarrollo de la Investigación. Convocatoria de financiación de Proyectos Puente de Investigación, 2020).

Lo que conocemos es una gota,
lo que no conocemos es un océano.
Isaac Newton (1643-1727)

La ciencia sirve para darnos una idea
de cuán vasta es nuestra ignorancia.
Robert De Lamennais (1782-1854)

Ningún pesimista descubrió jamás
los secretos de las estrellas,
ni navegó a una tierra inexplorada,
ni abrió las puertas de un nuevo paraíso
para ensanchar los horizontes del espíritu.
Hellen Keller (1880-1968)

A mis padres, Domi y Luisa.
A los que siguen estando conmigo,
aunque nos hayan dejado.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN/ABSTRACT	23
Resumen.....	25
Abstract	28
INTRODUCCIÓN	31
1. Conceptos generales	33
2. Estructura y función del sistema cardiovascular.....	34
2.1. Estructura de la pared vascular.....	34
2.2. Tipos de vasos sanguíneos	37
2.3. Factores que regulan el tono vascular	38
2.4. Alteraciones vasculares en hipertensión	49
2.5. Estructura y función cardíaca.....	53
2.6. Alteraciones cardíacas en hipertensión	55
3. Estrés oxidativo	57
3.1. Fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno	57
3.2. Estrés oxidativo en hipertensión.....	60
3.3. Sistemas antioxidantes.....	62
4. Sistema inmune e inflamación	72
4.1. Sistema inmune.....	72
4.2. Respuesta inflamatoria	75
4.3. Inflamación en hipertensión	76
5. Sistema renina-angiotensina (SRA)	78
5.1. SRA en hipertensión	80
6. Tratamiento de la hipertensión	81
6.1. Tratamientos existentes de la hipertensión.....	81
6.2. ITH13001	84
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	87
Hipótesis.....	89
Objetivos	90
Objetivo Principal	90
Objetivos Específicos.....	90
MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
1. Modelos animales y Aspectos Éticos.....	93
1.1. Ratones tratados con HsTX[R14A]	93

1.2.	Ratones knockout para Nrf2	94
1.3.	Ratones tratados con ITH13001	95
2.	Obtención de tejidos y macrófagos peritoneales	96
3.	Cultivo de células endoteliales	97
4.	Cultivo de células musculares lisas vasculares	97
5.	Experimentos de reactividad vascular	97
5.1.	Efectos vasoactivos de ITH13001	99
5.2.	Incubación ex vivo de segmentos aórticos con medios condicionados de macrófagos 101	101
6.	Estudio de las propiedades estructurales y mecánicas de arterias mesentéricas	101
6.1.	Estudios de miografía de presión	101
6.2.	Estudio de la distribución de núcleos por microscopía confocal	103
6.3.	Organización de la lámina elástica interna	104
7.	Estudio de las propiedades estructurales de aorta	104
8.	Estudio de hipertrofia del ventrículo izquierdo	104
9.	Estudio de hipertrofia de los cardiomiocitos	105
10.	Detección de la producción de malondialdehído en plasma	105
11.	Detección in situ de la producción de O_2^-	105
12.	Medida de la actividad NAD(P)H oxidasa	106
13.	Medidas de liberación de NO	106
14.	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	107
15.	Extracción de proteína y Western Blot (WB)	108
16.	Inmunocitoquímica de los canales $K_v1.3$ en macrófagos peritoneales	110
17.	Análisis de datos y estadística	111
	RESULTADOS	113
	Capítulo 1. Papel de los canales $K_v1.3$ en las alteraciones vasculares en hipertensión	115
1.	Efecto de Angiotensina II sobre la expresión de los canales $K_v1.3$ a nivel vascular..	115
2.	Efecto del tratamiento con HsTX[R14A] sobre la presión arterial	116
3.	Efecto del tratamiento con HsTX[R14A] sobre el remodelado vascular	117
4.	Efecto del tratamiento con HsTX[R14A] sobre la rigidez vascular	118
5.	Efecto del tratamiento con HsTX[R14A] sobre la función vascular	119
6.	Efecto de Angiotensina II sobre la expresión de los canales $k_v1.3$ en células endoteliales 121	121
7.	Efecto de Angiotensina II sobre la expresión de los canales $K_v1.3$ en el tejido adiposo perivascular y sobre la infiltración de macrófagos	121
8.	Efecto del tratamiento con HsTX[R14A] sobre el fenotipo de los macrófagos	124

9. Papel de los canales $K_v1.3$ sobre la disfunción endotelial inducida por macrófagos	124
Capítulo 2. Papel de Nrf2 en las alteraciones cardiovasculares en hipertensión	127
1. Efecto de la delección de Nrf2 en la presión arterial.....	127
Efecto de la delección de Nrf2 en el estrés oxidativo plasmático	127
2. Efecto de la delección de Nrf2 en las alteraciones cardíacas en hipertensión.....	128
3. Efecto de la delección de Nrf2 en las alteraciones vasculares en hipertensión	132
Capítulo 3. Efecto de ITH13001 sobre las alteraciones cardiovasculares en hipertensión ..	147
1. Efecto del tratamiento con ITH13001 sobre la presión arterial.....	147
2. Efecto del tratamiento con ITH13001 sobre el estrés oxidativo plasmático	147
3. Efecto del tratamiento con ITH13001 sobre las alteraciones cardíacas en hipertensión	148
4. Efecto del tratamiento con ITH13001 sobre las alteraciones vasculares en hipertensión	153
5. Efecto del tratamiento con ITH13001 sobre el fenotipo de los macrófagos	166
6. Efecto de ITH13001 en la activación de Nrf2	167
DISCUSIÓN.....	171
Capítulo 1. Papel de los canales $K_v1.3$ en las alteraciones vasculares en hipertensión	173
Capítulo 2. Papel de Nrf2 en las alteraciones cardiovasculares en hipertensión	178
Capítulo 3. Efecto de ITH13001 sobre las alteraciones cardiovasculares en hipertensión ..	187
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	199
Conclusiones	201
Conclusions	203
BIBLIOGRAFÍA.....	205

ABREVIATURAS

ACh:	acetilcolina
Ang:	angiotensina
ARA-II:	antagonistas de los receptores de Ang II
ARE:	elementos de respuesta a antioxidantes
AT₁R/AT₂R:	receptor de angiotensina II tipo 1/2
ATP:	adenosín trifosfato
BB:	beta-bloqueantes
BCC:	bloqueadores de los canales de calcio
CBP:	proteína de unión a CREB
CDDO:	ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11)-dien-28-oico
Células NK:	células <i>Natural Killer</i>
CH:	cardiopatía hipertensiva
CHD6:	chromo ATPasa/helicasa 6
CMLV:	células musculares lisas vasculares
CNC:	<i>cap 'n' collar</i>
CO:	monóxido de carbono
COX:	ciclooxigenasa
cPGES:	PGE ₂ sintasa citosólica
CSA:	<i>cross-sectional area</i> , área de la sección transversal
CTR:	extremo C-terminal
CYP450:	citocromo P450
DAF-2:	diaminofluoresceína
DAMPs:	patrones moleculares asociados a daño
DATS:	trisulfuro de dialilo
dAUC:	diferencia del área bajo la curva
DEA-NO:	dietilamin NONOato
DHE:	dihidroetidio
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF:	dimetilfumarato
DMSO:	dimetilsulfóxido
DOCA:	acetato de desoxicorticosterona
ECA:	enzima convertidora de angiotensina
ECE:	enzima convertidora de endotelina
ECV:	enfermedades cardiovasculares
EDHF:	factores hiperpolarizantes derivados de endotelio

EET:	ácidos epoxieicosatrienoicos
EGCG:	epigallocatequina-3-galato
EGF:	factor de crecimiento epidérmico
eNOS:	óxido nítrico sintasa endotelial
EpRE:	elementos de respuesta a electrófilos
ER:	estrés reductivo
ERK:	kinasa regulada por señales extracelulares
ET:	endotelina
GCs:	guanilato ciclasa soluble
GPCRs:	receptores acoplados a proteínas G
GPx:	glutación peroxidasa
GR:	glutación reductasa
GSH:	glutación
GSK-3:	glucógeno sintasa kinasa 3
GST:	glutación S-transferasa
H₂O₂:	peróxido de hidrógeno
H₂S:	sulfuro de hidrógeno
HDAC3:	histona deacetilasa 3
HO:	hemoxigenasa
HVI:	hipertrofia del ventrículo izquierdo
ICAM-1:	molécula de adhesión intracelular 1
IECA:	inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IFNγ:	interferón gamma
IL:	interleukina
iNOS:	óxido nítrico sintasa inducible
Keap1:	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KHS:	solución de Krebs-Henseleit
K_v:	canales de potasio dependientes de voltaje
LOX:	lipoxigenasa
LPS:	lipopolisacárido bacteriano
Maf:	<i>muscle aponeurotic fibrosarcoma</i>
MAPKs:	proteínas kinasas activadas por mitógenos
MCP-1:	proteína quimiotáctica de monocitos 1 (=CCl ₂ : ligando 2 de quimiocina)
MDA:	malondialdehído
MEC:	matriz extracelular

MIP-1β:	proteína inflamatoria de macrófagos-1 beta
mPGES:	PGE ₂ sintasa de membrana
NEP:	endopeptidasa neutra
NLR:	<i>NOD-like receptor</i> , receptor similar al NOD
nNOS:	óxido nítrico sintasa neuronal
NO:	óxido nítrico
NOD:	dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NOS:	óxido nítrico sintasa
NQO1:	NAD(P)H quinona reductasa 1
Nrf2:	factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
NTR:	extremo N-terminal
O₂⁻:	anión superóxido
OH[·]:	radical hidroxilo
ONOO⁻:	peroxinitrito
PAS:	presión arterial sistólica
PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA:	paraformaldehído
PG:	prostaglandinas
PGI₂:	prostaglandina I ₂ o prostaciclina
Phe:	fenilefrina
PI₃K:	fosfatidilinositol 3-kinasa
PKC:	proteína kinasa C
PKG:	proteína kinasa G
PNC:	péptido natriurético C
PRPs:	receptores de reconocimiento de patrones
PVAT:	<i>perivascular adipose tissue</i> , tejido adiposo perivascular
qRT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RE:	retículo endoplasmático
ROS:	especies reactivas de oxígeno
RPC:	respuesta universal de peligro celular
RXRα:	receptor X retinoide alfa
SMRT:	mediador de silenciamientos de los receptores retinoides y tiroideos
SNA:	sistema nervioso autónomo
SNC:	sistema nervioso central
SNE:	sistema nervioso entérico

SNS:	sistema nervioso simpático
SOD:	superóxido dismutasa
SRA:	sistema renina angiotensina
TBA:	ácido tiobarbitúrico
tBHQ:	tert-butil-hidroquinona
tBQ:	tert-butil-quinona
TBS-T:	solución salina tamponada con Tris y Tween
TCA:	ácido tricloroacético
TLR:	receptores tipo Toll
TNFα:	factor de necrosis tumoral alfa
TP:	receptor de tromboxano
Trx:	tiorredoxin reductasa
TXA₂:	tromboxano A ₂
VCAM-1:	molécula de adhesión vascular 1
WGA:	aglutinina de germen de trigo
WT:	<i>wall thickness</i> , espesor de la pared
WT:	<i>wild type</i> , salvaje
XDH:	xantina deshidrogenasa
XO:	xantina oxidasa
β-TrCP:	repeticiones de β -transducina

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

La hipertensión es uno de los principales factores de riesgo que predisponen para diversas enfermedades cardiovasculares, como la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular o la insuficiencia renal, las cuales son la principal causa de muerte en el mundo. La hipertensión se considera una enfermedad inflamatoria crónica con elevados niveles de citoquinas y enzimas proinflamatorias, además de acumulación de células inflamatorias a nivel vascular y en otros tejidos, lo que facilita la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduciendo a estrés oxidativo; estos procesos participan en el desarrollo de las alteraciones funcionales y estructurales a nivel cardíaco y vascular que caracterizan a la hipertensión, entre las que destacan la disfunción endotelial, la rigidez vascular o el remodelado vascular y cardíaco.

Los canales de potasio dependientes de voltaje $K_v1.3$ participan en la regulación de la función y proliferación de las células inmunes y de las células musculares lisas vasculares (CMLV), de manera que se postulan como mediadores de la inflamación o el estrés oxidativo asociados con la hipertensión arterial. Además, su participación en la proliferación de las CMLV puede tener un papel en el remodelado vascular en la patología hipertensiva. Por ello, en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral se estudia la participación de los canales $K_v1.3$ en el desarrollo de hipertensión, así como en el estado inflamatorio y en las alteraciones vasculares asociadas a esta patología.

Como se ha comentado, el estrés oxidativo es un importante mediador en las alteraciones cardiovasculares que acontecen en la hipertensión, por lo que los mecanismos que participan en el mantenimiento del equilibrio redox pueden contribuir a reducir los efectos deletéreos causados por las ROS. Entre ellos, destaca el factor nuclear Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-related factor-2*), un factor sensible a estrés oxidativo cuya activación induce la transcripción de genes que codifican para distintas proteínas implicadas en la defensa antioxidante, además de presentar efectos antiinflamatorios, por lo que puede mejorar las alteraciones presentes en hipertensión. El segundo capítulo de esta Tesis Doctoral evalúa la modulación del desarrollo de hipertensión por parte de Nrf2, así como su participación en el estado inflamatorio, el estrés oxidativo y las alteraciones cardiovasculares que se producen en la patología hipertensiva.

La hipertensión arterial es una enfermedad con una alta prevalencia. De los pacientes hipertensos que se encuentran bajo tratamiento farmacológico, solo el 30-35% de ellos tienen la presión arterial controlada; de manera que es necesario el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la hipertensión y la reducción del daño causado en sus órganos diana. ITH13001 es un nuevo compuesto derivado de melatonina con actividad inductora de Nrf2, además de propiedades antioxidantes independientes de esta inducción. En el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral se estudia el efecto de ITH13001 en la hipertensión y las alteraciones cardiovasculares asociadas.

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la implicación de $K_v1.3$ y Nrf2 en el daño cardiovascular asociado a la hipertensión y su contribución al estrés oxidativo y la inflamación que tienen lugar en esta patología. Para ello, se han llevado a cabo experimentos en ratones C57BL/6J hipertensos por infusión de angiotensina II (Ang II, 1,44 mg/Kg/día, 14 días). En concreto, se han utilizado tres modelos experimentales: 1) ratones tratados con el inhibidor selectivo del canal $K_v1.3$ HsTX[R14A] (100 µg/Kg/cada 2 días, sc), 2) ratones deficientes en Nrf2, y 3) ratones tratados con ITH13001 (1 mg/Kg/día, ip). En los tejidos procedentes de estos

animales se estudiaron los cambios en la función y las propiedades mecánicas vasculares, la estructura vascular y cardíaca, así como los mecanismos moleculares subyacentes.

Los principales hallazgos de este trabajo son:

1. Ang II incrementa la expresión de los canales $K_v1.3$ en aorta, en el tejido adiposo perivascular (PVAT) y en macrófagos peritoneales, favoreciendo en estos últimos su polarización hacia el fenotipo proinflamatorio M1. El bloqueo de $K_v1.3$ no previene la hipertensión ni el remodelado vascular; sin embargo, disminuye la infiltración de macrófagos en el PVAT y la producción por éstos de compuestos derivados de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de citoquinas proinflamatorias, como interleukina-1 beta (IL-1 β). Mediante este mecanismo, el bloqueo de los canales $K_v1.3$ mejora la función endotelial, de manera que se identifican los canales $K_v1.3$ como nuevos mediadores de la disfunción endotelial dependiente de macrófagos en hipertensión.
2. La delección de Nrf2 no altera la estructura del ventrículo izquierdo ni modifica los niveles basales de ROS, aunque incrementa los mediadores inflamatorios cardíacos; a nivel vascular, la ausencia de este factor de transcripción produce estrés oxidativo, reduciendo los niveles de NO y llevando al desarrollo de disfunción endotelial en aorta. La deficiencia de Nrf2 no afecta al desarrollo de hipertensión inducida por Ang II, a pesar de que previene el estrés oxidativo plasmático, cardíaco y vascular. En corazón, la ausencia de Nrf2, aunque no modifica la inflamación inducida por Ang II, previene el desarrollo de hipertrofia y fibrosis, lo que se asocia a la reducción del estrés oxidativo, así como al aumento de la expresión de HO-1. A nivel vascular, la ausencia de Nrf2 previene la disfunción endotelial en aorta de animales hipertensos, mediante la reducción del estrés oxidativo y el aumento de la biodisponibilidad de NO y de la expresión de HO-1. En arterias mesentéricas de resistencia, la delección de Nrf2 previene el remodelado y la rigidez vascular; sin embargo, no se evita la pérdida de células endoteliales ni la disfunción endotelial inducidas por Ang II, lo que podría explicar que tampoco modifique el desarrollo de hipertensión.
3. El tratamiento con ITH13001 previene parcialmente el desarrollo de hipertensión inducida por Ang II, además de la hipertrofia y fibrosis cardíaca, la rigidez vascular y la disfunción endotelial. Estos efectos se asocian con la prevención del estrés oxidativo plasmático, cardíaco y vascular, que se acompaña de la reducción de la expresión y la actividad de la NAD(P)H oxidasa y el aumento en la biodisponibilidad de NO. Además, el tratamiento con ITH13001 reduce la inflamación cardíaca y vascular inducidas por Ang II, y previene la polarización de los macrófagos hacia su fenotipo proinflamatorio M1. Aunque ITH13001 activa Nrf2 en VSMC, tras el tratamiento de animales hipertensos con este compuesto no se observa la activación de este factor de transcripción a nivel cardíaco o vascular, por lo que los efectos beneficiosos de ITH13001 podrían deberse a su actividad antioxidante y antiinflamatoria, siendo independientes de la activación de Nrf2.

En resumen, los resultados de esta Tesis Doctoral indican que los canales de potasio dependientes de voltaje $K_v1.3$ presentes en macrófagos son nuevos mediadores de la disfunción endotelial asociada a hipertensión, de manera que los bloqueadores de $K_v1.3$ se postulan como candidatos potenciales para el tratamiento de esta patología.

Por otra parte, la delección de Nrf2, aunque no modifica el desarrollo de hipertensión ni la inflamación observada en esta patología, puede activar mecanismos compensatorios, como HO-1, que reducen el estrés oxidativo, previniendo así el desarrollo de alteraciones cardiovasculares que tienen lugar en esta patología, tales como hipertrofia y fibrosis cardíacas o la disfunción endotelial.

Por último, debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, ITH13001 previene el desarrollo de hipertensión, así como la hipertrofia y la fibrosis cardíaca, la rigidez vascular y la disfunción endotelial asociadas a esta patología. Por todo ello, este compuesto puede ser un buen candidato para el tratamiento de hipertensión.

ABSTRACT

Hypertension is one of the main predisposing risk factors for various cardiovascular diseases, such as ischemic heart disease, stroke, and kidney failure, which are the main cause of death in the world. Hypertension is considered a chronic inflammatory disease with elevated levels of proinflammatory cytokines and enzymes, in addition to accumulation of inflammatory cells at vascular level and in other tissues, which induce the production of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress; these processes participate in the development of the functional and structural alterations of the heart and vasculature that characterize hypertension, among others endothelial dysfunction, vascular stiffness or vascular and cardiac remodeling.

K_v1.3 voltage-dependent potassium channels are involved in the regulation of immune and vascular smooth muscle cells (VSMC) function and proliferation, so they are postulated to account for the inflammation or oxidative stress associated with hypertension. Furthermore, their involvement in VSMC proliferation may play a role in vascular remodeling in the hypertensive pathology. Therefore, in the first chapter of this Doctoral Thesis we study the participation of K_v1.3 channels in the development of hypertension and the associated inflammatory state and vascular alterations.

As mentioned, oxidative stress is an important mediator of the cardiovascular alterations that occur in hypertension; therefore, the mechanisms involved in maintaining redox balance can contribute to reduce the deleterious effects caused by ROS. Among these mechanisms, highlights the nuclear factor Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor-2), an oxidative stress sensitive transcription factor which activation induces antioxidant and anti-inflammatory effects, then improving the alterations observed in hypertension. The second chapter of this Doctoral Thesis evaluates the participation of Nrf2 in hypertension as well as in the inflammatory state, oxidative stress and cardiovascular alterations that occur in the hypertensive pathology.

Hypertension is a high prevalence disease. Among diagnosed hypertensive patients under pharmacological treatment, only 30-35% of them have the blood pressure under control; then, development of new drugs for the treatment of hypertension and the reduction of end organ damage is necessary. ITH13001 is a new melatonin-derived compound with Nrf2-inducing activity, as well as antioxidant properties independent of this induction. In the third chapter of this Doctoral Thesis, the effect of ITH13001 on hypertension and the associated cardiovascular alterations is analyzed.

The main objective of this work has been to study the involvement of K_v1.3 and Nrf2 in the cardiovascular damage associated with hypertension and their contribution to the oxidative stress and inflammation that occur in this pathology. For this purpose, we performed experiments in C57BL/6J hypertensive mice by infusion with angiotensin II (Ang II, 1.44 mg/kg/day, 14 days). Specifically, three different models were used: 1) mice treated with the selective K_v1.3 channel blocker HsTX[R14A] (100 µg/Kg/ every second day, sc), 2) Nrf2-deficient mice, and 3) mice treated with ITH13001 (1 mg/Kg/día, ip). Changes in vascular function and mechanical properties, vascular and cardiac structure, as well as the underlying molecular mechanisms were studied.

The main findings of this study are as follows:

1. Ang II increases $K_v1.3$ channels expression in aorta, perivascular adipose tissue (PVAT) and peritoneal macrophages, inducing the polarization of these towards the proinflammatory M1 phenotype. Blockade of $K_v1.3$ does not prevent either hypertension or vascular remodeling; however, it decreases macrophage infiltration in PVAT and the production by these immune cells of cyclooxygenase-2 (COX-2)-derived compounds and proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 beta (IL-1 β). Through this mechanism, blockade of $K_v1.3$ channels improves endothelial function; then, we identify $K_v1.3$ channels as novel mediators of macrophage-dependent endothelial dysfunction in hypertension.
2. Nrf2 deletion does not alter either left ventricle structure or basal ROS levels, although it increases cardiac inflammatory mediators; at vascular level, the absence of this transcription factor produces oxidative stress, reducing NO levels which leads to endothelial dysfunction in aorta. The deficiency of Nrf2 does not affect Ang II-induced hypertension, but it prevents plasma, cardiac and vascular oxidative stress. Although the absence of Nrf2 does not modify Ang II-induced inflammation in the heart, it avoids hypertrophy and fibrosis development; these effects are associated with reduction of oxidative stress and increased HO-1 expression. At vascular level, the deletion of Nrf2 prevents endothelial dysfunction in aorta of hypertensive animals by reducing oxidative stress and increasing NO bioavailability as well as HO-1 expression. In mesenteric resistance arteries, deletion of Nrf2 prevents vascular remodeling and stiffness; however, it does not prevent the loss of endothelial cells or endothelial dysfunction induced by Ang II, which might explain the lack of effect on hypertension development.
3. Treatment with ITH13001 partially prevents Ang II-induced hypertension, cardiac hypertrophy and fibrosis, vascular stiffness, and endothelial dysfunction. These effects are associated with the prevention of plasma, cardiac and vascular oxidative stress, related to a reduction in the expression and activity of NAD(P)H oxidase and an increase in NO bioavailability. In addition, ITH13001 treatment decreases Ang II-induced cardiac and vascular inflammation and prevents the polarization of macrophages towards their proinflammatory M1 phenotype. Although ITH13001 activates Nrf2 in VSMC, after treatment of hypertensive animals with this compound we did not observe activation of this transcription factor in heart and vasculature; therefore, the beneficial effects of ITH13001 seem to be due to its antioxidant and anti-inflammatory activity, being independent of Nrf2 activation.

In summary, the results of this Doctoral Thesis indicate that $K_v1.3$ voltage-dependent potassium channels present in macrophages are new mediators of endothelial dysfunction associated with hypertension; then, $K_v1.3$ blockers are postulated as potential candidates for the treatment of this pathology.

On the other hand, Nrf2 deletion, although does not modify either blood pressure or inflammation observed in hypertension, can activate compensatory mechanisms, such as HO-1, which reduce oxidative stress; thus, it prevents cardiovascular alterations development that occur in this pathology, such as cardiac hypertrophy and fibrosis or endothelial dysfunction.

Finally, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, ITH13001 reduces hypertension and prevents the associated cardiac hypertrophy and fibrosis, vascular stiffness and endothelial

dysfunction. Therefore, this compound may be a good candidate for the treatment of hypertension.

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTOS GENERALES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo, calculándose que en 2015 representaron un 31% de las muertes registradas, con la muerte de 17,7 millones de personas (OMS, 2017).

La **hipertensión arterial** es una patología cardiovascular que se caracteriza por niveles elevados de presión arterial continuados en el tiempo. Los valores óptimos de presión arterial para un adulto serían <120 mm Hg para la presión arterial sistólica (PAS) y <80 mm Hg para la presión arterial diastólica (PAD) (120/80). Nos referimos a hipertensión cuando la PAS es igual o superior a 140 mm Hg y/o la PAD igual o superior a 90 mm Hg, aunque estos límites pueden variar en función de la edad o de la presencia de otros problemas concomitantes, como enfermedad renal o diabetes (Williams et al., 2018).

La hipertensión es el factor de riesgo cardiovascular más común asociado con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en el mundo, originando, en muchos casos, una mortalidad prematura (Dinh et al., 2014; OMS, 2021). Esta patología constituye un trastorno grave que incrementa de manera significativa el riesgo de sufrir otras enfermedades como cardiopatías, encefalopatías o nefropatías (OMS, 2021), además de haberse evidenciado la relación entre el aumento prematuro de los valores de presión arterial con un aumento del riesgo de deterioro cognitivo y demencia (Williams et al., 2018).

En general, se distingue entre dos tipos de hipertensión arterial, primaria o esencial y secundaria, constituyendo la hipertensión arterial esencial el 95% de los casos (Kumar et al., 2020). La hipertensión es una patología con una elevada prevalencia mundial, la cual se va incrementando, de modo que en 2015 la padecían 1130 millones de personas. De estos pacientes, aproximadamente el 40% recibe tratamiento, teniendo únicamente controlada la enfermedad un 35% de ellos, suponiendo, de esta manera, un problema de salud importante en la sociedad (Williams et al., 2018). En España, la hipertensión afecta a una gran cantidad de personas, habiendo un importante porcentaje de pacientes hipertensos aún sin diagnosticar. Informes de 2016 mostraron que el 42,6% de la población adulta española mayor de 18 años es hipertensa, porcentaje que es mayor en varones (49,9%) que en mujeres (37,1%). De los pacientes diagnosticados en nuestro país, el 88,3% toma tratamiento farmacológico y solo el 30% de ellos tiene la presión arterial controlada (Menéndez et al., 2016). Sin embargo, a pesar de su alta prevalencia y de las numerosas investigaciones llevadas a cabo, la etiología de esta enfermedad sigue siendo en gran medida desconocida. Lo que sí se conoce es que se trata de una enfermedad multifactorial, resultante de la interacción entre factores genéticos, fisiológicos y ambientales (Kumar et al., 2020).

La hipertensión se considera una enfermedad inflamatoria crónica, que se asocia con niveles elevados de marcadores proinflamatorios como citoquinas y enzimas proinflamatorias, entre las que encontramos ciclooxigenasa-2 (COX-2), interleukina-6 (IL-6), IL-1 beta (IL-1 β) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Álvarez et al., 2007; Dinh et al., 2014). Esta inflamación facilita la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduciendo a estrés oxidativo, el cual también contribuye al desarrollo de inflamación, generándose así un “circulo vicioso” entre ambos procesos, los cuales llevan a alteraciones en los órganos diana de esta patología (Martínez-Revelles et al., 2013; Touyz et al., 2020). Así, produce alteraciones cardíacas, como el deterioro de la función contráctil, fibrosis e hipertrofia (Tsutsui et al., 2011), y alteraciones vasculares como la disfunción endotelial y la incrementada resistencia vascular periférica que

caracteriza esta patología (Savoia and Volpe, 2011; Dinh et al., 2014; Norlander et al., 2018; Caillon et al., 2019). Asimismo, la inflamación y el estrés oxidativo también contribuyen a las alteraciones estructurales y mecánicas vasculares que se producen en la hipertensión (Hernanz et al., 2014).

Un factor importante en el desarrollo de la hipertensión es la activación del sistema renina angiotensina (SRA), donde la angiotensina II (Ang II) es su principal péptido efector. Ang II, actuando a través de su receptor AT₁R, está asociada con crecimiento celular, inflamación, vasoconstricción, apoptosis y producción de componentes de la matriz extracelular (MEC) y de ROS (Kim et al., 2011; Savoia and Volpe, 2011); además, Ang II también está implicada en el reclutamiento de monocitos y otras células inflamatorias en el corazón, la vasculatura y los riñones en la hipertensión (Rucker and Crowley, 2017).

Debido al papel del estrés oxidativo en las alteraciones asociadas a la hipertensión, los mecanismos que contribuyen al mantenimiento del equilibrio redox, como el factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), pueden tener un importante papel en la reducción de los efectos deletéreos causados por las ROS. Además, la activación de Nrf2 tiene efecto antiinflamatorio y mejora las alteraciones presentes en hipertensión, como la disfunción endotelial (Chen et al., 2015; Satta et al., 2017).

Por otra parte, los canales de potasio dependientes de voltaje K_v1.3 participan en la regulación de la función y proliferación de células inmunes y de las células musculares lisas vasculares (CMLV) (Pérez-García et al., 2018), de manera que se postulan como mediadores de la inflamación o el estrés oxidativo asociados a la hipertensión arterial. Además, mediante su participación en la proliferación de las CMLV, pueden estar implicados en el remodelado vascular, el cual juega un papel importante en la patología hipertensiva al modificar las propiedades estructurales y mecánicas de los vasos sanguíneos.

En esta introducción se hará una revisión de los diferentes mecanismos que contribuyen a las alteraciones cardiovasculares observadas en la hipertensión, así como la participación de la inflamación, el estrés oxidativo y sistemas antioxidantes, como Nrf2, en ellas.

2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR

2.1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR

Los vasos sanguíneos son los conductos encargados de transportar la sangre por todo el organismo. Aunque su estructura varía en función del tipo de vaso y del órgano irrigado, existe una organización básica común a todos ellos, la cual consiste en tres capas o tunicas bien diferenciadas: la capa interna (*tunica intima*), la capa media (*tunica media*) y la capa adventicia (*tunica externa*). Estas capas están organizadas en componentes celulares y MEC (**Figura 1**).

- **Capa interna (*Tunica intima*):** se trata de la capa más fina, formada por una monocapa de células endoteliales que está en contacto directo con la sangre; descansa sobre una membrana basal y una fina MEC subendotelial compuesta de colágeno y elastina (Brown et al., 2017; Gao, 2017). El endotelio vascular tiene múltiples funciones, incluyendo propiedades sintéticas y metabólicas, como la regulación de la coagulación, la modulación del tono vascular y el flujo sanguíneo, y la regulación de respuestas inmunes

e inflamatorias mediante el control de las interacciones de las células del sistema inmune con el vaso (Sumpio et al., 2002).

- **Capa media (*Tunica media*):** está formada por capas de CMLV espaciadas de manera equidistante y dispuestas de forma concéntrica dentro de una MEC rica en elastina y colágeno, encontrándose esta capa delimitada por láminas elásticas (Brown et al., 2017; Gao, 2017). El músculo de la capa media es el encargado de proporcionar la fuerza mecánica a los vasos, ajustar las oscilaciones del flujo sanguíneo y mantener el tono vascular, lo cual está modulado por factores contráctiles y relajantes liberados por el endotelio y la adventicia (González et al., 2001; Pocock and Richards, 2005; Brown et al., 2017).
- **Capa adventicia (*Tunica externa*):** está separada de la capa media mediante la lámina elástica externa. Se trata de la capa más compleja y heterogénea de la pared vascular, compuesta de fibras elásticas y colágeno, orientadas longitudinalmente al vaso, que lo protegen y lo mantienen fijo en su posición; además, contiene fibroblastos, fibras nerviosas y células inmunomoduladoras, como macrófagos o células dendríticas (Stenmark et al., 2013; Gao, 2017; Tresguerres et al., 2020). Inicialmente se pensaba que su única función era de soporte; sin embargo, existen evidencias de que también tiene un papel en la regulación del tono vascular actuando como principal “tejido sensor de lesiones” de la pared vascular y liberando diferentes factores en respuesta a ellas (González et al., 2001; Stenmark et al., 2013).
- **Matriz extracelular (MEC):** la MEC es un gel viscoelástico que sirve de soporte a las células vasculares, además de determinar la elasticidad y las propiedades mecánicas de los vasos. Sin embargo, esta no es su única función, ya que, además, la MEC vascular proporciona señales que inducen, definen y estabilizan los fenotipos celulares vasculares, existiendo muchos ejemplos de moléculas de la MEC que desempeñan papeles críticos en la regulación de la expresión génica al interactuar con receptores específicos en las células y al unirse y almacenar factores de crecimiento que influyen en la función celular (Wagenseil and Mecham, 2009). Los componentes principales de la MEC son el colágeno y la elastina, que van a ser sintetizados por diferentes tipos celulares de la pared vascular; el colágeno se encarga de conferir resistencia a la pared y la elastina de las propiedades elásticas del vaso (Wagenseil and Mecham, 2009). El colágeno es una proteína muy rígida que limita la distensión de los vasos; sin embargo, también interactúa con las células vasculares desempeñando importantes funciones en la biología y patobiología celular, participando, por ejemplo, en la diferenciación, adhesión, migración, proliferación y apoptosis de las CMLV. Existen al menos 24 subtipos diferentes de colágeno, aunque en la pared arterial predominan el colágeno tipo I y tipo III (Xu and Shi, 2014). Una excesiva cantidad de colágeno puede llevar a fibrosis y a un incremento en la rigidez vascular, por lo que es necesaria la presencia de enzimas encargadas de su degradación, principalmente metaloproteinasas de la matriz (MMP), para mantener unos niveles adecuados de esta proteína (Xu and Shi, 2014).

La elastina es el elemento dominante en la MEC arterial y es el principal componente de las fibras elásticas, constituyendo, aproximadamente, el 90% de su peso. Las fibras elásticas se encuentran principalmente en la capa media vascular, donde se disponen en láminas elásticas fenestradas concéntricas, contribuyendo estas fenestras a las

propiedades elásticas de estas láminas (Xu and Shi, 2014). La elastina también juega un papel en la adhesión y migración celular y participa en la señalización celular (Halper and Kjaer, 2014). Además de colágeno y elastina, la MEC tiene otros componentes como glicoproteínas (fibronectina, laminina, fibrinógeno o tenascina, entre otros), proteoglicanos (hialuronano, decorina, versicano o perlecano) o integrinas (Halper and Kjaer, 2014).

- **Tejido adiposo perivascular (PVAT, *Perivascular Adipose Tissue*):** Los grandes vasos están rodeados directamente por diversas cantidades de tejido adiposo, conocido como tejido adiposo perivascular, o PVAT por sus siglas en inglés, el cual está en contacto muy estrecho con la adventicia. En el caso de los vasos pequeños y los microvasos, los adipocitos están presentes como parte integrante de la capa adventicia (Gao, 2017). Al igual que otros tejidos adiposos, el PVAT puede secretar una amplia gama de moléculas bioactivas que influyen en la contractilidad vascular, la proliferación y el estado inflamatorio de los vasos sanguíneos (Gao, 2017); así, un PVAT sano ejerce acciones anticontráctiles y antiinflamatorias mediante la liberación de adipocitoquinas como adiponectina, NO y omentina, mientras que un PVAT disfuncional producirá más adipocitoquinas proinflamatorias, como leptina, resistina, IL-6, IL-1 β , TNF α o proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), contribuyendo a la disfunción vascular (Rami et al., 2022). Además, el PVAT no solo contiene adipocitos, sino también células inmunes como macrófagos, subconjuntos de células T, células *natural killer* (NK) y células dendríticas, vasos linfáticos, nervios perivascuales y células estromales que influyen en las acciones mencionadas (Guzik et al., 2007; Omar et al., 2014; Moore et al., 2015; Wensveen et al., 2015). Por ello, durante las últimas décadas se ha hecho evidente que las señales originadas por las células adiposas perivascuales desempeñan un papel esencial en la regulación del desarrollo vascular y su fisiología, el remodelado de la pared vascular, la defensa inmunitaria y las enfermedades vasculares (Hu and Xu, 2011; Majesky et al., 2011; Omar et al., 2014; Psaltis and Simari, 2015), como la aterosclerosis o la hipertensión (Rajshaker et al., 2010; Rami et al., 2022), en las cuales su participación se debe, en parte, a la liberación de citoquinas proinflamatorias.

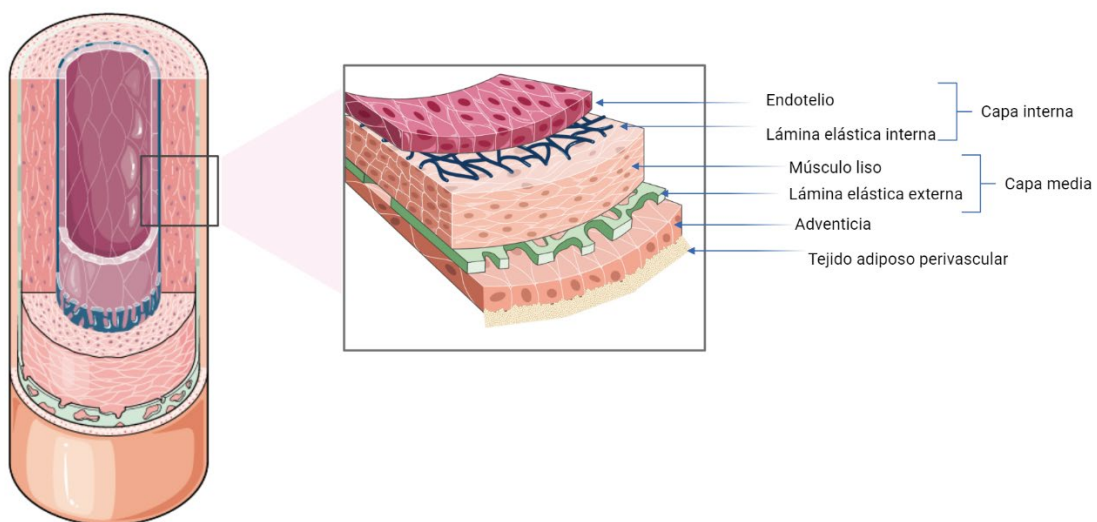


Figura 1. Estructura básica de la pared arterial. Modificada de smart.servier.com. Creada con BioRender.com

2.2. TIPOS DE VASOS SANGUÍNEOS

Existen diferentes tipos de vasos sanguíneos entre los que están las arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas.

Las **arterias sistémicas** son vasos sanguíneos que desempeñan un papel fundamental llevando sangre oxigenada y nutrientes a los distintos órganos de nuestro cuerpo. Existen tres tipos de arterias con diferentes características de su capa media y diferentes funciones (Gao, 2017; Tucker et al., 2021):

- Arterias elásticas o arterias de conductancia: dentro de ellas encontramos la aorta. Estas arterias son las más grandes del cuerpo, se encuentran más cercanas al corazón y contienen mucho tejido elástico en la capa media, lo que les permite mantener un gradiente de presión relativamente constante a pesar del bombeo de sangre por parte del corazón (Boron and Boulpaep, 2021; Tucker et al., 2021).
- Arterias musculares o arterias de distribución: dentro de ellas encontramos las arterias braquial, radial o femoral, entre otras. A medida que el árbol arterial se extiende hacia la periferia, el diámetro de los vasos disminuye y la capa media deja de ser tan elástica para contener más células musculares lisas (Gao, 2017). La principal función de estos vasos es distribuir la sangre hasta los diferentes lechos vasculares (Patton and Thibodeau, 2013; Drake et al., 2018).
- Arteriolas o arterias de resistencia: estos vasos derivan de las arterias musculares y son los responsables de regular el flujo sanguíneo a través de lechos vasculares concretos. Están compuestas, principalmente, por músculo liso, lo que hace que desempeñen un papel importante en la resistencia vascular sistémica debido a la falta de tejido elástico en sus paredes (Patton and Thibodeau, 2013; Tucker et al., 2021).

Las **venas** son los vasos encargados de transportar la sangre hacia el corazón y, a diferencia de las arterias, soportan una presión baja. Estos vasos tienen unas paredes finas menos elásticas que las arterias, lo que les permite retener un porcentaje muy elevado de sangre en circulación a presiones relativamente bajas, lo que se conoce como alta capacidad (Patton and Thibodeau, 2013; Tucker et al., 2021). Dentro del sistema venoso encontramos venas sistémicas, las cuales transportan sangre pobre en oxígeno desde los diferentes órganos de nuestro cuerpo hacia el corazón, y entre las que encontramos las venas cavas superior e inferior, además del seno coronario, y las venas pulmonares, que transportan sangre rica en oxígeno desde los pulmones al corazón (Paulsen and Waschke, 2018). Además, podemos distinguir entre venas superficiales y profundas, encontrándose las primeras en el tejido graso subcutáneo y las segundas localizadas de forma paralela al sistema arterial; ambos sistemas venosos están conectados por válvulas venosas que permiten a la sangre fluir únicamente del sistema superficial al profundo (Paulsen and Waschke, 2018). Dentro de las venas superficiales encontramos las venas cefálica, basílica, mediana o safena, y dentro de las profundas, las venas braquiocefálicas, radial, braquial, axilar, subclavia, cubital, tibial, femoral, ilíaca, poplítea o cavas superior e inferior (Tortora and Derrickson, 2020).

Las **vénulas** son las venas más pequeñas, con paredes muy finas y porosas que consisten en poco más que una capa de células endoteliales, unas pocas células musculares lisas y algún que otro fibroblasto. Su luz es muy estrecha y reciben sangre de los capilares, actuando, del mismo modo

que ellos, como lugares de intercambio de líquido entre la sangre y los espacios tisulares (Patton and Thibodeau, 2013; Tucker et al., 2021).

Los **capilares** son vasos microscópicos de paredes finas compuestos por una sola capa de células endoteliales, a través de los cuales se produce la transferencia de nutrientes y otras sustancias vitales entre la sangre y las células (Patton and Thibodeau, 2013; Tucker et al., 2021).

2.3. FACTORES QUE REGULAN EL TONO VASCULAR

El tono vascular está regulado por múltiples factores vasoactivos. Entre ellos encontramos fuerzas físicas que afectan a la pared vascular, el sistema nervioso o mediadores vasculares con funciones vasodilatadoras y vasoconstrictoras.

FUERZAS FÍSICAS: *SHEAR STRESS* Y *WALL STRESS*

La sangre que circula en nuestro cuerpo, bombeada por la acción del corazón, actúa constantemente sobre la pared vascular dando lugar a fuerzas o tensiones de rozamiento. Dentro de estas fuerzas o tensiones encontramos la tensión de cizallamiento (*shear stress*) sobre las células endoteliales, generada por el flujo sanguíneo, y la tensión y deformación (estiramiento) circunferencial de la pared (*wall stress* y *strain*), generadas por la presión de la sangre.

En situaciones fisiológicas, los vasos sanguíneos están sometidos al paso de un flujo laminar que puede convertirse en turbulento y dar lugar a cambios patológicos. Estas fuerzas físicas provocan cambios morfológicos en el endotelio y la pared vascular, además de desencadenar acontecimientos bioquímicos, lo que hace que sean necesarias para ejercer funciones vasoprotectoras; los receptores y la transducción a través de las células de la pared, mediante los cuales esta percibe dichas fuerzas y responde a ellas, son estudiados por la mecanobiología, mostrando que miles de genes se activan en el endotelio dando lugar a una gran cantidad de funciones adaptativas (Boisseau, 2005; Lu and Kassab, 2011). De acuerdo con el papel crítico del NO producido por la NO sintasa endotelial (eNOS) como mediador de las respuestas al estrés de la pared, existen pruebas de que en condiciones fisiológicas estas fuerzas podrían ejercer efectos vasoprotectores a través de él (Lu and Kassab, 2011). Sin embargo, en situaciones patológicas como la hipertensión, pueden producirse cambios en el flujo sanguíneo con un incremento de la tensión y deformación de la pared vascular, dando lugar a cambios morfológicos en el endotelio, al remodelado de la pared y a cambios bioquímicos que pueden llevar a una posible disfunción vascular (Lu and Kassab, 2011).

La tensión laminar de cizallamiento o el estiramiento circunferencial de la pared pueden regular, además, algunas moléculas presentes en la MEC; así, por ejemplo, la tensión de cizallamiento puede inactivar el receptor de Ang II tipo 1 (AT₁R) a través de una vía dependiente de NO, mientras que el estiramiento circunferencial puede activarlo, conduciendo a la producción de anión superóxido (O₂⁻) y a la disfunción del endotelio y de las CMLV (Lu and Kassab, 2011).

INERVACIÓN VASCULAR

El sistema nervioso (SN) regula el sistema cardiovascular controlando la actividad del corazón como bomba, las variaciones de la presión arterial y la redistribución del flujo sanguíneo; estas funciones son ejercidas por el sistema nervioso autónomo (SNA), el cual se divide en sistema nervioso simpático (SNS), sistema nervioso parasimpático (SNP) y sistema nervioso entérico (SNE) (Tresguerres et al., 2020; Boron and Boulpaep, 2021). Estas funciones producidas por el SNA tienen lugar, principalmente, a través del **SNS**, cuyas fibras inervan casi todos los vasos sanguíneos, además del corazón. La estimulación simpática tiene distintos efectos en función del tipo de vaso sobre el que actúa; así, sobre venas grandes, causa una reducción de su capacitancia, aumentando el volumen de sangre que llega al corazón, el gasto cardíaco y el volumen circulante periférico; sobre arterias grandes y medianas, la activación del SNS produce una constricción que da lugar a una menor elasticidad, disminuyendo la función amortiguadora de la presión ventricular y aumentando la velocidad de la onda de pulso; y sobre arterias pequeñas y arteriolas, aumenta la resistencia, incrementando la presión arterial y reduciendo el flujo sanguíneo en los tejidos perfundidos por dichas arterias. A nivel cardíaco, la estimulación simpática incrementa la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción. Todos estos efectos modulan la presión arterial, aumentándola (Tresguerres et al., 2020).

En la mayor parte de los tipos vasculares predominan las fibras simpáticas de tipo vasoconstrictor, las cuales participan en el mantenimiento del tono vasomotor basal y, mediante su acción sobre las arterias de resistencia, tienen un papel clave en la regulación de la presión arterial (Tresguerres et al., 2020). El neurotransmisor liberado por las fibras simpáticas postganglionares, localizadas en el borde adventicio-medial del vaso, es la noradrenalina, que actúa sobre receptores α -adrenérgicos produciendo vasoconstricción. Sin embargo, en algunos lechos vasculares, noradrenalina puede actuar sobre receptores β_2 -adrenérgicos, teniendo un efecto vasodilatador (Thomas, 2011; Tresguerres et al., 2020; Hall and Hall, 2021). Además de su efecto por inervación de la vasculatura y el corazón, el SNS también ejerce efectos indirectos sobre el sistema cardiovascular mediante la activación de sistemas humorales como el sistema simpaticoadrenal, con liberación de catecolaminas por parte de las glándulas suprarrenales, y el SRA (Thomas, 2011).

Por su parte, la inervación del **SNP** tiene un papel menos importante en la regulación del tono vasomotor, la presión arterial y el flujo sanguíneo periférico, siendo su principal acción a nivel cardiovascular la disminución de la frecuencia cardíaca. El neurotransmisor liberado por las terminaciones nerviosas parasimpáticas es, fundamentalmente, la acetilcolina, la cual actúa sobre receptores muscarínicos produciendo vasodilatación y reducción de la frecuencia cardíaca. Dentro del SNP, además de las clásicas fibras parasimpáticas colinérgicas, se encuentra la vía nitrérgica o nitroxidérgica. Los nervios nitrérgicos están presentes en muchos lechos vasculares, como el mesentérico o el femoral, y van a tener una función vasodilatadora por la acción de su neurotransmisor NO, producido por la NO sintasa neuronal (nNOS) (Burnstock, 2009; Tresguerres et al., 2020; Boron and Boulpaep, 2021).

MEDIADORES VASOACTIVOS

En la regulación del tono vascular también participan una serie de factores humorales, la mayoría de los cuales son sintetizados y liberados por el endotelio, aunque también pueden proceder de otros tipos celulares (**Figura 2**).

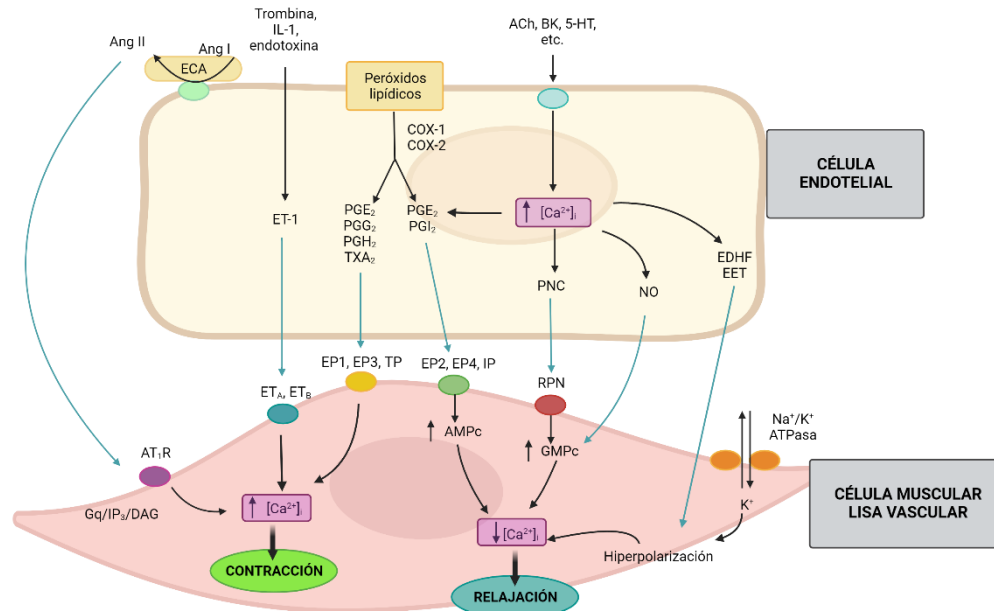


Figura 2. Mediadores vasoactivos. En situaciones fisiológicas o tras la activación de las células endoteliales por diferentes estímulos como angiotensina II (Ang II), trombina, interleukina-1 (IL-1), acetilcolina (ACh), bradiquinina (BK) o 5-hidroxitriptamina (5-HT), las células endoteliales liberan numerosos factores como prostanooides (PGs), óxido nítrico (NO), endotelina-1 (ET-1) o factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), que se unen a sus receptores en las células musculares lisas vasculares (CMLV), activan la guanilato ciclasa o canales de K⁺ conduciendo a relajación o a respuestas contráctiles. AMPc, adenosín monofosfato cíclico; AT₁R, receptor 1 de angiotensina II; COX, ciclooxigenasa; DAG, diacilglicerol; ECA, enzima convertidora de angiotensina; EET, ácido epoxieicosatetraenoico; EP1, 2, 3, 4, receptor de prostaglandina E₂ 1, 2, 3, 4; ET_{A,B}, receptores de endotelina; GMPc, guanosín monofosfato cíclico; Gq, proteínas G; IP, receptor de prostaglandina I₂; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; Na⁺/K⁺ ATPasa, bomba electrogénica; PNC, péptido natriurético C; RPN, receptor de péptido natriurético; TP receptor de tromboxano. Modificado de Rang et al., 2008. Creada con BioRender.com.

▪ ÓXIDO NÍTRICO

El NO, inicialmente llamado factor relajante derivado de endotelio (EDRF), es una sustancia difusible con una vida media de pocos segundos, generada por la acción de las sintasas de NO (NOS), las cuales usan L-arginina como sustrato, O₂ y NAD(P)H como co-sustratos y la tetrahidrobiopterina (BH₄), el dinucleótido de flavina adenina (FAD) y el mononucleótido de flavina (FMN) como cofactores (Deanfield et al., 2007; Förstermann and Sessa, 2012). Las NOS son homodímeros, cuyos monómeros están compuestos por un dominio reductasa en el extremo C-terminal, el cual se une al NAD(P)H, el FAD y el FMN, y un dominio oxidasa en el extremo N-terminal, por el que se une a la BH₄, al O₂ y a la L-arginina, y que contiene un grupo

prostético hemo (Förstermann and Sessa, 2012). La NOS transferirá electrones del NAD(P)H, a través de las flavinas FAD y FMN, al grupo hemo, donde se utilizarán para reducir y activar el O₂ y para oxidar la L-arginina a L-citrulina y NO. Los monómeros y dominios aislados de la reductasa pueden unirse a calmodulina (CaM), lo cual mejora la transferencia de electrones desde este dominio (Förstermann and Sessa, 2012) (**Figura 3**).

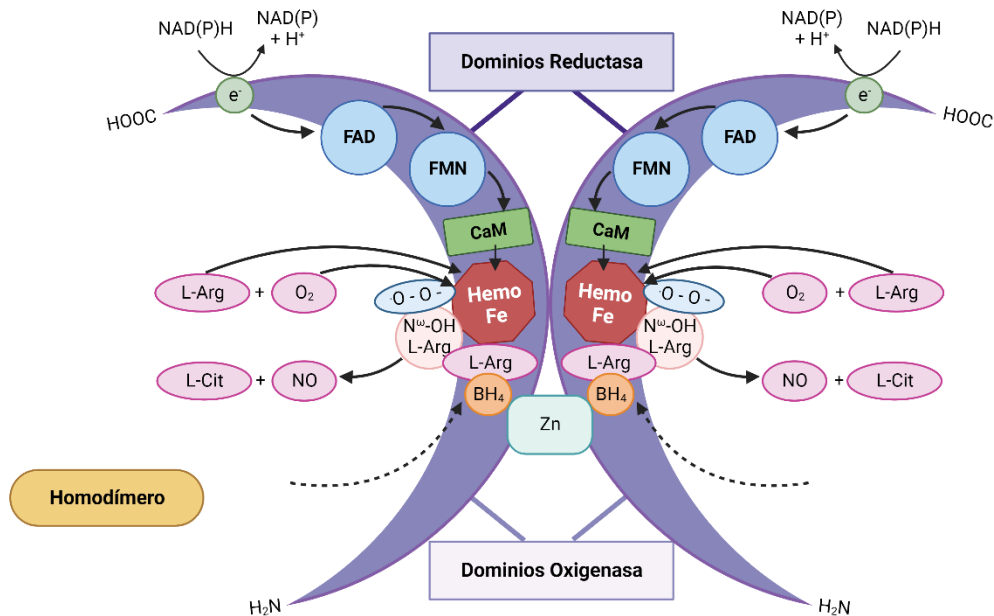


Figura 3. Estructura y mecanismo de acción de la NOS. La NOS es un homodímero, cuyos monómeros están formados por un dominio reductasa C-terminal y un dominio oxigenasa N-terminal que contiene un grupo prostético hemo. Cuando hay suficiente sustrato L-arginina y cofactor BH₄, se produce la transferencia de electrones desde el NAD(P)H a través de FAD y FMN en el dominio reductasa al grupo hemo para reducir el O₂ y sintetizar NO, generándose L-citrulina como subproducto. BH₄, tetrahidrobiopterina; CaM, calmodulina; FAD, dinucleótido de flavina; FMN, mononucleótido de flavina; L-Arg, L-arginina; L-Cit, L-citrulina. Modificada de Förstermann and Sessa, 2012. Creada con BioRender.com.

Existen tres tipos de NOS, dos constitutivas y una inducible. Entre las constitutivas encontramos la nNOS, que se expresa en el cerebro y el sistema nervioso periférico, y la eNOS la cual se ubica, sobre todo, en las células endoteliales vasculares y puede estar regulada por el estrés de cizallamiento, el ejercicio crónico o el embarazo. La isoforma inducible (iNOS) se activa por estímulos inmunológicos o inflamatorios, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o la IL-1 β , entre otros (Konukoglu and Uzun, 2017).

El NO que se libera continuamente desde el endotelio difunde hasta las CMLV y activa la guanilato ciclasa soluble (GCs), dando lugar a la vasodilatación mediada por GMPc, al reducir la concentración de Ca²⁺ intracelular (Lüscher and Tanner, 1993; Deanfield et al., 2007; Rang et al., 2008). En situaciones fisiológicas, la eNOS puede ser activada por el estrés generado por el paso de la sangre a través del vaso, permitiendo adaptar la perfusión de los órganos según los cambios en el gasto cardíaco; además, moléculas de señalización como la bradiquinina, la adenosina, el factor de crecimiento endotelial vascular, la serotonina, la histamina o la acetilcolina también pueden activar la eNOS (Deanfield et al., 2007; Konukoglu and Uzun, 2017)

(Figura 2). El NO también puede tener un efecto vasodilatador independiente de la activación de la GCs estimulando la calcio-ATPasa del retículo endoplasmático, reduciendo así la concentración de calcio intracelular y provocando la relajación del músculo. Además, el NO tiene un papel en la inhibición de la inflamación y la adhesión plaquetaria (Konukoglu and Uzun, 2017).

▪ ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ROS son derivados reactivos del metabolismo del O₂ que se encuentran en el medio ambiente y en todos los sistemas biológicos. Son moléculas o fragmentos moleculares que suelen tener electrones desapareados, lo que les confiere una gran capacidad para reaccionar con otras moléculas y otros radicales libres generando reacciones en cadena, por lo que son compuestos altamente reactivos. Entre ellas encontramos el O₂^{•-}, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el peroxinitrito (ONOO⁻), las cuales destacan por sus implicaciones biológicas (Tresguerres et al., 2020).

Las ROS se producen como intermediarios en las reacciones de reducción-oxidación (redox) que llevan del O₂ al H₂O (Figura 4) (Paravicini and Touyz, 2008). Normalmente, los niveles de ROS se encuentran en equilibrio gracias a la compensación de su tasa de formación con su tasa de eliminación por sistemas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, tioredoxina, glutatión o vitaminas antioxidantes; sin embargo, un desbalance entre estos dos procesos lleva a lo que se conoce como estrés oxidativo, caracterizado por unos niveles incrementados de ROS que conducen a daño tisular (Viridis et al., 2011; Montezano et al., 2015; Sinha and Dabla, 2015).

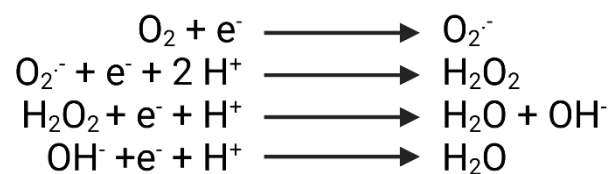


Figura 4. Reducción secuencial del O₂. Creada con BioRender.com.

Las ROS pueden alterar múltiples proteínas mediante modificaciones postraduccionales, como la oxidación y la fosforilación; entre las proteínas sensibles a estas modificaciones encontramos canales iónicos (canales de Ca²⁺ o Na⁺), receptores, quinasas (MAPK, Akt, c-Src o ERK1/2), fosfatasa, factores de transcripción (NF-κB, AP-1, STAT3 o Nrf2), proteínas estructurales y MMPs. De esta forma, las ROS modulan numerosas vías de señalización intracelular que conducen a cambios en la transcripción de genes y la síntesis de proteínas y, en consecuencia, en la función celular. De hecho, las ROS participan en la regulación de muchos procesos biológicos como la respuesta inmune, la señalización intercelular, el crecimiento y la diferenciación celular, la producción y degradación de la MEC, la inactivación del NO o la estimulación de muchas quinasas y genes proinflamatorios, siendo importantes reguladores de las funciones vascular, cardíaca y renal. Además, las ROS regulan la producción y señalización de prostanoïdes, importantes en la modulación de la función vascular (Montezano et al., 2015; Touyz et al., 2020) y participan en la regulación del tono vascular mediante el efecto directo vasodilatador y vasoconstrictor, respectivamente, del H₂O₂ y el O₂^{•-} o mediante la reducción de la biodisponibilidad de NO por acción del O₂^{•-} para formar ONOO⁻ (Lüscher and Tanner, 1993;

Paravicini and Touyz, 2008; Viridis et al., 2011; Montezano et al., 2015). Las ROS son moléculas de señalización clave a través de las cuales agentes vasoactivos, como la Ang II, la endotelina 1 (ET-1) o los prostanoideos, median efectos celulares y regulan la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , importante para desencadenar y mantener la vasoconstricción y la contracción cardíaca (Touyz et al., 2020).

En condiciones patológicas en las que hay unos niveles elevados de ROS, estas reaccionan con proteínas, ADN, membranas celulares y otras moléculas originando daño a nivel celular, además de llevar a la generación de más ROS; todo ello tiene una implicación en procesos como la inflamación, la disfunción endotelial, la proliferación, migración y activación celular, la peroxidación lipídica, la deposición de matriz extracelular, la fibrosis, la angiogénesis y el remodelado cardiovascular, procesos importantes en el desarrollo de patologías como hipertensión, aterosclerosis, diabetes o insuficiencia cardíaca (Seddon et al., 2007; Paravicini and Touyz, 2008).

Si bien es verdad que el estrés oxidativo se relaciona con diversas patologías, las ROS son esenciales en numerosos procesos fisiológicos, por lo que su completa eliminación, que puede llevar a una situación conocida como estrés reductivo (ER), también es perjudicial. El ER constituye la contrapartida del estrés oxidativo, caracterizándose por un aumento anormal de los equivalentes reductores en sistemas intactos de oxidación y reducción que pueden agotar las ROS. Este ER puede producirse por una elevación de la relación GSH/GSSG y/o NAD/NADH⁺, o por una sobreexpresión de los sistemas enzimáticos antioxidantes, pudiendo contribuir al desarrollo de algunas enfermedades como miocardiopatía hipertrófica, hipertensión pulmonar, cáncer o Alzheimer, entre otras (Pérez-Torres et al., 2017).

▪ OTROS

Los **prostanoides** son moduladores críticos del tono vascular y de la agregación plaquetaria, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Su síntesis depende de la acción de las COX 1 y 2 sobre el ácido araquidónico liberado por las fosfolipasas de los fosfolípidos de la membrana. De estas dos isoformas de la COX, COX-1 se expresa de forma constitutiva y se encarga de sintetizar prostanoideos implicados en el control homeostático de diferentes funciones fisiológicas; sin embargo, COX-2 es producto de un gen muy regulado y cataliza la producción local de prostanoideos en situaciones tanto fisiológicas como patológicas, aunque su expresión se encuentra más restringida en condiciones basales, induciéndose su expresión por diversos mediadores asociados con la inflamación y el crecimiento celular, como IFN, TNF α , IL-1 o factores de crecimiento, y teniendo un papel esencial en la inflamación, el dolor, la fiebre y la proliferación celular normal y patológica (Flórez Beledo, 2013). Ambas isoformas transforman el ácido araquidónico en dos endoperóxidos muy inestables, PGG₂ y PGH₂, que se transforman rápidamente en prostaglandinas (PGE₂, PGI₂, PGF_{2 α} , PGD₂) y tromboxano A₂ (TXA₂) por la acción de isomerasas específicas; estos prostanoideos se unen a receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) específicos denominados EP, IP, FP, DP y TP, respectivamente (Rang et al., 2008). Entre los prostanoideos vasoconstrictores destaca el TXA₂, generado a partir de la prostaglandina H₂ por la tromboxano-A sintasa (Lüscher and Tanner, 1993; Konukoglu and Uzun, 2017). El TXA₂ se une al receptor TP, el cual está implicado en procesos como la agregación plaquetaria, la contracción del músculo liso, la expresión de moléculas de adhesión y la infiltración de monocitos/macrófagos (Hernanz et al., 2014; Konukoglu and Uzun, 2017). Otro prostanoides con acción vasoconstrictora es la PGE₂, la cual puede sintetizarse por la acción de

tres PGE sintasas, la PGE₂ sintasa citosólica (cPGES) y dos sintasas diferentes unidas a membrana (mPGES-1 y mPGES-2); mientras que la cPGES y la mPGES-2 son constitutivas, la mPGES-1 se induce por estímulos inflamatorios de manera similar a la COX-2 (Hernanz et al., 2014). La PGE₂ puede unirse a cuatro subtipos de receptores (EP1-EP4), de los que EP1 y EP3 inducen vasoconstricción, mientras que EP2 y EP4 median vasodilatación. Estos receptores EP también están implicados en la agregación plaquetaria, la migración de monocitos y macrófagos, la proliferación y migración de CMLV, la producción de citoquinas vasculares o la activación de MMP (Félétou et al., 2011; Hernanz et al., 2014). Los intermediarios endoperóxidos PGG₂ y PGH₂ también son factores vasoconstrictores derivados del endotelio que van a actuar a través de los receptores TP (Rang et al., 2008). Por otra parte, la vía de la COX también es una fuente de O₂⁻, que puede mediar las contracciones dependientes de endotelio, bien por inactivar el NO o por sus efectos directos sobre el músculo liso vascular (Lüscher and Tanner, 1993) (*Figura 2*).

La **prostaciclina**, o prostaglandina I₂ (PGI₂), es un vasodilatador perteneciente a la familia de los prostanoides que se produce y libera del endotelio a partir de la prostaglandina H₂ por la acción de la prostaciclina sintasa, y que actúa, de manera paracrina, sobre los receptores de prostanoides tipo I (IP), acoplados a proteína G_s, tanto en las CMLV como en las plaquetas; esta unión da lugar a un aumento de AMPc en el citosol, provocando la relajación y la inhibición de la agregación plaquetaria (Lüscher and Tanner, 1993; Stitham et al., 2007; Hernanz et al., 2014; Konukoglu and Uzun, 2017). Además, se produce en respuesta a mediadores inflamatorios, como la IL-1β o los factores de crecimiento epidérmico y derivado de plaquetas (Deanfield et al., 2007; Konukoglu and Uzun, 2017). Sin embargo, aunque la prostaciclina es el principal prostanoides vasodilatador generado por la COX, cada vez hay más evidencias de que puede activar los receptores EP3 o TP, provocando vasoconstricción en hipertensión (Hernanz et al., 2014; Li et al., 2017) (*Figura 2*).

El endotelio también está implicado en la hiperpolarización de las CMLV a través de una vía independiente del NO en la que participan los denominados **EDHF** (factores hiperpolarizantes derivados de endotelio), refiriéndose el término EDHF más a un mecanismo que a un factor específico (Deanfield et al., 2007; Konukoglu and Uzun, 2017). Se ha propuesto que los EDHF son sustancias y/o señales eléctricas que se producen en el endotelio y se liberan de él, cuya función es hiperpolarizar las CMLV al activar canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺, lo que llevaría a la relajación vascular (Konukoglu and Uzun, 2017). Además, también producen una hiperpolarización de las células endoteliales, aumentando la concentración de Ca²⁺ intracelular (Félétou et al., 2011). El efecto de los EDHF es mayor en las arterias pequeñas, siendo de gran importancia para la regulación del flujo sanguíneo de los órganos, la resistencia vascular periférica y la presión sanguínea, especialmente cuando se produce una reducción en la biodisponibilidad de NO, ya que se sabe que estos factores pueden compensar la pérdida de tono vasodilatador mediado por el NO (Deanfield et al., 2007; Konukoglu and Uzun, 2017). Aunque no se conoce su naturaleza exacta, se han sugerido varios factores que pueden llevar a cabo estas acciones, entre los que se encuentran los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET, derivados de las enzimas del citocromo P450), varios productos de la lipoxigenasa (LOX), el H₂O₂, el monóxido de carbono (CO), el sulfuro de hidrógeno (H₂S) y el péptido natriurético C (PNC) (Félétou and Vanhoutte, 2009) (*Figura 2*).

Las **endotelinas (ET)** son potentes vasoconstrictores con un papel clave en la homeostasis vascular. Existen tres tipos de endotelinas, ET-1, ET-2 y ET-3, pero las células endoteliales solo producen ET-1. Esta molécula se sintetiza como pre-proendotelina y su forma activa se genera

por la acción de una enzima convertidora de endotelina (ECE) localizada en las membranas de las células endoteliales. La ET-1 constituye el miembro más importante y abundante de la familia de las endotelinas. ET-1 se une a dos subtipos de receptores, ET_A y ET_B, ambos acoplados a proteína Gq y a la formación de IP₃ y diacilglicerol (Konukoglu and Uzun, 2017). Mediante su unión a los receptores ET_A en las CMLV, ET-1 produce vasoconstricción por activación de PLC y aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular (Schiffrin, 2005; Böhm et al., 2007). La activación de estos receptores por ET-1 también da lugar a una respuesta inflamatoria vascular mediante la activación de distintas quinasas (Chiloeches et al., 1999; Kodama et al., 2003; Luttrell and Luttrell, 2004; Schorlemmer et al., 2008), además de un incremento en la producción de ROS (Laplante et al., 2005; Romero et al., 2010) y la activación de factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 y NF-κB (Montezano et al., 2007; Hsieh et al., 2012). A nivel vascular, los receptores ET_B están presentes en el endotelio y en las CMLV, donde su papel es controvertido, ya que pueden tener efectos diferentes e incluso opuestos, además de poder cambiar su patrón de expresión y funcionamiento en condiciones patológicas (Iglarz et al., 2015; Zheng et al., 2015; Palacios-Ramírez et al., 2019). Distinguiendo entre los receptores ET_B presentes en el endotelio y en las CMLV, ET_{B1} estaría presente en las células endoteliales, mediando el aclaramiento de ET-1 (Fukuroda et al., 1994) y la vasodilatación mediante la liberación de PGI₂, EDHF y NO (Schiffrin, 2005; Böhm et al., 2007); por su parte, ET_{B2} estaría presente en las CMLV, siendo responsable de vasoconstricción y proliferación por mecanismos similares a los mediados por ET_A (Seo et al., 1994; Schiffrin et al., 1995; Iglarz et al., 2015).

Existen diferentes factores que estimulan la producción y liberación de ET-1, como Ang II, la hormona antidiurética, la trombina, citoquinas, ROS y las fuerzas de cizallamiento que actúan sobre el endotelio; también existen factores que inhiben su liberación, como la prostaciclina, el péptido natriurético auricular y el NO. Las ET, además, tienen otros efectos, de manera que participan en el crecimiento celular, la homeostasis cardiovascular o la inflamación, entre otras (Konukoglu and Uzun, 2017) (*Figura 2*).

Otro de los mecanismos por los que el endotelio puede aumentar el tono vascular es la conversión de Ang I en Ang II en la superficie endotelial (Deanfield et al., 2007). La **Ang II** es el principal péptido efector del SRA. Se trata de un octapéptido versátil con una función intracrina/autocrina/paracrina relacionada con casi todos los sistemas. La Ang II tiene un papel vasoactivo en todos los vasos sanguíneos, dando lugar a la contracción del músculo liso vascular. Además, la Ang II aumenta la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca y estimula la proteína inhibidora del activador de plasminógeno PAI-1 y PAI-2, incrementando el potencial protrombótico (Patel et al., 2017). La Ang II también puede influir en la liberación de prostaglandinas, las cuales participan en la vasoconstricción, habiéndose identificado la PGE₂ y su receptor EP1 como cruciales para la hipertensión dependiente de Ang II (Patel et al., 2017) (*Figura 2*).

La Ang II tiene numerosas acciones sobre el músculo liso vascular, donde, como se ha comentado, modula el tono vasomotor, regula el crecimiento celular y la apoptosis, influye en la migración celular y en la deposición de MEC, y estimula la producción de factores de crecimiento específicos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el TGFβ, de factores vasoconstrictores como la ET-1, de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) o E-selectinas, de citoquinas, como TNFα, interferón gamma (IFNγ) o ILs, y de ROS, mediante la activación de NAD(P)H oxidasas; además, la Ang II puede reclutar monocitos y otras células inflamatorias en

el corazón, la vasculatura y el riñón. Por todas estas acciones, la Ang II juega un papel fundamental controlando la integridad funcional y estructural de la pared vascular y es importante en los procesos fisiológicos que regulan la presión sanguínea y en los procesos patológicos que subyacen a las enfermedades vasculares (Touyz and Schiffrin, 2000; Savoia and Volpe, 2011; Rucker and Crowley, 2017). En secciones posteriores se hablará del papel del SRA en la hipertensión arterial.

CANALES $K_v1.3$

Los canales de potasio son el grupo más grande, heterogéneo y ubicuo de proteínas estructurales de membrana (Consortio ÍTACA, 2013), siendo su actividad un importante determinante del tono vascular por regular el potencial de membrana en las CMLV. Su activación produce hiperpolarización de la membrana, dando lugar a una reducción del flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L y, en consecuencia, a la relajación arterial; por el contrario, su inhibición provoca la despolarización de la membrana y la consiguiente vasoconstricción (Nelson and Quayle, 1995; Cogolludo and Perez-Vizcaino, 2010; Jackson, 2018). Los canales de K^+ activos pueden clasificarse según su topología y sus propiedades funcionales y farmacológicas como canales dependientes de voltaje (K_v) o dependientes de ligando (Tamargo, 2004b).

Los canales K_v están formados por tipos distintos de proteínas que se agrupan dando lugar a canales funcionales resultantes del ensamblaje de 4 subunidades α y 4 β , formando homo o heterotetrámeros; cuando el canal es un homotetrámero, las cuatro subunidades α están codificadas por el mismo gen, mientras que en el caso de los heterotetrámeros están constituidos por productos de distintos genes, pero siempre de la misma subfamilia (Tamargo, 2004a). Cada subunidad α está formada por seis regiones transmembrana (S1-S6) conectadas por bucles intra y extracelulares con los extremos amino y carboxi terminal en el lado intracelular. Estas subunidades α permiten la formación de un poro selectivo de K^+ entre las regiones transmembrana 5 y 6 (S5-S6) y regulan el estado conductor/no conductor del canal al actuar como sensores de voltaje (S1-S4) (Yellen, 2002; Dubó et al., 2016; Pérez-García et al., 2018), por lo que la estructura de este tipo de canales se define como 6TM/1P. Las posibles combinaciones de las subunidades α dan lugar a una gran variedad de corrientes K_v , pudiendo clasificarse estos canales en las subfamilias K_v1-9 . Además, los canales están asociados a proteínas accesorias que modulan sus propiedades y pueden dar lugar a modificaciones postraduccionales como glicosilación o fosforilación de algunas de las proteínas que los forman, lo que puede afectar a su plegamiento, flujo de iones o actividad (Tamargo, 2004a) (*Figura 5*).

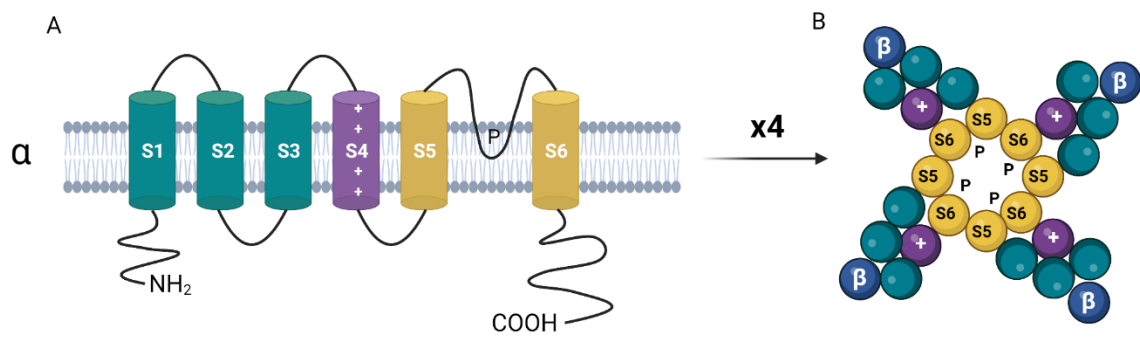


Figura 2. Subunidad α de los canales K_v y su estructura global. (A) Representación esquemática de la subunidad α de los canales de potasio dependientes de voltaje K_v , formada por 6 segmentos transmembrana y 1 poro entre los segmentos 5 y 6 (6TM/1P). (B) Estructura global de los canales K_v Modificada de Dubó et al., 2016. Creada con BioRender.com.

Los canales K_v se encuentran tanto en células excitables como no excitables. En las células excitables contribuyen al control del potencial de membrana en reposo, así como a la frecuencia y duración de los potenciales de acción, mientras que en las células no excitables participan en funciones celulares que van desde la secreción hasta la migración, proliferación y apoptosis; todo ello debido a su capacidad para actuar como sensores y moduladores del potencial de membrana (Cid et al., 2012).

Dentro de los canales K_v , los canales $K_v1.3$ pertenecen a la familia *Shaker* (K_v1 , KCNA). Estos canales, que son sensores de voltaje (dominio sensor), responden a cambios en el potencial de membrana con un cambio conformacional que activa la permeabilidad a K^+ (dominio poro), disminuyendo el potasio intracelular y provocando cambios en el potencial de membrana (Pérez-García et al., 2018) (**Figura 6A**). Las regiones terminales citoplasmáticas (dominio de señalización) pueden ser lugares de interacción proteína-proteína con otras proteínas intracelulares que pueden activar diferentes vías de señalización. Esto se conoce como canalosoma y está formado por adaptadores proteicos, quinasas, enzimas productoras de segundos mensajeros, receptores de membrana o proteínas del citoesqueleto, permitiendo este complejo diferentes respuestas, actividades y funciones celulares (Pérez-García et al., 2018) (**Figura 6B**). De esta manera, estos canales llevan a cabo su función moduladora del potencial de membrana en las células excitables y las diferentes funciones mencionadas anteriormente en las células no excitables (Pongs and Schwarz, 2010; Pérez-García et al., 2018).

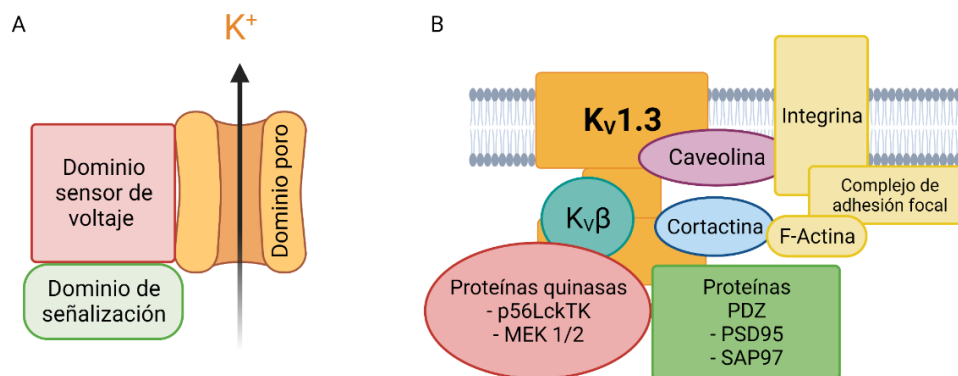


Figura 3. Dominios funcionales y asociaciones de Kv1.3. (A) Dominios funcionales de los canales Kv1.3. Los canales Kv1.3 presentan un dominio sensor de voltaje, que les permite responder a cambios de potencial de membrana activando la permeabilidad al K⁺ a través de su dominio poro y modificando dicho potencial. Las regiones citoplasmáticas (dominio de señalización) pueden actuar como sitios de acoplamiento para las interacciones proteína-proteína con otras proteínas intracelulares. (B) Ilustración de algunas de las asociaciones descritas de los canales Kv1.3, como la caveolina, proteína de unión al colesterol y un receptor de integrina heterodimérico en la membrana celular. Dentro de las proteínas intracelulares asociadas se incluyen las subunidades Kvβ, las proteínas PDZ que asocian a Kv1.3 con las quinazas, y la F-actina que se une a la cortactina. El complejo de adhesión focal une el citoesqueleto celular con el receptor de integrina. Modificada de Pérez-García et al., 2018. Creada con BioRender.com.

Kv1.3 se expresa ampliamente en cerebro, pulmones y osteoclastos, así como en diversas poblaciones de células de origen hematopoyético, siendo en estas últimas (particularmente en linfocitos T) en las que se ha centrado principalmente la atención con respecto a su función. Al ser los responsables del mantenimiento del potencial de membrana en reposo en células quiescentes y de la regulación de la señalización de Ca²⁺, estos canales son indispensables para la activación de linfocitos T (Chandy et al., 2001). Además, los canales Kv1.3 están implicados en la proliferación de células del sistema inmune (linfocitos T y B, NK, macrófagos, células dendríticas y monocitos), del sistema nervioso (astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales) y de las CMLV (Cidad et al., 2010; Pérez-García et al., 2018; Bobi et al., 2020). Existen diferentes modelos para explicar el papel de los canales Kv1.3 en la proliferación celular; así, en las CMLV esta función de Kv1.3 se asocia a su papel como sensor de voltaje que transduciría señales eléctricas a cascadas bioquímicas, independientemente de su efecto sobre el potencial de membrana (Pérez-García et al., 2018). Los canales Kv1.5 son los predominantes a nivel vascular, se expresan en la mayoría de los vasos de conductancia y resistencia, incluyendo la vena porta, las arterias pulmonares, las arterias renales, la aorta y arterias coronarias de roedores y humanos (Clément-Chomienne et al., 1999; Cogolludo et al., 2006), y su alteración está asociada a enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la diabetes y la hipertensión pulmonar (Jackson, 2018).

La relación entre la expresión de los canales Kv1.3/Kv1.5 se ha propuesto como un marcador del fenotipo de las CMLV (contráctil/proliferativo), sugiriéndose que el aumento de Kv1.3 y la disminución de Kv1.5 juega un papel en el remodelado en diferentes patologías (Pérez-García et al., 2018). Así, en el fenotipo proliferativo de las CMLV se produce una regulación al alza de los canales Kv1.3 y de su subunidad accesoria Kvβ2.1, así como una reducción en la expresión de Kv1.5 (Cidad et al., 2012, 2015). Además, se ha descrito la disminución de la proliferación y migración de las CMLV por bloqueo selectivo de los canales Kv1.3; así, Cidad et al. (2014)

mostraron que el bloqueo de $K_v1.3$ con 5-(4-fenoxibutoxi) psoraleno (PAP-1) redujo la proliferación y migración de las CMLV *in vitro* y la formación de hiperplasia de la íntima *in vivo* tras una lesión endoluminal en ratones hipertensos.

El canal $K_v1.3$ es ampliamente considerado como una diana terapéutica para la inmunomodulación en las enfermedades autoinmunes; así, su bloqueo con PAP-1 reduce la infiltración de macrófagos y células T en un modelo de psoriasis (Lam and Wulff, 2011). Además, tras su bloqueo se observa una reducción en los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-17A, IFN γ o IL-8 (Qiu et al., 2002; Koch Hansen et al., 2014). En linfocitos T de pacientes hipertensos, se considera que la disminución de K^+ intracelular es uno de los mecanismos de activación del inflammasoma NLRP3, lo que aumenta la expresión de IL-1 β (Zhu et al., 2017). Por todo ello, se están desarrollando varios inhibidores de $K_v1.3$ como agentes terapéuticos, entre ellos, análogos sintéticos derivados del péptido bloqueador de $K_v1.3$ presente en la toxina de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* ([EWSS]ShK) y de la toxina del escorpión *Heterometrus spinnifer* (HsTX1) y sus derivados, como el HsTX[R14A]; estos péptidos son bloqueadores altamente selectivos de $K_v1.3$ y candidatos potenciales para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide, encontrándose actualmente, algunos de ellos, en ensayos clínicos (Chang et al., 2015; Rashid et al., 2015; Tanner et al., 2017).

2.4. ALTERACIONES VASCULARES EN HIPERTENSIÓN

La hipertensión se caracteriza por un aumento en la resistencia vascular periférica como consecuencia de alteraciones funcionales, estructurales y mecánicas, principalmente en los vasos de resistencia (Rizzoni et al., 2003; Mulvany, 2012). Dentro de las alteraciones estructurales y mecánicas, encontramos el remodelado y el incremento de la rigidez vascular, y dentro de las alteraciones funcionales destaca la disfunción endotelial, caracterizada por una disminución en las respuestas vasodilatadoras y una mayor respuesta a las sustancias vasoconstrictoras (Touyz and Montezano, 2015). Tanto la disfunción endotelial como el remodelado de vasos pequeños son factores pronósticos relevantes para el desarrollo de eventos cardiovasculares (Perticone et al., 2001; Rizzoni et al., 2003).

REMODELADO VASCULAR

El remodelado vascular se refiere a un proceso que tiene lugar cuando la pared vascular cambia su estructura con el fin de mantener una adecuada resistencia vascular (Renna et al., 2013). Normalmente se trata de un proceso adaptativo que ocurre en respuesta a cambios a largo plazo en las condiciones hemodinámicas, habiéndose observado durante el embarazo o el envejecimiento; pero también puede contribuir a la patofisiología de enfermedades vasculares y a desórdenes circulatorios, como la obesidad, los aneurismas o la hipertensión (Gibbons and Dzau, 1994).

El remodelado vascular es un proceso activo que incluye cambios en el crecimiento, la muerte o la migración celular, así como en la síntesis, reorganización o degradación de la MEC. Este remodelado se puede clasificar como remodelado hipertrófico (con un incremento en la cantidad de material del vaso), hipotrófico (con una disminución de la cantidad de material del vaso) o eutrófico (con una reordenación de los distintos componentes de la pared vascular, sin

cambio en la cantidad de los mismos); a su vez, estos tipos de remodelado pueden ser hacia adentro (*inward remodelling*), asociado con diámetros vasculares más pequeños, remodelado hacia afuera (*outward remodelling*), asociado con vasos de mayor tamaño con mayores diámetros, o remodelado compensado, asociado con vasos de tamaño similar (Mulvany, 1999; Touyz and Montezano, 2015) (**Figura 7**).

El **remodelado eutrófico** predominante en hipertensión consiste en un remodelado eutrófico hacia adentro, el cual se caracteriza por una disminución de los diámetros externo e interno y un aumento del grosor de la media y de la relación media/luz, sin cambios en el área de la sección transversal (*cross-sectional area, CSA*) (Schiffirin, 2012; Touyz and Montezano, 2015). Los procesos subyacentes a este tipo de remodelado no son tan conocidos como para los otros tipos; sin embargo, se ha propuesto la existencia de una combinación de crecimiento de la pared vascular hacia el interior y apoptosis en la zona periférica. Asimismo, el remodelado eutrófico puede ser la consecuencia de una vasoconstricción prolongada de las células vasculares incrustadas en una MEC expandida (Bakker et al., 2002; Schiffirin, 2012). Este tipo de remodelado se ha observado en pacientes con hipertensión leve-moderada (Touyz and Montezano, 2015).

El **remodelado hipertrófico**, por su parte, generalmente está asociado a un aumento en el grosor de la media debido a cambios en el crecimiento o el número de células, al mismo tiempo que aumentan la relación media/luz y la CSA (Mulvany, 1999). Este tipo de remodelado es característico de arterias elásticas en el envejecimiento y la hipertensión (Schiffirin, 2012), la obesidad (Briones et al., 2014), la aterosclerosis y la restenosis (Renna et al., 2013), y predomina en la hipertensión secundaria (Mulvany, 2008).

El **remodelado hipotrófico** se caracteriza por una reducción en la cantidad de material en la pared vascular con una menor CSA y una menor relación media/luz (Mulvany, 1999). Este tipo de remodelado puede producirse debido a apoptosis o a una reordenación del material de la pared vascular (Intengan and Schiffirin, 2001). Se ha observado en arteriolas aferentes de ratas espontáneamente hipertensas-SHR (Nørrelund et al., 1994) y en arterias mesentéricas de resistencia de ratas con hipertensión inducida por ouabaína (Briones et al., 2006).

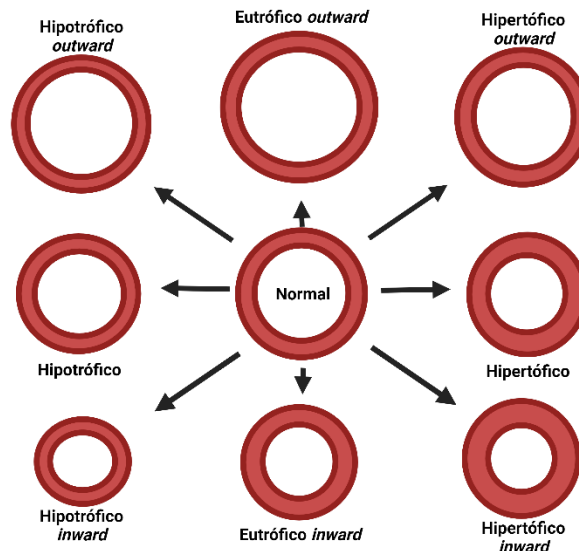


Figura 4. Tipos de remodelado vascular. Modificada de Touyz and Montezano, 2015. Creada con BioRender.com.

Los cambios vasculares observados en la hipertensión son complejos y dependen del lecho vascular. En la hipertensión primaria, el remodelado de las grandes arterias se caracteriza por un aumento del grosor en la íntima-media (entre el 15 y el 40%). En las arterias elásticas proximales, además, es frecuente un agrandamiento de la luz, pero no suele observarse en las arterias musculares distales (Laurent and Boutouyrie, 2015). Durante la hipertensión, en las arterias grandes se produce una aceleración del remodelado hipertrófico hacia el exterior (Mitchell et al., 2003; Schiffrin, 2012). En la hipertensión avanzada se ha descrito hipertrofia de las CMLV en aorta (Laurent and Boutouyrie, 2015), mientras que en las arterias de resistencia de diferentes modelos de roedores hipertensos se ha encontrado tanto hiperplasia como hipoplasia o ausencia de cambios en las CMLV en una pared vascular más gruesa (Briones et al., 2009; Schiffrin, 2012; Roque et al., 2013).

El remodelado eutrófico se encuentra, habitualmente, en la hipertensión primaria, tanto en humanos como en modelos genéticos de hipertensión en ratas, como las ratas SHR, y en arterias mesentéricas de ratones infundidos con Ang II, probablemente debido, como se ha comentado, al crecimiento hacia el interior con apoptosis periférica o por vasoconstricción con una MEC expandida (Bakker et al., 2002; Briones et al., 2009; Schiffrin, 2012; Marchesi et al., 2013; García-Redondo et al., 2016). De hecho, existe una deposición de colágeno y fibronectina con un aumento en la relación colágeno/elastina en pequeños vasos de humanos (Schiffrin, 2012) y roedores con hipertensión inducida por ET-1, Ang II y aldosterona (Neves et al., 2003; Pu et al., 2003; Avendaño et al., 2018). En cuanto al remodelado hipertrófico, este se ha descrito en hipertensión secundaria como la hipertensión renovascular, el aldosteronismo primario o en el feocromocitoma, pero también en la hipertensión asociada a la diabetes mellitus; en la hipertensión por mineralocorticoides en roedores y en ratas Dahl sensibles a la sal, en las que se activa el sistema ET, también se observa un remodelado hipertrófico en las arterias pequeñas (Schiffrin, 2012).

El remodelado de las arterias pequeñas puede ser la primera manifestación del daño en el órgano diana, al menos en la hipertensión humana; así, en una serie de pacientes, el 100% de

los sujetos con hipertensión en fase I mostraron este remodelado, mientras que solo el 60% tenía disfunción endotelial (Park and Schiffrin, 2001).

RIGIDEZ VASCULAR

Otra de las alteraciones vasculares descritas en la hipertensión es el incremento de la **rigidez vascular**, junto con alteraciones en la organización de la lámina elástica interna, afectando a las propiedades mecánicas de los vasos y constituyendo uno de los principales responsables del incremento de la resistencia periférica en la hipertensión (Briones et al., 2009, 2010).

Las arterias están compuestas por una gran variedad de materiales que contribuyen a su rigidez intrínseca, siendo sus propiedades macroscópicas el resultado de una compleja suma de contribuciones individuales e interconexiones (Boutouyrie et al., 2021). Sin embargo, los componentes arteriales responsables de la mayoría de las propiedades mecánicas vasculares son el colágeno y la elastina depositados en la capa media. A presión fisiológica, menos del 10% de las fibras de colágeno está participando en el funcionamiento vascular, mientras que al aumentar la presión, estas aumentan su participación soportando la tensión pasiva de la pared y restringiendo la distensión del vaso, que se vuelve progresivamente menos distensible (Wagenseil and Mecham, 2009).

La rigidez vascular, resultado de los cambios de la pared debido a la acción de las diferentes fuerzas que actúan sobre ella, modifica las propiedades de la pared vascular. Esta rigidez tiene un valor predictivo de la morbilidad y mortalidad cardiovascular y es responsable, al menos en parte, del remodelado vascular en la hipertensión (Laurent et al., 2001; Briones et al., 2010).

Los cambios en la rigidez arterial están determinados por alteraciones cuantitativas y cualitativas en los componentes de la MEC vascular debidas a factores hemodinámicos, genéticos o humorales (Briones et al., 2010; Laurent and Boutouyrie, 2015). Dentro de estas alteraciones se encuentran modificaciones en la síntesis y el ensamblaje o la degradación por parte de las MMP, dando lugar a cambios patológicos en la cantidad y la estructura tridimensional de la MEC. Esto promueve un aumento en la rigidez vascular que, a su vez, es responsable, al menos en parte, del estrechamiento de la vasculatura en la hipertensión, facilitando el aumento de la resistencia periférica y la elevada presión arterial (Briones et al., 2010). Además de los cambios en las propiedades mecánicas, la participación de los componentes de la MEC en la señalización celular, a través de los receptores de integrinas, modula la adhesión celular, la proliferación y el cambio fenotípico, participando en el remodelado vascular y el incremento de la rigidez en la hipertensión (Briones et al., 2010).

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio vascular, siendo una simple monocapa celular, se puede considerar un órgano paracrina, endocrino y autocrino capaz de responder a estímulos físicos y químicos. Las células endoteliales producen una gran variedad de factores que regulan el tono vascular, la adhesión celular, la agregación plaquetaria, la proliferación de las células musculares y la inflamación de la pared vascular, jugando, de esta manera, un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Además, las células endoteliales expresan muchas enzimas, transportadores y receptores que se unen a hormonas y otras sustancias circulantes y que

contribuyen a las diferentes funciones del endotelio (Hadi et al., 2005; Deanfield et al., 2007; Sun et al., 2020).

Dado el importante papel que desempeña el endotelio en la homeostasis vascular, su desregulación y las alteraciones que en él se producen están implicadas en el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, aterosclerosis, diabetes, obesidad o enfermedades cardíacas, entre otras (Sun et al., 2020). La **disfunción endotelial** se asocia con un desbalance en la biodisponibilidad de diversas sustancias vasoactivas, dando lugar a una mayor actividad vasoconstrictora y una situación proinflamatoria, además de alteraciones estructurales a nivel vascular (Sun et al., 2020). El mecanismo más aceptado para explicar la disfunción endotelial y sus efectos sobre el tono vascular consiste en una reducción de la biodisponibilidad de NO, aunque también influyen la existencia de un deterioro en la respuesta del músculo liso vascular a los vasodilatadores, el aumento en la producción de sustancias vasoconstrictoras o en la sensibilidad a los mismos, o el elevado estrés por fuerzas de cizallamiento (Konukoglu and Uzun, 2017).

Dentro de estos procesos que conducen a la disfunción endotelial en hipertensión, el estrés oxidativo parece tener un papel destacado, afectando principalmente al metabolismo del NO (Konukoglu and Uzun, 2017). Entre las ROS más importantes a nivel vascular destaca el $O_2^{\cdot-}$, el cual es un determinante importante en la síntesis y disponibilidad del NO, y puede actuar como vasoconstrictor. El $O_2^{\cdot-}$ se combina con el NO sintetizado por la eNOS para formar ONOO⁻ que, a su vez, oxida y desestabiliza la eNOS para producir más $O_2^{\cdot-}$. Además, el $O_2^{\cdot-}$ conduce a la oxidación de BH₄, cofactor para la síntesis de NO. La producción del $O_2^{\cdot-}$ vascular deriva principalmente de la NAD(P)H oxidasa cuando es estimulada por factores como la Ang II y la ET-1 (Deanfield et al., 2007; Konukoglu and Uzun, 2017).

Además de esto, las ROS aumentan la liberación de moléculas de adhesión [molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), ICAM-1 y MCP-1], citoquinas y quimiocinas y factores de crecimiento por parte de las células endoteliales, promoviendo una situación inflamatoria, la proliferación y migración celular, y un incremento en la permeabilidad a células del sistema inmune (Steyers and Miller, 2014; Konukoglu and Uzun, 2017; Sun et al., 2020). Sin embargo, la señalización de las ROS endoteliales puede iniciarse, a su vez, por la exposición a citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento y la interacción del endotelio con los leucocitos, estableciéndose así un “círculo vicioso” que da lugar a mayor disfunción endotelial e inflamación (Deanfield et al., 2007).

En cuanto a la relación de la disfunción endotelial y la hipertensión, la primera se asocia a menudo con la elevación de la presión arterial (Figueiredo et al., 2012), considerándose, como se ha comentado, un factor pronóstico de eventos cardiovasculares en pacientes con hipertensión esencial (Perticone et al., 2001).

2.5. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CARDÍACA

El **corazón** es el órgano central del sistema circulatorio. Se trata de un órgano muscular localizado en el centro de la cavidad torácica formado por dos bombas separadas, las cuales, gracias a sus movimientos de contracción (sístole) y relajación (diástole) muscular, impulsan la sangre a través de los vasos sanguíneos para distribuirla por todo el organismo, encargándose la bomba cardíaca derecha de mover la sangre hacia los vasos pulmonares y la bomba cardíaca

izquierda hacia los órganos sistémicos (Suárez Quintanilla et al., 2020; Hall and Hall, 2021). El corazón consta de cuatro cavidades, dos superiores llamadas aurículas y dos inferiores llamadas ventrículos, y está envuelto por un delgado saco fibroso llamado **pericardio** (Suárez Quintanilla et al., 2020; Patton and Thibodeau, 2021). Cada aurícula se comunica con un ventrículo a través de un orificio auriculoventricular y cada ventrículo se comunica con una arteria, el ventrículo derecho con la arteria pulmonar y el ventrículo izquierdo con la aorta (Suárez Quintanilla et al., 2020; Patton and Thibodeau, 2021).

Las **aurículas** son cavidades con una pared delgada que almacenan la sangre procedente del sistema venoso sistémico (aurícula derecha) y pulmonar (aurícula izquierda). Durante la diástole ventricular esta sangre fluye hacia los ventrículos a través de las válvulas auriculoventriculares (Patton and Thibodeau, 2021). En cuanto a los **ventrículos**, tienen unas paredes mucho más gruesas que las aurículas, ya que tienen que bombear la sangre a mayor distancia (Patton and Thibodeau, 2013, 2021). Dentro de los circuitos que tiene que seguir la sangre procedente de cada uno de los ventrículos, el circuito pulmonar es más corto que el de la circulación sistémica, además de ofrecer una menor resistencia total, por lo que el ventrículo izquierdo tiene una pared más gruesa que el ventrículo derecho, con el fin de poder vencer dicha resistencia y hacer llegar la sangre a los diferentes órganos. La salida de la sangre desde los ventrículos tiene lugar a través de una serie de válvulas conocidas como válvulas semilunares (Patton and Thibodeau, 2013; Boron and Boulpaep, 2021).

La pared del corazón está compuesta principalmente por músculo cardíaco o **miocardio**, constituido por células musculares estriadas de pequeño tamaño. En su superficie interna, tanto de las cámaras cardíacas como de las válvulas, el corazón está cubierto por una capa de endotelio asentada sobre una fina capa de tejido conectivo llamada **endocardio**, la cual está conectada con el endotelio de las arterias y venas que salen o entran al corazón, respectivamente (Patton and Thibodeau, 2013) (*Figura 8*).

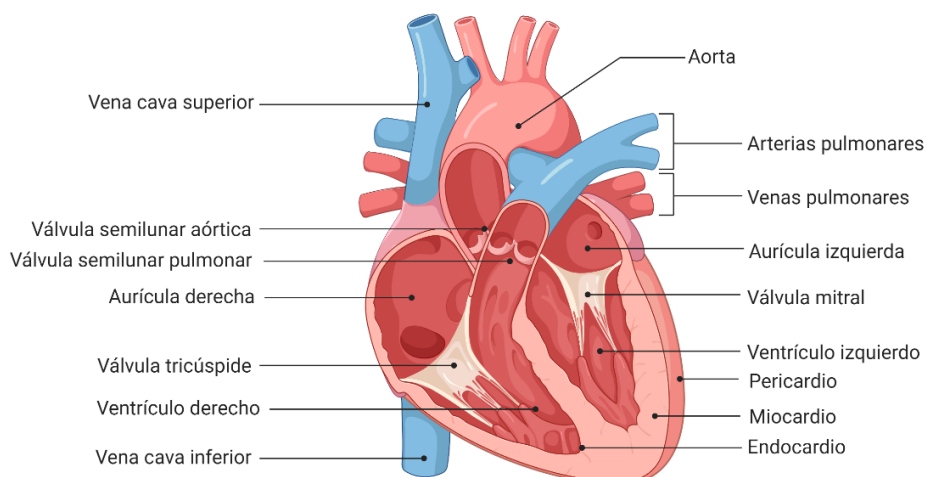


Figura 5. Estructura del corazón. Creada con BioRender.com.

2.6. ALTERACIONES CARDÍACAS EN HIPERTENSIÓN

El incremento sostenido de la presión arterial que tiene lugar en la hipertensión afecta tanto a la estructura como a la función cardíaca, causando, principalmente, hipertrofia del ventrículo izquierdo, agrandamiento de la aurícula izquierda y disfunción sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo, aunque también se ven afectados el lado derecho del corazón y los vasos coronarios (Susic and Frohlich, 2000; Santos and Shah, 2014). El conjunto de estas alteraciones da lugar a lo que se conoce como enfermedad cardíaca hipertensiva o cardiopatía hipertensiva (CH), la cual incrementa considerablemente el riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular, constituyendo un potente factor de riesgo para el desarrollo de insuficiencia cardíaca y arritmias cardíacas (Santos and Shah, 2014).

Dentro de la CH, se considera un rasgo distintivo la **hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI)**, la cual tiene una patogénesis probablemente multifactorial (Santos and Shah, 2014). Esta hipertrofia puede considerarse un mecanismo adaptativo al aumento de la carga hemodinámica, no existiendo una asociación entre la masa del ventrículo izquierdo y un mayor riesgo cardiovascular en personas sanas o en atletas. Sin embargo, sí se encuentra una correlación positiva entre la masa, la geometría y la función ventricular izquierda y el mayor riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes hipertensos, lo que demuestra la mayor importancia de los cambios que tienen lugar en la calidad del miocardio más que en la cantidad de tejido (Susic and Frohlich, 2000). En la HVI se ven afectados todos los componentes del corazón, produciéndose: 1) fibrosis cardíaca, con cambios en los componentes de la MEC, 2) hipertrofia de los cardiomiocitos, con cambios en la expresión de diversos genes cardíacos, la composición bioquímica y las características funcionales, y 3) deterioro de la hemodinámica coronaria, contribuyendo todas estas alteraciones al aumento del riesgo cardiovascular que conlleva la HVI (Susic and Frohlich, 2000).

FIBROSIS CARDÍACA Y CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR

El rendimiento cardíaco óptimo va a depender de las interacciones entre un intersticio cardíaco intacto y los cardiomiocitos. Este intersticio se compone de células intersticiales (fibroblastos, pericitos, células endoteliales, CMLV, macrófagos, mastocitos, células dendríticas y linfocitos) y una intrincada red de moléculas de señalización y proteínas de MEC, las cuales se pueden clasificar en fibrilares (colágeno tipo I y III) y no fibrilares (glicosaminoglicanos, glicoproteínas y proteoglicanos, factores de crecimiento y proteasas), y desempeñan un papel activo en la regulación de respuestas celulares y moleculares esenciales para el desgaste normal y la reparación del tejido cardíaco (Nag, 1980; Nwabuo and Vasan, 2020). En un corazón normal, las citoquinas, los factores de crecimiento, las proteasas, las ROS y las proteínas de señalización participan en un equilibrio dinámico entre distintas vías pro- y antifibróticas, determinando la integridad estructural del miocardio; sin embargo, el corazón humano tiene una capacidad limitada de regeneración tras una lesión miocárdica. Así, la fibrosis cardíaca puede ser el resultado de un proceso de reparación en respuesta a factores de estrés o a lesiones asociadas, por ejemplo, a una hipertensión persistente (Nwabuo and Vasan, 2020).

La fibrosis cardíaca es un rasgo característico de la CH, la cual se asocia con peores resultados clínicos. Esta fibrosis se caracteriza por una acumulación de proteínas de MEC, principalmente colágeno tipo I y III, en el miocardio y la microvasculatura circundante (arterias y arteriolas coronarias intramiocárdicas), así como en el espacio intersticial. Las proteínas de colágeno son

necesarias para la alineación de los compartimentos celulares y el desarrollo de las fuerzas de contracción y relajación para el bombeo de sangre en el corazón; sin embargo, su sobreexpresión y acumulación lleva a una alteración del miocardio, con un incremento de su rigidez y una menor capacidad de aporte de oxígeno al tejido cardíaco, alteraciones que dan lugar a anomalías en la conducción, así como a disfunción diastólica y sistólica ventricular y auricular (Erne, 1996; Susic and Frohlich, 2000; Nwabuo and Vasan, 2020).

El proceso de desarrollo de fibrosis tiene lugar por una cascada de acontecimientos celulares, inmunológicos y moleculares dentro del miocardio (Nwabuo and Vasan, 2020). Un evento importante en la respuesta fibrogénica es la activación de los fibroblastos cardíacos residentes y su transformación en miofibroblastos, los cuales van a actuar aumentando el depósito de proteínas de MEC y atenuando las vías de degradación (Wang et al., 2003; Frangogiannis, 2019). Durante el proceso fibrótico también se produce la activación de diversas vías neurohormonales (SRA, señalización adrenérgica), factores de crecimiento y citoquinas (TNF α , IL-1, IL-6, TGF β), ET-1, ROS y procesos de señalización intracelular que actúan de manera sinérgica modulando el remodelado de la MEC y la formación de tejido fibroso. Los macrófagos, aunque presentes en menor cantidad en el intersticio cardíaco, también contribuyen al desarrollo de la fibrosis, siendo una fuente importante de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de matriz. Por su parte, la diferenciación de las células T *helper* tipo 2 se ha asociado con la regulación al alza de citoquinas profibróticas como IL-4 o IL-13, las cuales estimulan la síntesis de colágeno por los fibroblastos (Nwabuo and Vasan, 2020).

Dentro de los mecanismos implicados en la acumulación de colágeno en el miocardio, el SRA parece tener un papel dominante, observándose el desarrollo de HVI y fibrosis cardíaca en animales con niveles elevados de Ang II, independientemente de la presión arterial, así como en modelos de infusión de este péptido a largo plazo, tanto en dosis presoras como subpresoras (Susic and Frohlich, 2000). Asimismo, el bloqueo de los receptores de Ang II AT₁R lleva a una normalización de la presión arterial, la resistencia periférica total, la masa ventricular izquierda y la concentración de colágeno en ambos ventrículos, así como a una mejora de la hemodinámica coronaria (Susic and Frohlich, 2000).

ALTERACIONES EN LOS CARDIOMIOCITOS

Los cardiomiocitos son el componente principal del corazón humano, constituyendo aproximadamente el 70% de su volumen, y son los encargados de producir el bombeo de sangre mediante su contracción y distensión, dando lugar a la sístole y diástole cardíacas (Nwabuo and Vasan, 2020).

Tras un estrés mecánico, como el que se produce durante la hipertensión, los cardiomiocitos pueden aumentar su tamaño y sufrir cambios en la densidad y la organización estructural de los sarcómeros que los componen, con el fin de mantener su capacidad para generar tensión; sin embargo, cuando hay fibrosis intersticial y el correspondiente incremento en el volumen intersticial, se produce una disminución de la densidad miofibrilar efectiva, lo que produce una reducción de la tensión máxima generada por los cardiomiocitos y favorece un desajuste entre la demanda y el suministro de oxígeno en el miocardio, llevando a la disfunción cardíaca (Nwabuo and Vasan, 2020).

Además, una condición de estrés hemodinámico, como es la hipertensión, puede dar lugar al agotamiento del adenosín trifosfato (ATP), llevando a una reducción de la entrada de calcio en el retículo sarcoplasmático de los cardiomiocitos, impidiendo así la contracción y relajación cardíacas (Nwabuo and Vasan, 2020).

3. ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha comentado anteriormente, las ROS están implicadas en numerosas funciones celulares e influyen en muchos procesos biológicos, participando, además, en la fisiología vascular (Paravicini and Touyz, 2008; Viridis et al., 2011; Montezano et al., 2015); sin embargo, cuando se altera el equilibrio entre los mecanismos que producen las ROS y los que se encargan de su detoxificación se produce lo que se conoce como **estrés oxidativo**, el cual dará lugar a daño celular y a la generación de más ROS, participando en procesos patológicos como la inflamación, la peroxidación lipídica, proliferación celular o apoptosis, entre otros (Touyz et al., 2020).

3.1. FUENTES DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las principales fuentes de ROS, tanto a nivel vascular como cardíaco, son las NAD(P)H oxidasas, aunque también contribuyen otras fuentes enzimáticas como la xantina oxidasa, la NOS desacoplada, la COX, la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el retículo endoplasmático, la LOX y el sistema del citocromo P450 (CYP450). A nivel vascular, las ROS se producen en todos los tipos celulares presentes en la pared, células endoteliales, CMLV y células adventiciales (Seddon et al., 2007; Paravicini and Touyz, 2008; Viridis et al., 2011; Montezano et al., 2015).

NAD(P)H OXIDASA

La NAD(P)H oxidasa cataliza la reducción de O_2 , usando NAD(P)H como donante de electrones, generando así $O_2^{\cdot -}$. La función principal de esta enzima es la producción de ROS, mientras que el resto de enzimas generadoras de ROS las producen como subproducto de sus reacciones o cuando no funcionan correctamente. La NAD(P)H oxidasa es un complejo enzimático formado por diferentes subunidades citosólicas y una o dos transmembrana. Las subunidades transmembrana son la $p22^{phox}$ y una subunidad catalítica que, en mamíferos, puede encontrarse en 7 isoformas diferentes: NOX1-5 y DUOX1-2, también llamadas NOX6-7. NOX1-4 requieren de $p22^{phox}$ como subunidad estabilizadora de membrana, mientras que NOX5 y DUOX no requieren de subunidades adicionales (Montezano et al., 2015; Zhang et al., 2020). Las subunidades NOX son responsables del transporte de electrones a través de las membranas biológicas. Las subunidades citosólicas (organizador de NOX 1 o NOXO1, activador de NOX 1 o NOXA1, Rac1/2, $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p40^{phox}$) participan en el ensamblaje del complejo a la membrana y en la activación de la enzima (Touyz et al., 2011).

Inicialmente las NAD(P)H oxidasas fueron descritas en neutrófilos, donde participan en la fagocitosis y la defensa frente a microbios; sin embargo, enzimas similares se encuentran presentes en muchos otros tipos celulares, incluyendo células endoteliales, fibroblastos, CMLV y cardiomiocitos (Seddon et al., 2007). Las subunidades NOX de la NAD(P)H oxidasa expresadas

en el sistema cardiovascular son NOX1, 2, 4 y 5, aunque NOX5 no está presente en roedores; estas subunidades producen O_2^- , salvo NOX4 que, preferentemente, produce H_2O_2 (Zhang et al., 2020). A nivel vascular, en situaciones basales las células endoteliales expresan principalmente la subunidad NOX2 y las CMLV expresan NOX2 y NOX4, mientras que en una situación patológica, se incrementan los niveles de NOX1 y NOX4 en las células endoteliales y de NOX1 en las CMLV (Touyz and Briones, 2011). En el caso del corazón, las subunidades más expresadas son NOX1, NOX2 y NOX4 (Cadenas, 2018).

Las diferentes funciones de las NAD(P)H oxidasas son complejas, ya que estas enzimas, mediante la producción de ROS, pueden tener un papel distinto en diversos procesos dependiendo de las condiciones fisiopatológicas. En general, los datos procedentes de pacientes con enfermedad arterial coronaria o hipertensión y de modelos animales de hipertensión, diabetes o aterosclerosis, sugieren que NOX1 y NOX2 promueven disfunción endotelial e inflamación, mientras que NOX4 podría tener un papel vasoprotector en determinadas situaciones al producir H_2O_2 , el cual puede actuar como factor relajante derivado de endotelio por su propia acción o por el aumento de la biodisponibilidad de NO, aumentando la expresión y actividad de eNOS, y al suprimir las vías de muerte celular (Drummond and Sobey, 2014). Además, especialmente NOX1 y NOX4, están implicadas en el remodelado vascular en diferentes condiciones patológicas como la hipertensión, la restenosis, la aterosclerosis, la dilatación aórtica o la hipertensión pulmonar (García-Redondo et al., 2016).

XANTINA OXIDASA

La xantina oxidasa (XO) es una de las formas interconvertibles de la enzima xantina oxidorreductasa, siendo la otra forma la xantina deshidrogenasa (XDH). La principal función de la xantina oxidorreductasa es la degradación de las purinas y la conversión de hipoxantina en xantina y de xantina en ácido úrico, en el caso de la XDH usando NAD^+ como socio redox, mientras que la XO utiliza el O_2 como aceptor de electrones, produciendo ROS, principalmente O_2^- y H_2O_2 . En los tejidos bien oxigenados la XDH es la forma predominante de la xantina oxidorreductasa; sin embargo, esta se convierte fácilmente en XO en condiciones como la hipoxia/isquemia, común en las enfermedades cardiovasculares (Doehner and Landmesser, 2011). La XO no solo está presente en la pared vascular si no que circula en el plasma uniéndose a la superficie de las células endoteliales, donde el O_2^- producido reacciona rápidamente con el NO produciendo ONOO⁻, dando lugar a una retroalimentación negativa de la enzima. Además, se sugiere la existencia de una activación sensible a redox de la actividad XO endotelial al observarse que la producción de ROS por la NAD(P)H oxidasa estimula aún más la producción de O_2^- derivada de la XO en las células endoteliales (Doehner and Landmesser, 2011). Se ha descrito que la actividad de esta enzima y los niveles séricos de ácido úrico están aumentados en pacientes con hipertensión, pudiendo considerarse el ácido úrico un biomarcador de estrés oxidativo y mediador de la hipertensión (Montezano et al., 2015).

ÓXIDO NÍTRICO SINTASA DESACOPLADA

La NOS, el sistema enzimático que genera NO, también puede producir ROS en situaciones de deficiencia de su sustrato, L-arginina, o de su cofactor BH_4 , al producirse lo que se conoce como desacoplamiento de NOS (Virdis et al., 2011). La cantidad de BH_4 unida a la NOS, fundamental para la actividad funcional de esta, se relaciona con la actividad enzimática basal, ya que este

cofactor la regula a múltiples niveles, por ejemplo, estabilizando la formación de dímeros enzimáticos (Virdis et al., 2011; Touyz and Montezano, 2015). La desestabilización de la estructura del dímero hace que el dominio de la oxidasa se separe molecularmente y la actividad catalítica se “desacople” funcionalmente (Touyz and Montezano, 2015).

Existen diversos factores que reducen la biodisponibilidad de la BH₄ y, por tanto, originan el desacoplamiento de la NOS, entre los que encontramos el estrés oxidativo o la Ang II, la cual disminuye BH₄ mediante la regulación a la baja de la dihidrofolato reductasa, implicada en la síntesis de este cofactor (Touyz and Montezano, 2015). Se han observado niveles disminuidos de BH₄ en muchos modelos de enfermedad cardiovascular, como hipertensión o resistencia a insulina, así como en pacientes con disfunción endotelial (Shinozaki et al., 1999; Hong et al., 2001).

Otros mecanismos implicados en el desacoplamiento de la eNOS incluyen la oxidación de BH₄, la acumulación de metilargininas endógenas y el daño oxidativo del grupo zinc-tiolato implicado en la unión de BH₄ y L-arginina. Además, el ONOO⁻, producto de la reacción del NO con el O₂⁻, también puede desajustar la reducción del oxígeno de la generación de NO por parte de la NOS (Förstermann and Sessa, 2012).

CICLOOXIGENASA

Como se ha mencionado anteriormente, las COX actúan sobre el ácido araquidónico liberado de las membranas celulares dando lugar a prostanoides. Las ROS y los prostanoides comparten muchos estímulos y vías de señalización intracelular, por lo que no es de extrañar que actúen de manera conjunta para inducir sus efectos biológicos, además de existir un sistema de retroalimentación positiva entre ambos mediadores (Hernanz et al., 2014). Así, el estrés oxidativo actúa como inductor de las COX, aumentando la producción de prostanoides, mientras que COX, a su vez, puede provocar la producción de ROS por ella misma y por la acción de sus prostanoides derivados (Martínez-Revelles et al., 2013; Montezano et al., 2015).

Se ha descrito que la inhibición o la supresión de COX-2 conduce a una disminución del estrés oxidativo vascular asociado a la actividad y/o expresión de la NAD(P)H oxidasa, así como a una mejora de la función vascular en la hipertensión; sin embargo, no está del todo claro si este efecto se debe a la reducción de la producción de ROS por la COX-2 o a la reducción de la síntesis de prostanoides (Hernanz et al., 2014). Referente a este último mecanismo, en hipertensión se ha observado una regulación positiva de NAD(P)H oxidasa por parte del TXA₂, además de un incremento en la expresión de NOX1 inducida por IL-1β mediada por la activación del receptor TP, así como una aumentada producción de ROS y de la expresión de NAD(P)H oxidasa por la acción de la PGF_{2α} (Hernanz et al., 2014). Además, la señalización de la PGE₂ derivada de COX-1 a través del receptor EP1 es necesaria para la formación de ROS que participan en la hipertensión inducida por Ang II, la disfunción endotelial y el deterioro del acoplamiento neurovascular; sin embargo, la PGE₂ derivada de mPGES-1 tiene un papel protector (Jia et al., 2008; Capone et al., 2010; Pena-Silva and Heistad, 2010; Cao et al., 2012).

OTROS

Las **mitocondrias** son una importante fuente celular de ROS. Existen diversos sitios de la cadena de transporte de electrones donde el oxígeno puede ser reducido a O_2^- , siendo los complejos I y III los de mayor capacidad (Hernanz et al., 2014). Estas ROS mitocondriales parecen regular importantes funciones homeostáticas vasculares en condiciones basales, contribuyendo a la vasodilatación dependiente de endotelio; sin embargo, al exponerse a factores de riesgo cardiovascular, las mitocondrias endoteliales producen un exceso de ROS que pasan a actuar como moléculas de señalización, activando vías protrombóticas y proinflamatorias, como NF- κ B, lo que representa una importante modulación de la función celular. Esto da lugar a disfunción endotelial (Dikalov, 2011; Widlansky and Gutterman, 2011). El incremento en la producción de ROS se asocia a la disfunción mitocondrial, caracterizada por un deterioro de la producción de ATP y un aumento del estrés oxidativo que conduce a la disfunción celular y a la apoptosis, lo que contribuye a la patogénesis de la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (Dikalov and Dikalova, 2019).

El **retículo endoplasmático (RE)** también constituye una importante fuente de ROS durante el metabolismo normal. Cuando las funciones del RE son anormales se produce el estrés del RE, caracterizado por una capacidad reducida de éste para plegar y procesar adecuadamente las proteínas recién sintetizadas. Además, se produce un aumento en la generación de ROS a través de las NAD(P)H oxidasas, especialmente de las isoformas NOX2 y NOX4, implicadas en la regulación de la presión arterial (Santos et al., 2014).

Las ROS también pueden ser generadas por la **LOX** y el **CYP450** como subproducto durante el paso de oxidación del ácido araquidónico (Cho et al., 2011; Sato et al., 2011).

3.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPERTENSIÓN

Existen pruebas de que el estrés oxidativo está implicado de forma crítica en la patogénesis de la hipertensión, habiéndose observado mayores niveles de ROS en pacientes hipertensos (Redón et al., 2003; Minuz et al., 2004; Ahmad, 2013; Carrizzo et al., 2013; Higashi et al., 2014), en plasma y vasos de distintos modelos de hipertensión como ratas SHR, ratas con acetato de desoxicorticosterona (DOCA) y ratones C57BL6/J infundidos con Ang II, así como niveles reducidos de NO y de las enzimas antioxidantes (Álvarez et al., 2007; Viel et al., 2008; Agarwal et al., 2009; Martínez-Revelles et al., 2013; Griendling et al., 2021). Diversos factores implicados en la hipertensión producen un incremento en los niveles de ROS; así, la Ang II constituye uno de los péptidos vasoactivos más importantes en la regulación y activación de la NAD(P)H oxidasa, junto con las citoquinas y los factores de crecimiento. La Ang II activa la NAD(P)H oxidasa, incrementa la expresión de sus subunidades (NOX1, NOX2, NOX4, p22^{phox}) e induce la generación de ROS en todas las capas vasculares a través de sus receptores AT₁R. Además, las ROS son capaces de regular GPCR, como el AT₁R, en las células vasculares, dando lugar a un “círculo vicioso” de activación (Paravicini and Touyz, 2008; Viridis et al., 2011; Montezano et al., 2015). Sin embargo, no está claro si el aumento de los niveles de ROS es causa o consecuencia de la hipertensión.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo es responsable, al menos en parte, del remodelado, la disfunción endotelial y la inflamación vascular observadas en la hipertensión (Touyz et al., 2020). Diferentes factores implicados en la patogénesis de la hipertensión, como Ang II o ET-1, median

sus efectos sobre el remodelado vascular a través de la producción de ROS y la activación de las cascadas de señalización intracelulares implicadas en la proliferación y migración de las CMLV, la generación de proteínas de la MEC y la activación de MMP, lo que induce, no solo alteraciones estructurales, sino también alteraciones de la mecánica vascular (Hernanz et al., 2014). La activación de los procesos inflamatorios sensibles al redox, como la expresión de moléculas proinflamatorias, entre ellas MCP-1, osteopontina o IL-6, la expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1 o ICAM-1, o la peroxidación lipídica, también van a contribuir al remodelado vascular en la hipertensión (Muller et al., 2000; Luft, 2001; Suematsu et al., 2002). El papel del estrés oxidativo en el remodelado vascular se ha demostrado en numerosos estudios en los que se han usado estrategias farmacológicas o genéticas (Touyz et al., 2003; García-Redondo et al., 2016; Griendling et al., 2021). En este sentido, ratones NOX1^{-/-} presentaban una reducción de la hipertrofia de la capa media de la aorta inducida por Ang II, la cual se debía a una marcada disminución de la acumulación de MEC y no a cambios en el número de CMLV (Gavazzi et al., 2006). En general, la activación de NOX1 provoca la desdiferenciación de las CMLV e induce su proliferación y migración, facilitando el remodelado vascular; sin embargo, NOX4 parece preservar el fenotipo de estas células, aunque también se ha descrito un papel en la proliferación y la migración, por lo que, dependiendo del modelo de enfermedad o de su localización celular, NOX4 puede tener efectos beneficiosos o deletéreos (García-Redondo et al., 2016).

Como se ha visto anteriormente, las ROS también pueden modular el tono vasomotor, provocando tanto vasoconstricción como vasodilatación, dependiendo del lecho vascular y del tipo de ROS y de su concentración, así como de la presencia o ausencia de endotelio (Touyz and Briones, 2011). De esta forma, el estrés oxidativo juega un importante papel en las alteraciones funcionales que se producen a nivel vascular en la hipertensión, participando en el desarrollo de la disfunción endotelial. Uno de los mecanismos mejor caracterizados por los que el estrés oxidativo altera la reactividad vascular es, como se ha comentado, su efecto sobre el NO, reduciendo su biodisponibilidad y conduciendo a la pérdida de sus efectos antiinflamatorios y vasodilatadores. Además, el papel del estrés oxidativo en el desacoplamiento de la eNOS también lleva a una reducción de los niveles de NO y a un incremento de las ROS, generando un “círculo vicioso” (Hernanz et al., 2014).

Asimismo, en la hipertensión, el estrés oxidativo induce un aumento en la producción de prostanooides por la COX, dando lugar a un aumento de la vasoconstricción y una reducción de la vasodilatación dependiente de endotelio. La COX, a su vez, puede producir ROS al oxidar el NAD(P)H; además, como se ha comentado, los prostanooides derivados de esta enzima funcionan como estimuladores autocrinos de las ROS (Martínez-Revelles et al., 2013; Touyz and Montezano, 2015). En pacientes hipertensos y modelos animales de hipertensión también se ha observado un exceso de ROS producidas por las mitocondrias, existiendo mecanismos de retroalimentación por los que las ROS derivadas de la NAD(P)H oxidasa pueden estimular la formación de radicales libres en las mitocondrias y viceversa (Dikalov and Dikalova, 2019).

Además de los efectos a nivel vascular, el estrés oxidativo también induce efectos deletéreos a nivel cardíaco, deteriorando la función contráctil al modificar las proteínas centrales del acoplamiento excitación-contracción y activando una amplia variedad de quinasas y factores de transcripción implicados en la hipertrofia, además de mediar la apoptosis (Tsutsui et al., 2011). También estimula la proliferación de fibroblastos cardíacos y activa MMP, conduciendo al remodelado de la MEC y contribuyendo al fallo cardíaco (Tsutsui et al., 2011).

Diversos estudios han utilizado distintos enfoques farmacológicos con antioxidantes o inhibidores de las diferentes fuentes de ROS, así como modelos de ratones transgénicos para las subunidades de la NAD(P)H oxidasa y otras enzimas implicadas en la generación de ROS, demostrando que, en general, estas estrategias normalizan las respuestas vasoconstrictoras aumentadas, la vasodilatación dependiente de endotelio deteriorada o ambas (Daiber and Chlopicki, 2020; Touyz et al., 2020; Griendling et al., 2021). Por ejemplo, nuestro grupo demostró en estudios *ex vivo* e *in vivo* que inhibidores de ROS, como apocinina, tempol o mito-TEMPO, reducían la aumentada respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina o serotonina y/o mejoraban la función endotelial en ratas SHR o en ratones infundidos con Ang I, y reducían la presión arterial (Álvarez et al., 2008; Martínez-Revelles et al., 2013; Hernanz et al., 2015; Avendaño et al., 2018). Sin embargo, aunque se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos analizando el uso de antioxidantes, estos no han proporcionado resultados convincentes hasta el momento (Rodrigo et al., 2021). Así por ejemplo, a pesar de que existe una relación inversa entre los niveles de ascorbato en plasma y la presión arterial, tanto en poblaciones normotensas como hipertensas, diversos estudios clínicos analizando el efecto de los suplementos de vitamina C sobre la presión arterial han arrojado resultados inconsistentes; esto posiblemente se deba a la propia farmacocinética de la vitamina C, pues se ha demostrado que para que tenga un efecto antihipertensivo se necesita una elevada concentración plasmática, inalcanzable en el ser humano mediante administración oral (González et al., 2014). Tampoco la suplementación con vitamina E ha mostrado efectos beneficiosos sobre las enfermedades cardiovasculares, existiendo incluso un estudio en el que se observa aumento de la presión arterial, la presión de pulso y la frecuencia cardíaca en pacientes con diabetes tipo 2 (González et al., 2014). La combinación de estas vitaminas en ensayos a largo plazo tampoco ha logrado respaldar sus efectos antihipertensivos de forma consistente en pacientes con alto riesgo cardiovascular (González et al., 2014). Por otra parte, aunque el tratamiento con alopurinol reduce la presión arterial en pacientes con enfermedad renal crónica, los pocos grandes ensayos controlados y aleatorizados no han demostrado un beneficio significativo sobre la mortalidad (González et al., 2014). Además, existen estudios con otros compuestos, como la Coenzima Q10 o la N-acetilcisteína, que tampoco han mostrado efectos beneficiosos en el ámbito clínico (González et al., 2014). La falta de resultados concluyentes puede deberse a los numerosos factores implicados en los efectos biológicos de estos compuestos, así como a las limitaciones existentes en la metodología utilizada para evaluar el estado antioxidante del organismo, la reactividad química frente a los radicales u otros efectos relacionados con el estrés oxidativo, los mecanismos reguladores generados por el organismo en situaciones de desequilibrio, la absorción y distribución de estos compuestos en los tejidos del organismo, o las patologías y tratamientos que puedan tener los pacientes estudiados (González et al., 2014; Siti et al., 2015; Rodrigo et al., 2021); además, existe una gran diversidad de modelos de estudio, moléculas y dosis de administración, lo cual dificulta la obtención de conclusiones definitivas (Rodrigo et al., 2021).

3.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Existen diversos mecanismos antioxidantes que mantienen un adecuado control de los niveles de ROS, unos de carácter enzimático, tales como glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasas (SODs), catalasa o el sistema tioredoxina, y otros no enzimáticos, tales como tocoferoles o el ácido ascórbico (Ebrahimian and Touyz, 2008; Touyz and Briones, 2011; Hernanz et al., 2014). La biodisponibilidad de ROS se regula de forma muy precisa mediante el equilibrio

entre la formación y su detoxificación, de manera que una alteración en cualquiera de estos mecanismos puede conducir a niveles patológicos de ROS. Entre los mecanismos antioxidantes, destaca el factor nuclear Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-related factor-2*), que activa la transcripción de genes que codifican para distintas proteínas antioxidantes, como la NAD(P)H quinona reductasa 1 (NQO1), la glutatión S-transferasa (GST), la UDP glucuronosiltransferasa, la hemoxygenasa 1 (HO-1), la tiorredoxin reductasa (Trx), las SOD 1 y 2, GPx, la glutatión reductasa (GR) o la catalasa, entre otras (Pall and Levine, 2015).

Nrf2

El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2, en humanos, y Nrf2, en ratones) es un factor de transcripción sensible a estrés oxidativo producto del gen NFE2L2. Nrf2 es una proteína cremallera de leucina (bZIP)/Cap 'n' collar (CNC), con un peso molecular de 66 kDa, que se expresa de forma constitutiva en una gran variedad de tejidos, incluyendo el sistema cardiovascular (Chen et al., 2015).

Nrf2 es el miembro más destacado de la familia de factores de transcripción CNC, cuyos miembros comparten una estructura bZIP altamente conservada. Se trata de un polipéptido de 589 residuos de aminoácidos y siete dominios, Neh1-Neh7, muy conservados entre las distintas especies (Chen et al., 2015). **Neh1** contiene el motivo bZIP/CNC, a través del cual Nrf2 heterodimeriza con proteínas Maf pequeñas (Mafs, *Muscle aponeurotic fibrosarcoma*) combinándose con secuencias de ADN (ARE, elementos de respuesta a antioxidantes). **Neh2** media la formación de heterodímeros de Nrf2 y Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), el inhibidor natural de Nrf2 en el citoplasma. Neh2 contiene dos motivos que se combinan con dos moléculas de Keap1, un motivo ETGE con fuerte afinidad y un motivo DLG con afinidad débil, los cuales son necesarios para la retención de Nrf2 en el citoplasma (Kansanen et al., 2013); también presenta un dominio hidrofílico rico en residuos de lisina y esencial para la degradación de Nrf2 mediada por ubiquitina y dependiente de Keap1. El dominio **Neh3** está situado en el extremo carboxilo de Nrf2 y es fundamental para su activación transcripcional a través de su unión con la proteína helicasa con cromodominio de unión a ADN 6 (CHD6). Los dominios **Neh4** y **Neh5** proporcionan un sitio de interacción para el cofactor nuclear RAC3/AIB1/SRC-3 y la proteína de unión a CREB (CBP), que potencia las vías de activación Nrf2/ARE, en parte promoviendo la acetilación de Nrf2. Además, Nrf2 posee una señal de exportación nuclear sensible a redox dentro del dominio de transactivación Neh5, capaz de regular su localización celular. El dominio **Neh6**, rico en serina, contiene dos motivos (DSGIS y DSAPGS) implicados en la regulación negativa de Nrf2. La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) fosforila residuos de serina dentro de Neh6, permitiendo la interacción con la proteína que contiene repeticiones de β -transducina (β -TrCP) que actúa como receptor de sustrato para el complejo ubiquitina ligasa Skp1-Cul1-Rbx1/Roc1, lo que lleva a la degradación independiente de Keap1. El dominio **Neh7** interactúa con el receptor X retinoide alfa (RXR α), responsable de la inhibición de la señalización Nrf2/ARE (Chen et al., 2015; Satta et al., 2017) (**Figura 9A**).

Keap1 es una proteína represora de Nrf2, tratándose de un polipéptido compuesto por 624 residuos de aminoácidos que forman cinco dominios: NTR (extremo N-terminal), BTB/POZ, IVR, DGR y CTR (extremo C-terminal) (Chen et al., 2015). El dominio DGR contiene seis secuencias repetitivas de doble cadena de glicina, las cuales constituyen los sitios de unión tanto a Nrf2 como al citoesqueleto celular. Dentro de DGR se encuentra el motivo Kelch que, junto con el dominio BTB/POZ, constituyen motivos de interacción proteica separados por el dominio IVR. El

dominio BTB/POZ contribuye, junto con la porción N-terminal del dominio IVR, a la formación de homodímeros de Keap1 y a la unión con la ubiquitina ligasa Cul3/Rbx1-E3. El motivo Kelch y la región CTR de Keap1 regulan la interacción entre los motivos ETGE (“pestillo”) y DLG (“bisagra”) del dominio Neh2 de Nrf2, preparando Nrf2 para su degradación mediada por ubiquitinación (Kansanen et al., 2013; Chen et al., 2015). El dominio IVR es rico en residuos de cisteína y es sensible a electrófilos y a los estímulos oxidantes externos (Chen et al., 2015) (*Figura 9B*).

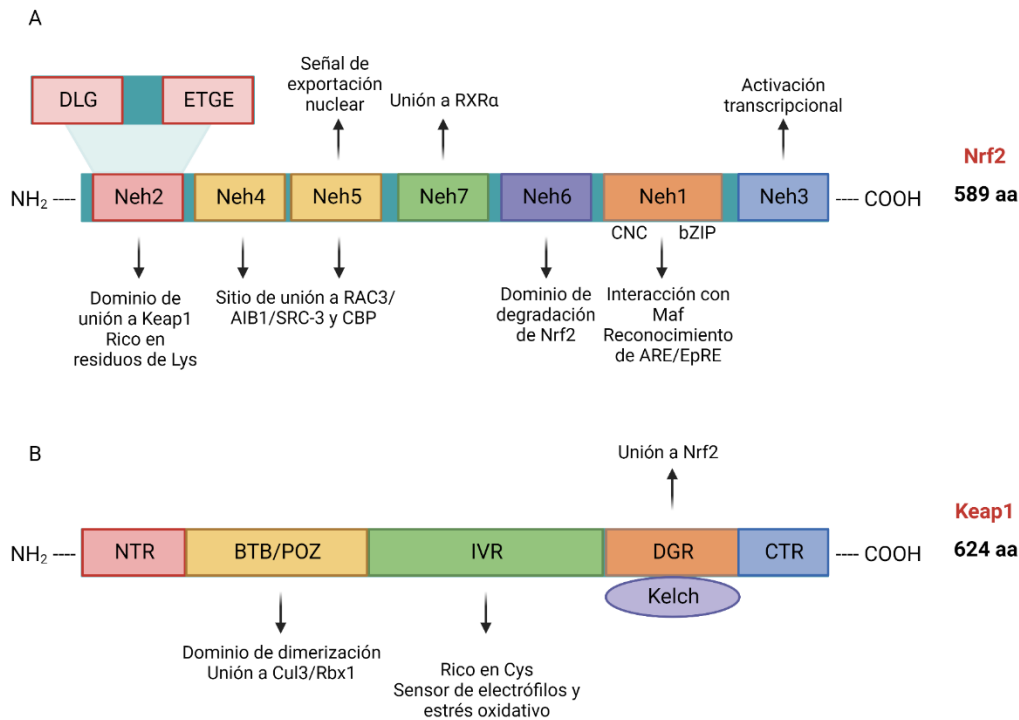


Figura 6. Estructura secundaria de las proteínas de Nrf2 y Keap1. (A) Dominios estructurales proteicos de Nrf2. Nrf2 consiste en 589 aminoácidos dispuestos en siete dominios altamente conservados. Neh1 permite la interacción de Nrf2 con las proteínas Maf y las secuencias ARE/EpRE. Neh2 media la formación de heterodímeros con Keap1 y contiene los motivos ETGE y DLG. Neh3 es fundamental para la activación transcripcional de Nrf2. Neh4 y Neh5 proporcionan un sitio de interacción con RAC3/AIB1/SRC-3 y CBP, potenciando la activación de Nrf2. Neh5 también contiene una secuencia de exportación nuclear. Neh6 constituye un dominio de degradación de Nrf2 por parte de GSK-3. Neh7 interacciona con el receptor RXRα. (B) Dominios estructurales proteicos de Keap1. Keap1 está compuesto de 624 aminoácidos formando cinco dominios: NTR, en el extremo N-terminal; DGR contiene el motivo Kelch y permite la unión a Nrf2 y al citoesqueleto celular; BTB/POZ contribuye a la formación de homodímeros de Keap1 y a la unión con Cul3/Rbx1-E3; IVR, dominio rico en residuos de cisteína y sensible a electrófilos y ROS; CTR, en el extremo C-terminal. Modificada de Chen et al., 2015. Creada con BioRender.com.

En condiciones fisiológicas, la molécula de Nrf2 se encuentra en el citosol unida a un homodímero de su proteína represora Keap1; esta proteína sirve como anclaje a filamentos de actina y/o miosina VIIa del citoesqueleto y como sustrato adaptador para la ubiquitina ligasa E3 y la degradación por el proteasoma 26S, lo que mantiene a Nrf2 en el citosol a bajas concentraciones y limita su actividad transcripcional (Buelna-Chontal and Zazueta, 2013; Chen et al., 2015) (*Figura 10*).

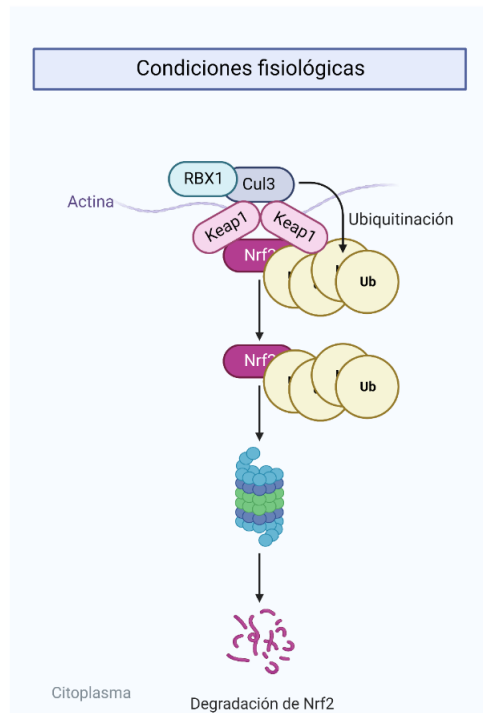


Figura 10. Nrf2 en condiciones fisiológicas se encuentra en el citosol anclada a filamentos de actina y unida a un homodímero de Keap1, lo que hará que sea poliubiquitinada y degradada en el proteosoma. Creada con BioRender.com.

▪ MECANISMOS DE REGULACIÓN DE Nrf2

Keap1 es una proteína rica en cisteína, con un total de 25 residuos de este aminoácido en ratón y 27 en humano, algunos de los cuales están situados cerca de residuos básicos y, por tanto, son susceptibles de ser estimulados por electrófilos y oxidantes (Kansanen et al., 2013; Chen et al., 2015). Se ha demostrado que tres de estos residuos están implicados en el cambio de conformación de Keap1 que conduce a la liberación de Nrf2, su translocación al núcleo y la consiguiente expresión de sus genes diana (Kansanen et al., 2013). El mecanismo exacto por el cual estos residuos de cisteína participan en la activación de Nrf2 no se conoce del todo; sin embargo, se han propuesto dos modelos para ello (**Figura 11**): 1) el modelo de disociación de Cul3, en el que las ROS y los electrófilos dan lugar a la oxidación de los residuos de cisteína de Keap1, causando un cambio conformacional que provoca la disociación de Cul3 de Keap1 y a la liberación de Nrf2; este es el modelo más aceptado para explicar cómo se produce la activación de Nrf2; y 2) el modelo de “bisagra y pestillo”, en el que los residuos de tiol presentes en el dominio IVR de Keap1 interrumpen su interacción con Nrf2, causando una desalineación de los residuos de lisina dentro de él; en este modelo, el dominio ETGE (“pestillo”) de Nrf2 permanecería unido al dominio DGR de Keap1, debido a su mayor afinidad, mientras que el dominio DLG (“bisagra”) se liberaría; sin embargo, Nrf2 no sería reconocido por la ubiquitina ligasa y no sería poliubiquitinado para su degradación. Debido a que el sitio de unión de Keap1 seguiría ocupado por Nrf2, las nuevas moléculas de Nrf2 producidas serían incapaces de unirse a Keap1 y podrían viajar al núcleo (Chen et al., 2015). En ambos modelos, Keap1 se inactiva y, en consecuencia, las proteínas de Nrf2 recién sintetizadas quedan libres en el citoplasma y se translocan al núcleo, donde afectan a la expresión de casi 500 genes (Kansanen et al., 2013; Bellezza et al., 2018).

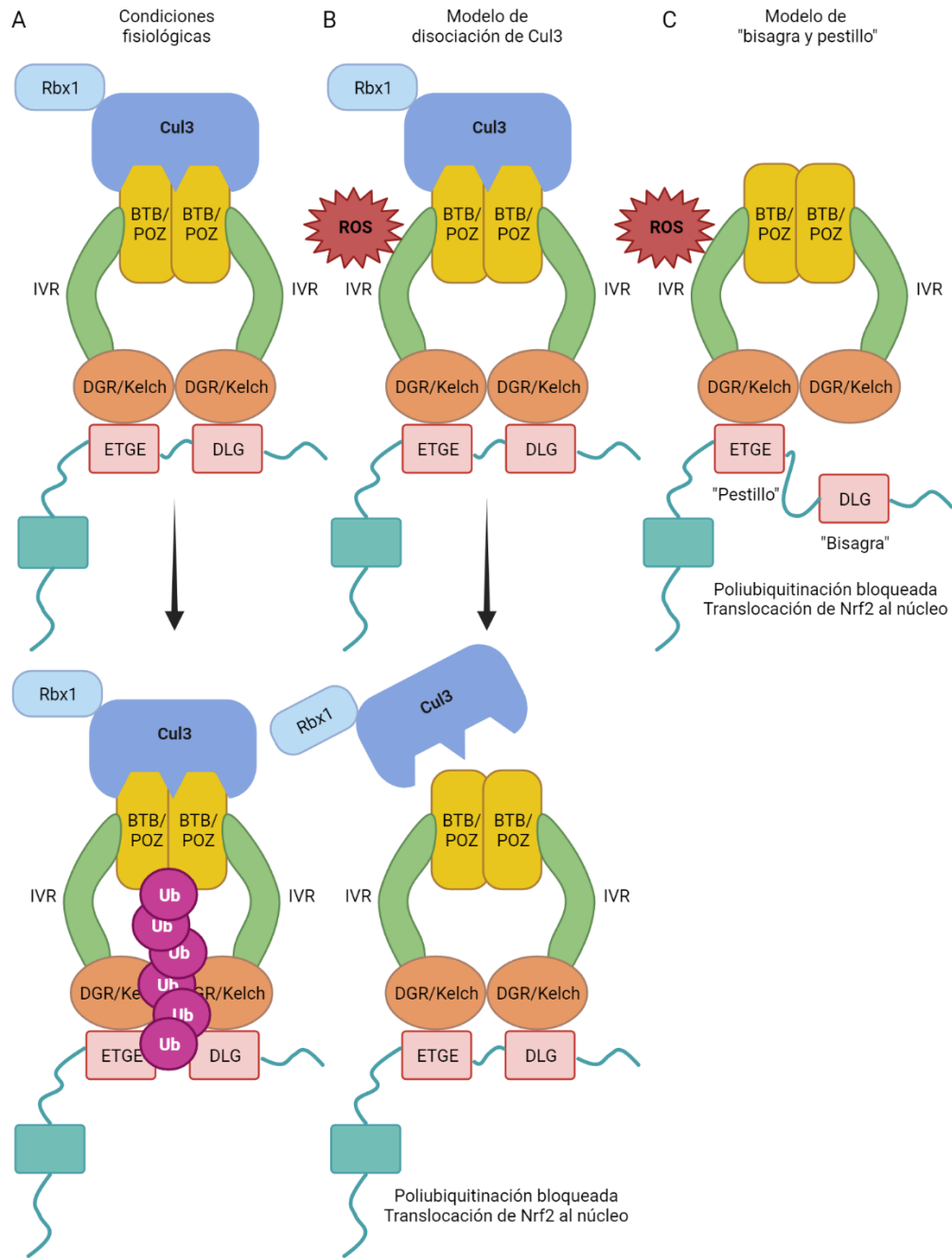


Figura 11. Modelos de interacción de Keap1 y Nrf2. (A) Interacción Nrf2-Keap1 en condiciones fisiológicas. Dos moléculas de Keap1 se unen a una molécula de Nrf2 y este es poliubiquitinado por el complejo Cul3-E3 ligasa, lo cual lleva a la degradación de Nrf2 en el proteasoma. (B, C) En condiciones de estrés, se modifican las cisteínas de Keap1 conduciendo a la inhibición de la poliubiquitinación de Nrf2 mediante la disociación del complejo inhibidor. (B) Según el modelo de disociación de Cul3, la unión de Keap1 y Cul3 se interrumpe en respuesta a electrófilos o ROS, lo que conduce al escape de Nrf2 del sistema de ubiquitinación. (C) En el modelo de "bisagra y pestillo", la modificación de residuos de cisteína de Keap1 conduce a cambios conformacionales de este que resultan en la liberación del motivo DLG de Nrf2 de Keap1; la ubiquitinación de Nrf2 se interrumpe, pero la unión con el motivo ETGE se mantiene. En ambos modelos, Keap1, modificada por el inductor y unida a Nrf2, se inactiva y, en consecuencia, las proteínas de Nrf2 recién sintetizadas eluden Keap1 y se translocan al núcleo, donde se unen a ARE/EpRE y dan lugar a la expresión de sus genes diana. Modificado de Kansanen et al., 2013. Creada con BioRender.com.

Existen otros mecanismos, además del estrés oxidativo (*Figura 12A*), por los cuales se puede activar Nrf2. Además de las modificaciones de los tioles de Keap1, la unión de Nrf2 al dominio DGR puede inhibirse competitivamente por proteínas con motivos específicos, como p21 y p62, las cuales se unen a Nrf2 o Keap1, interrumpiendo su interacción (Kansanen et al., 2013; Bellezza et al., 2018). Por otra parte, también pueden tener lugar modificaciones postraduccionales como las fosforilaciones en residuos de serina y treonina por quinasas como la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la proteína quinasa C (PKC) o miembros de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), como la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), p38 y JNK, que originan que Nrf2 se libere de su represor Keap1 (Chen et al., 2015) (*Figura 12B*). Por el contrario, otra quinasa, la GSK-3 β , regulada negativamente por PI₃K, inhibe Nrf2 promoviendo su degradación al catalizar la fosforilación de Nrf2 en su dominio Neh6; esto lleva a su reconocimiento por el complejo β -TrCP-Cul1, el cual marca Nrf2 para que sea ubiquitinado y degradado a través del proteasoma, constituyendo una vía de degradación de Nrf2 independiente de Keap1 (Huang et al., 2015; Yamamoto et al., 2018). Otro inhibidor destacado de Nrf2 es Bach1 (BTB y CNC homólogo 1), el cual forma un heterodímero con Maf y compite con Nrf2 en la unión a las secuencias ARE/EpRE, impidiendo, así, la transcripción de sus genes diana (Yu and Xiao, 2021) (*Tabla 1*).

Por otra parte, Nrf2 también está regulado por microRNAs. La sobreexpresión de cuatro microRNAs, incluyendo miR-144, miR-153, miR-27a y miR-142-5, ya sea de forma individual o en grupo, puede reducir los niveles de ARNm y proteína de Nrf2 (Huang et al., 2015). Otros microRNAs implicados en la reducción de Nrf2 serían miR-28 o miR-34a. Por otra parte, miR-200a llevaría a un incremento de Nrf2 al mediar la degradación del ARNm de Keap1 (Huang et al., 2015) (*Tabla 1*).

Uno de sus genes diana, HO-1, también está implicado en la activación de Nrf2 gracias a la acción del monóxido de carbono (CO), uno de los productos derivados de su actividad enzimática (*Tabla 1*). El CO estimula la producción de GMPc que, a su vez, estimula la acción de la proteína quinasa G (PKG), activando Nrf2. De esto se deduce que la inducción de HO-1 por parte de Nrf2 puede constituir un mecanismo de retroalimentación positiva (Pall and Levine, 2015).

Dentro de nuestra dieta también encontramos una gran variedad de nutrientes bioactivos capaces de activar la vía de señalización de Nrf2 (*Figura 12B y Tabla 1*). Entre ellos encontramos los isotiocianatos, presentes en verduras crucíferas como el brócoli o la col; los compuestos organosulfurados, presentes en el ajo y la cebolla; los polifenoles, presentes en el té verde y la cúrcuma; o las isoflavonas, presentes en la soja. En general, estos compuestos pueden estimular varias quinasas, interferir en la interacción Nrf2-Keap1 y/o perturbar el equilibrio redox en las células, dando lugar a la activación de la vía de Nrf2. Compuestos como el sulforafano (isotiocianato), la curcumina (polifenol), el trisulfuro de dialilo (DATS) (organosulfuro), la epigallocatequina-3-galato (EGCG) (polifenol), la genisteína (isoflavona) o el resveratrol (polifenol), se han sugerido como protectores contra la carcinogénesis, la neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares y la nefropatía diabética en modelos de roedores, en parte mediante la activación de la vía de Nrf2 (Huang et al., 2015; Robledinos-Antón et al., 2019).

También existen compuestos sintéticos que activan la señalización de Nrf2, como el ácido 2-ciano-3,12-dioxoleano-1,9 (11)-dien-28-oico (CDDO) y sus derivados, triterpenoides oleananos sintéticos considerados los inductores de Nrf2 más potentes; oltipraz, una ditioleona sintética, una clase de compuestos organosulfurados; la tert-butil-hidroquinona (tBHQ) y la tert-butilquinona (tBQ), productos oxidados del butilhidroxianisol (BHA), un difenol oxidable; o el

arsénico (Huang et al., 2015) (**Figura 12B**). Otros inductores de Nrf2 son el dimetilfumarato (DMF) o el ursodiol, aunque la lista de compuestos capaces de activar la vía Nrf2 es cada día mayor (Robledinos-Antón et al., 2019) (**Figura 12B y Tabla 1**). La práctica de ejercicio o la restricción calórica también pueden ejercer efectos beneficiosos mediados, en parte, por aumento de la actividad de Nrf2 (Pall and Levine, 2015) (**Tabla 1**).

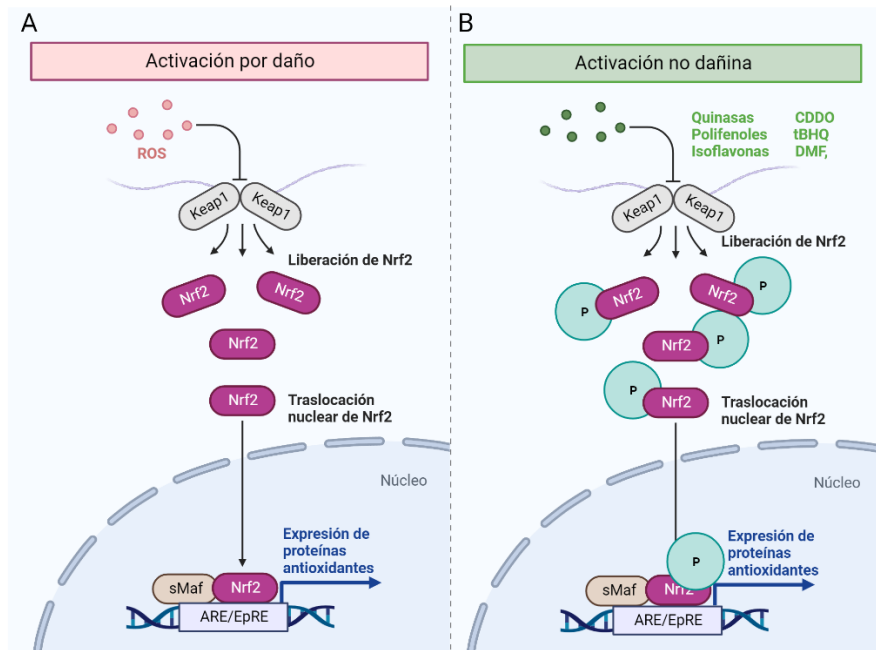


Figura 12. Mecanismos de activación de Nrf2. (A) Mecanismo de disociación de Nrf2-Keap1 por acción del estrés oxidativo. (B) Diversos compuestos, como isotiocianatos, compuestos organosulfurados, polifenoles, isoflavonas, ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11)-dien-28-oico (CDDO), tert-butilhidroquinona (tBHQ) o dimetilfumarato (DMF), entre otros, y fosforilaciones de Nrf2 por quinasas, como PI3K, PKC o MAPKs, conducen a la disociación de Nrf2-Keap1, dando lugar a su translocación al núcleo y la expresión de sus genes diana. Creada con BioRender.com.

También encontramos una amplia lista de compuestos inhibidores de Nrf2, entre ellos fármacos como la dexametasona, o compuestos naturales como la luteolina o la wogonina (Robledinos-Antón et al., 2019) (**Tabla 1**).

REGULADORES DE Nrf2	
INDUCTORES	INHIBIDORES
<ul style="list-style-type: none"> - ROS - p21 - p62 - Fosforilaciones <ul style="list-style-type: none"> • PI3K • PKC • MAPKs (ERK, p38, JNK) - MicroRNAs <ul style="list-style-type: none"> • miR-200a - HO-1 (CO) - Compuestos naturales <ul style="list-style-type: none"> • Isotiocianatos Ej. Sulforafano • Organosulfurados Ej. DATS • Polifenoles Ej. Curcumina, EGCG, resveratrol • Isoflavonas Ej. Genisteína - Compuestos sintéticos <ul style="list-style-type: none"> • CDDO • Oltipraz • tBHQ y tBQ • DMF • Ursodiol - Ejercicio físico - Restricción calórica 	<ul style="list-style-type: none"> - GSK-3β - Bach1 - MicroRNAs <ul style="list-style-type: none"> • miR-144 • miR-153 • miR-142-5 • miR-28 • miR-34a - Compuestos naturales <ul style="list-style-type: none"> • Luteolina • Wogonina • Etc. - Fármacos <ul style="list-style-type: none"> • Dexametasona

Tabla 1. Mecanismos reguladores de Nrf2. CDDO, ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11)-dien-28-oico; CO, monóxido de carbono; DATS, trisulfuro de dialilo; DMF, dimetilfumarato; EGCG, epigallocatequina-3-galato; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; GSK-3 β , glucógeno sintasa quinasa-3 β ; HO-1, hemoxigenasa-1; MAPKs, proteínas quinasas activadas por mitógenos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PKC, proteína quinasa C; tBHQ, tert-butil-hidroquinona; tBQ, tert-butil-quinona.

Una vez liberado de su represor Keap1, Nrf2 se transloca al núcleo, donde, como hemos comentado, forma heterodímeros con las proteínas Maf, MafG, MafF y MafK, una familia de reguladores transcripcionales bidireccionales bZIP, y se unen a las secuencias ARE o EpRE (elementos de respuesta a electrófilos) (Buelna-Chontal and Zazueta, 2013; Bellezza et al., 2018; Yamamoto et al., 2018) (**Figura 12**). Otros reguladores transcripcionales, como el coactivador de la familia p160, la CBP y correpresores, como el mediador de silenciamientos de los receptores retinoides y tiroideos (SMRT) o la histona deacetilasa 3 (HDAC3), interactúan con Nrf2 formando el complejo nuclear; estas proteínas moduladoras están sometidas a fosforilación, lo que supone otro punto de regulación en la activación o inactivación de la expresión génica dirigida por Nrf2 (Buelna-Chontal and Zazueta, 2013).

Esta unión de Nrf2 con las secuencias ARE o EpRE constituye la vía Nrf2/Keap1-ARE, la cual, además, inhibe la degradación de Nrf2 en el proteasoma, estabiliza su concentración plasmática y activa su translocación nuclear incrementando su actividad transcripcional, ya que la

activación de Nrf2 se regula a sí misma mediante un sistema de retroalimentación positiva (Chen et al., 2015). Además, Nrf2 estimula la transcripción del gen MafG, estimulando aún más la transcripción dependiente de Nrf2 (Pall and Levine, 2015). Sin embargo, Nrf2 también da lugar a dos mecanismos por los cuales reduce su activación, uno estimulando la transcripción del gen de Keap1 y otro estimulando la transcripción de un gen que codifica INrf2, una proteína que también disminuye su actividad (Pall and Levine, 2015).

Las **AREs/EpRE** son secuencias promotoras de ADN específicas que se encuentran en los extremos 5'-terminal de las secuencias promotoras de los genes diana de Nrf2. La activación de estas secuencias por diversos electrófilos y oxidantes desencadena la expresión de una gran variedad de genes que codifican proteínas implicadas en mecanismos de defensa antioxidante, entre los que destacan las proteínas detoxificantes de fase II, como la NQO1, la GST o la UDP glucuronosiltransferasa, que reducen la electrofilicidad de los metabolitos generados en la fase I por conjugación con compuestos como el glutatión (GSH); también se incrementa la expresión de proteínas de respuesta a estrés como la HO-1 y enzimas antioxidantes como Trx, SOD 1 y 2, GPx, GR o catalasa, entre otras, de manera que su activación protege a las células frente al daño generado por estrés oxidativo (Chen et al., 2015; Yamamoto et al., 2018).

▪ EFECTOS DE LA ACCIÓN DE Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción clave que regula la respuesta de las células frente a invasores y daño oxidativo, de manera que su degradación o inhibición hace que estas se vuelvan más sensibles y sean más vulnerables a los daños, incluso en situaciones de bajo estrés. La vía Nrf2-ARE es de gran importancia por su implicación en una amplia variedad de funciones de protección celular, con efectos antitumorales, antioxidantes, antiapoptóticos, antiinflamatorios y antiateroscleróticos, mejora de la función mitocondrial y estimulación de la autofagia, un proceso por el que se pueden degradar tanto los agregados proteicos tóxicos como los orgánulos disfuncionales (Chen et al., 2015; Pall and Levine, 2015).

Además de aumentar la capacidad antioxidante celular, Nrf2 presenta una importante actividad antiinflamatoria, la cual podría mediar su capacidad de ofrecer resistencia frente a las agresiones oxidativas y electrofílicas en las células. En relación con ello, se ha observado una mayor susceptibilidad a la inflamación inducida por LPS en ratones Nrf2^{-/-}, mientras que la activación de Nrf2 protege eficazmente frente a la mortalidad inducida por él (Thimmulappa et al., 2006). De la misma manera, ratones Nrf2^{-/-} en línea mieloide resultan ser más susceptibles a infecciones microbianas y sepsis, lo que indica que la activación de Nrf2 protege los tejidos modulando la inmunidad innata (Kong et al., 2011). Adicionalmente a su efecto beneficioso frente a la inflamación aguda, Nrf2 también mejora la inflamación crónica, habiéndose observado protección en modelos de enfermedades como asma (Sussan et al., 2015), anemia drepanocítica (Keleku-Lukwete et al., 2015) o esclerosis múltiple crónica (Linker et al., 2011). También se ha observado que la activación de Nrf2 eleva el número de células T reguladoras y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de ellas, lo que parece ser crítico, por ejemplo, para la protección del riñón tras una isquemia-reperusión (Noel et al., 2015) y sugiere la participación de Nrf2 en la actividad de la inmunidad adaptativa (Yamamoto et al., 2018).

Aunque la protección tisular mediada por Nrf2 probablemente también implique la reducción de los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) que conducen a reacciones inflamatorias secundarias, Nrf2 ejerce algunas de sus funciones antiinflamatorias antagonizando

directamente la inducción de genes proinflamatorios como IL-6 o IL-1 β (Yamamoto et al., 2018). En macrófagos originarios de la médula ósea, se ha observado que Nrf2 inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por la polarización de los macrófagos hacia su fenotipo proinflamatorio M1. Nrf2 parece interferir en la maquinaria de activación transcripcional de los genes proinflamatorios en respuesta a las señales que los inducen (Yamamoto et al., 2018).

Debido a las mencionadas acciones de protección celular inducidas por Nrf2, es probable que sus activadores ejerzan efectos beneficiosos sobre la fisiopatología de enfermedades que cursan con estrés oxidativo e inflamación, postulándose como posibles candidatos para su prevención o tratamiento.

▪ Nrf2 E HIPERTENSIÓN

Como se ha comentado anteriormente, el estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión, por lo que la activación de Nrf2 podría constituir un mecanismo beneficioso frente a las alteraciones que tienen lugar en esta patología, como la disfunción endotelial, existiendo ya evidencias de ello con compuestos que inducen este factor de transcripción (Chen et al., 2015; Satta et al., 2017).

Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de Nrf2 en diversos modelos de hipertensión resultan contradictorios. Así, en el modelo de hipertensión de ratas DOCA-*salt*, los niveles de Nrf2 en aorta son mayores que en sus correspondientes controles (Gómez-Guzmán et al., 2012); sin embargo, en el caso de ratas SHR o SHRSP, dichos niveles están reducidos en riñón (Erejuwa et al., 2012; Javkhedkar et al., 2015), arterias mesentéricas aisladas y CMLV (Lopes et al., 2015), pero aumentados en vejiga urinaria (Shimizu et al., 2014). En ratas con hipertensión inducida por L-NAME, los niveles de Nrf2 se encuentran reducidos a nivel vascular con respecto a sus controles sanos (Meeapat et al., 2021), mientras que en el modelo de hipertensión inducida por Ang II se observa un incremento en la actividad de Nrf2 en corazón (Li et al., 2011, 2012) y riñón (Brand et al., 2014), pero una reducción en células epiteliales renales (Kang et al., 2011). Algunos estudios sugieren que en hipertensión los niveles de Nrf2 se encontrarían reducidos al tener estos animales una mayor expresión de Bach1, represor de Nrf2 (Lopes et al., 2015). En cuanto a la presión arterial, se ha demostrado que el aumento de la presión inducida por Ang II era similar en ratones Nrf2^{-/-} comparado con los *wild type* (Li et al., 2011).

Los estudios realizados en modelos de hipertensión con compuestos inductores de Nrf2 han mostrado resultados prometedores, observándose efectos antihipertensivos. En este sentido, el tratamiento de ratas SHR con resveratrol incrementó los niveles nucleares de Nrf2 en células epiteliales renales que se encontraban reducidos en estos animales, lo que llevó a una reducción del estrés oxidativo, de la inflamación renal, la expresión de Ang II intrarrenal y la presión arterial (Javkhedkar et al., 2015). El resveratrol también mostró efectos beneficiosos reduciendo la inflamación renal en otros modelos de hipertensión como ratas DOCA-*salt* (Chan et al., 2011) o en hipertensión por infusión de Ang II (Inanaga et al., 2009). Asimismo, el tratamiento de ratas SHR con sulforafano mejoró la función vascular, normalizando la contracción vascular y la disfunción endotelial (Lopes et al., 2015), además de mejorar la función renal y la presión arterial (Senanayake et al., 2012). Igualmente, la dieta prolongada de ratas SHR con brotes de brócoli, el cual contiene el precursor del sulforafano, también mejoró la vasodilatación dependiente de endotelio y disminuyó el estrés oxidativo renal y vascular, así como la presión arterial (Wu et al., 2004). En el modelo de hipertensión inducida por Ang II, el sulforafano redujo la migración

anormal de las CMLV, además de la adhesión de monocitos a ellas, mostrando una disminución de la actividad inflamatoria (Zhang et al., 2019). En este mismo modelo, el tratamiento con el inductor de Nrf2 tBHQ previno los efectos deletéreos causados por Ang II, tales como el estrés oxidativo, la disfunción endotelial o el remodelado y la contractilidad de la microvasculatura y, por lo tanto, la hipertensión (Wang et al., 2018). Otros inductores de Nrf2 como la epicatequina, la curcumina o los compuestos bioactivos contenidos en la miel, tales como compuestos fenólicos, flavonoides o ácidos orgánicos, también han mejorado el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, el daño renal y la hipertensión en modelos de esta patología (Erejuwa et al., 2012; Gómez-Guzmán et al., 2012; Tapia et al., 2013). Entre los efectos beneficiosos de la activación de Nrf2, se ha descrito la prevención de la hipertrofia cardíaca (Li et al., 2011) y la fibrosis renal (Tapia et al., 2013; Aminzadeh et al., 2014), lo cual contribuiría a explicar los efectos antihipertensivos de los activadores de Nrf2. Además de todo ello, cabe destacar el papel de su gen diana HO-1, el cual, mediante su acción degradadora del grupo hemo, origina compuestos que pueden tener gran importancia en situaciones prooxidantes y proinflamatorias; este es el caso del CO en la hipertensión, debido a su acción vasodilatadora (Durante, 2010).

4. SISTEMA INMUNE E INFLAMACIÓN

4.1. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune incluye un conjunto de procesos que permiten al organismo vivo discriminar entre lo “propio” y lo “no propio”, así como generar una respuesta dirigida hacia invasores específicos. Este sistema tiene tres funciones principales: 1) proteger al organismo de los invasores que producen enfermedades (patógenos), 2) eliminar las células muertas o dañadas, como eritrocitos viejos y 3) intentar reconocer y eliminar células anormales que aparecen cuando el desarrollo y crecimiento celulares normales no son correctos, aunque a veces no es capaz de cumplir estas funciones adecuadamente (Silverthorn, 2008).

Las células del sistema inmune, los leucocitos, se originan en la médula ósea, donde algunas de ellas también maduran, migrando después a tejidos periféricos a través de la sangre y del sistema linfático. Todos los elementos formes de la sangre, incluyendo los glóbulos blancos del sistema inmune, proceden de las células madre hematopoyéticas pluripotentes de la médula ósea. De estas células derivan dos tipos celulares más especializados que darán lugar a los distintos elementos formes: los progenitores mieloides y los progenitores linfoides (Murphy and Weaver, 2016).

Los **progenitores mieloides** dan lugar a los proeritroblastos y megacarioblastos que producen, respectivamente, los eritrocitos y las plaquetas, y a los mieloblastos que dan lugar a distintos tipos de células inmunes: granulocitos, células dendríticas, mastocitos y macrófagos. Dentro de los **granulocitos**, también llamados leucocitos polimorfonucleares, encontramos tres tipos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, todos ellos con una vida relativamente corta. Los **neutrófilos** son el componente celular más numeroso e importante de la respuesta inmune innata, capaces de fagocitar y matar bacterias, por lo que son muy importantes en la respuesta frente a infecciones bacterianas; los **eosinófilos** son importantes, sobre todo, en la defensa frente a infecciones parasitarias y están implicados en la inflamación alérgica; y los **basófilos** participan en los procesos inmunitarios frente a parásitos, en procesos alérgicos e inflamación, aunque son muy escasos en sangre. **Las células dendríticas** están especializadas en captar antígenos y

mostrarlos para que sean reconocidos por los linfocitos, siendo sus más potentes estimuladoras. Las células dendríticas inmaduras migran desde la sangre hasta los tejidos, donde, al encontrarse con un patógeno, maduran para migrar a los ganglios linfáticos. Los **mastocitos** residen principalmente cerca de los vasos sanguíneos pequeños y, al activarse, liberan sustancias que afectan a la permeabilidad vascular. Aunque son más conocidos por su papel en las respuestas alérgicas, se cree que desempeñan un papel importante en la protección de las superficies mucosas frente a patógenos (Murphy and Weaver, 2016).

Los **macrófagos** son células fagocíticas distribuidas ampliamente en los diferentes tejidos, donde poseen un papel fundamental en la inmunidad innata eliminando patógenos invasores, células apoptóticas y desechos, manteniendo así la integridad tisular. Inicialmente se pensaba que los macrófagos tisulares derivaban de los monocitos que salen de la sangre durante la inflamación; sin embargo, se ha propuesto que los macrófagos derivados de monocitos se originan en la médula ósea diferenciándose de forma terminal, mientras que los progenitores de los macrófagos tisulares derivan del saco vitelino y el hígado fetal, conservando su potencial de autorrenovación (Murphy and Weaver, 2016; Viola et al., 2019).

Los macrófagos presentan una notable plasticidad, que se manifiesta en una diferenciación funcional y fenotípica denominada polarización. Suelen clasificarse en M1 y M2, siendo los M1, derivados de la activación clásica de los macrófagos, proinflamatorios, al expresar enzimas como COX-2 e iNOS y producir citoquinas como IL-1 β , TNF α , o IL-6, y ROS; los M2, derivados de la activación alternativa, son antiinflamatorios y profibróticos, al secretar IL-10 y TGF β . La polarización de los macrófagos hacia M1 es inducida por productos microbianos, como LPS y otros ligandos de los receptores TLR, así como por citoquinas secretadas por los linfocitos Th1, como IFN γ y TNF α , mientras que la polarización hacia M2 se induce por IL-4 o IL-13 secretadas por las células del sistema inmune innato y adaptativo (Harwani, 2018). Sin embargo, clasificar los macrófagos no es tan fácil, ya que la gran variedad de estímulos que reciben dará lugar a numerosas subpoblaciones (Leopold Wager and Wormley, 2014; Harwani, 2018; Viola et al., 2019). Así, además de los clásicos M1 y M2, se han descrito otros subtipos de macrófagos como los M(Hb), inducidos por hemoglobina, y los Mhem, inducidos por el grupo hemo, ambos con acción antiinflamatoria; los Mox, inducidos por fosfolípidos oxidados y con acción antioxidante, los M4, inducidos por la quimiocina CXCL4 y con acción proinflamatoria y distintos tipos de macrófagos M2 (M2a, M2b, M2c y M2d) (Harwani, 2018; Deng et al., 2020).

A nivel funcional, los macrófagos se caracterizan por su capacidad de eliminar patógenos y presentar sus antígenos a los linfocitos T para que inicien las respuestas adaptativas (Harwani, 2018). Se sabe que los macrófagos M1 activan a los linfocitos Th1, mientras que los macrófagos M2 están asociados a la inducción de respuestas de linfocitos Th2 (Harwani, 2018; Viola et al., 2019). Los macrófagos M1 metabolizan la L-arginina a NO a través de la iNOS; sin embargo, también producen ROS que van a reducir la biodisponibilidad del NO. Los macrófagos M2, por su parte, metabolizan la L-arginina a través de la arginasa-1 a ornitina, la cual promueve el crecimiento tisular, la reparación y la fibrosis (Harwani, 2018).

Las funciones de los macrófagos dependen de señales extracelulares, algunas de las cuales implican cambios en el flujo de iones, los cuales, a su vez, modulan la red de señalización intracelular. Los canales K_v están presentes en los macrófagos y pruebas experimentales indican que las corrientes K_v en estas células son mediadas por heterotetrámeros K_v1.3/K_v1.5 (Vicente et al., 2006; Villalonga et al., 2010; Moreno et al., 2013); sin embargo, diferentes estímulos pueden cambiar la estequiometría de estos canales. Así, la proliferación y activación clásica (M1)

de los macrófagos aumentan las corrientes $K_v1.3$ por dos mecanismos: 1) el aumento de la relación $K_v1.3/K_v1.5$ y/o 2) la formación de una cierta cantidad de homotetrámeros $K_v1.3$. Por el contrario, la activación alternativa (M2) disminuye el nivel de canales $K_v1.3$ (Villalonga et al., 2010; Moreno et al., 2013). En este sentido, los canales $K_v1.3$ parecen participar en la regulación fenotípica de los macrófagos, cambiando la polarización hacia uno u otro tipo de macrófagos el microambiente y, por tanto, modificando las funciones de diferentes tejidos.

Los **progenitores linfoides** dan lugar a los linfoblastos, precursores de los linfocitos, las células responsables de la respuesta inmune adaptativa. Existen distintos tipos de linfocitos, los cuales son responsables de la inmunidad humoral y celular. Los dos tipos principales de linfocitos son los linfocitos o células B, que cuando se activan se diferencian en células que secretan anticuerpos o células plasmáticas, y los linfocitos o células T, que se diferencian en el timo en células T efectoras con una gran variedad de funciones. Una vez completan su maduración, los linfocitos entran en el torrente sanguíneo y migran hacia los órganos linfoides periféricos. Las células T se clasifican en dos tipos principales: las células T citotóxicas, que eliminan las células infectadas por virus y presentan proteínas de membrana $CD8^+$, y las células T *helper*, que activan otras células inmunes como linfocitos B y macrófagos y tienen proteínas de membrana $CD4^+$. Los linfocitos **natural killer (NK)** forman parte del sistema inmune innato y son capaces de reconocer y eliminar células anormales, como células tumorales y células infectadas por virus, por lo que son importantes en la defensa contra patógenos intracelulares (Murphy and Weaver, 2016).

Nuestra visión del sistema inmune ha cambiado drásticamente en las últimas décadas. La función principal de este sistema clásicamente se ha considerado la defensa del organismo frente a patógenos; sin embargo, los efectos de las células y factores inmunes van más allá, extendiéndose a procesos fisiológicos, como el desarrollo, la homeostasis y la reparación tisular (Sattler, 2017). Además, recientemente se ha establecido una relación entre la inflamación con la elevación de la presión arterial, así como con los daños asociados a la misma. En este sentido, se ha descrito que tanto la inmunidad adaptativa, destacando el papel de los linfocitos T, (Guzik et al., 2007; De Ciuceis et al., 2014; Xiao and Harrison, 2020) como células del sistema inmune innato, entre ellas los macrófagos (Rucker and Crowley, 2017), están implicadas en la hipertensión (Caillon et al., 2019). Las células inmunitarias se infiltran en los vasos, los riñones, el corazón y el cerebro, produciendo citoquinas proinflamatorias y quimiocinas (Norlander et al., 2018; Caillon et al., 2019). En la hipertensión, existe un incremento en la expresión de DAMPs, que son reconocidos por el sistema inmune y son los responsables de la inflamación crónica presente en esta enfermedad. El origen de estos DAMPs es incierto; sin embargo, existen ciertas moléculas conocidas como DAMPs, como la Ang II, fragmentos de la fibronectina, el fibrinógeno o el ácido úrico, cuyos niveles están crónicamente elevados en hipertensión (Okamura et al., 2001; Bomfim et al., 2019). Estos DAMPs son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRPs) del sistema inmune innato, entre los que encontramos los receptores tipo Toll (TLR) y el receptor similar al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (NLR, *NOD-like receptor*), presentes en el sistema cardiovascular, que iniciarán la respuesta inmune (Bomfim et al., 2019). Aunque la respuesta inmune está orquestada principalmente por células del sistema inmune, como macrófagos o células dendríticas, otras células no inmunes, como las células endoteliales, los cardiomiocitos o los fibroblastos, expresan estos PRPs y pueden contribuir activamente a la respuesta inmune a través de la señalización de estos receptores (Jaén et al., 2020).

4.2. RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación aguda es la respuesta inmediata e inespecífica a organismos invasores, cuerpos extraños, células necróticas, irritantes o células neoplásicas, que implica el reclutamiento local y la activación de neutrófilos y sirve para erradicar el estímulo que la provoca, eliminando los microbios y los restos celulares. Si tiene éxito, la inflamación aguda se resuelve, restaurando la arquitectura normal del tejido o formando una cicatriz de tejido conectivo. Si, por el contrario, el estímulo no se elimina, este pasa de ser percibido por los PRPs de las células del sistema inmune innato a ser reconocido como antígeno por los receptores activadores de células T y B de la inmunidad adaptativa, las cuales pueden potenciar las funciones efectoras de los fagocitos mononucleares o reclutar otras células efectoras, como los eosinófilos, dando lugar a una inflamación crónica (Pober and Sessa, 2007). Esta respuesta inflamatoria implica una acción coordinada de las células inmunitarias, la pared vascular y los mediadores químicos/humorales, donde las células endoteliales vasculares desempeñan un importante papel, ya que cambian su fenotipo para apoyar las distintas fases del proceso inflamatorio (Pober and Sessa, 2007; Xiao and Harrison, 2020).

Los inflamomas comprenden un grupo de complejos proteicos que inducen una respuesta inflamatoria al detectar factores de estrés exógenos y endógenos. Desempeñan un papel importante en la inmunidad y, en particular, el inflamoma NLRP3 está implicado en la patogénesis de enfermedades como la aterosclerosis, la diabetes tipo 2 o la gota (Garstkiewicz et al., 2017). Los inflamomas están formados por un sensor central, como es NLRP3, la proteína adaptadora ASC y la proteasa caspasa-1. Al detectarse un factor de estrés, los inflamomas se ensamblan, la caspasa-1 se activa y procesan y activan las citoquinas pro-IL-1 β y pro-IL-18, dando lugar, respectivamente, a IL-1 β y IL-18, las cuales inducen la inflamación tras su secreción (Garstkiewicz et al., 2017).

Ya hemos comentado que, actualmente, la hipertensión se asocia con un proceso inflamatorio; sin embargo, en este caso, se produce una respuesta inflamatoria estéril, ya que esta se inicia por un estímulo estresante o por DAMPs presentes en el organismo, como la Ang II, y no por la presencia de un patógeno u organismo invasor. Esta respuesta al estrés se denomina respuesta universal de peligro celular (RPC) y en ella se produce la activación del inflamoma, el cual se encarga de activar los procesos inflamatorios. A largo plazo, se produce alteración del metabolismo de todo el cuerpo, afectando al rendimiento de múltiples sistemas y conduciendo a hipertensión. Mecanismos similares están implicados en otras enfermedades crónicas, como enfermedades renales, hepáticas y cardíacas, diabetes o cáncer (Naviaux, 2014).

En términos generales, la inflamación vascular suele comenzar con la activación endotelial y la expresión de diversas moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 que atraen a diferentes células del sistema inmune (Libby, 2006). En esta respuesta inflamatoria, se produce un aumento en la permeabilidad vascular con cambios en las propiedades endoteliales que favorecerán el rodamiento, la adherencia y la diapédesis de diversas células inmunitarias (Xiao and Harrison, 2020). Estas células inmunitarias, junto con células residentes en el tejido afectado, amplifican la señal inflamatoria aumentando la expresión de citoquinas como IFN, ILs, quimiocinas, linfocinas o TNF (Kofler et al., 2005; Libby, 2006). Estas citoquinas son producidas principalmente por los linfocitos B y T; sin embargo, también las producen otras células inmunes, las células endoteliales activadas, las CMLV o los fibroblastos. Entre las citoquinas proinflamatorias destacan IFN γ , TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 o IL-12, mientras que entre los compuestos antiinflamatorios encontramos TGF- β , IL-4, IL-10, IL-11 o IL-13 (*Figura 13*). El desequilibrio entre

los mediadores pro y antiinflamatorios constituye un mecanismo fisiopatológico común en diferentes enfermedades cardiovasculares, entre ellas, la hipertensión, mecanismo que parece estar relacionado con la disfunción endotelial (Kofler et al., 2005; Vicenová et al., 2009; Karbach et al., 2014).

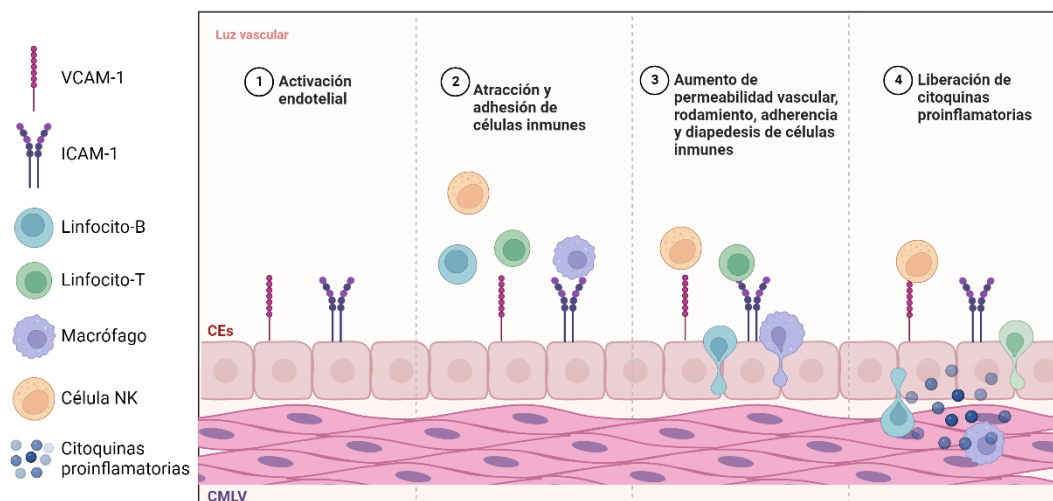


Figura 13. Proceso de inflamación vascular. La inflamación vascular comienza con la activación endotelial, la cual dará lugar a la expresión de moléculas de adhesión y el reclutamiento de células inmunes. El aumento de la permeabilidad vascular y los cambios en las células endoteliales favorecerán el rodamiento, la adherencia y la diapédesis de las células inmunes, las cuales, junto con las células de la pared vascular, liberarán citoquinas proinflamatorias, como IFN, IL, quimiocinas, linfocinas o TNF. CEs, células endoteliales; CMLV, células musculares lisas vasculares; ICAM-1, molécula de adhesión intracelular 1; VCAM-1, molécula de adhesión vascular 1. Creada con BioRender.com.

4.3. INFLAMACIÓN EN HIPERTENSIÓN

En los últimos años, diversos estudios han sugerido la existencia de un estado inflamatorio en hipertensión, en el cual se activan células del sistema inmune innato y adaptativo que invaden los tejidos diana y que, a través de la producción de citoquinas y quimiocinas, promueven el daño vascular, renal, cardíaco y cerebral que acompaña a esta patología (Norlander et al., 2018).

Todos los tipos celulares implicados en la inmunidad innata y adaptativa se han relacionado con la hipertensión arterial, demostrándose de forma más concreta la implicación de los linfocitos T, tanto CD8⁺ como CD4⁺, en algunas de las alteraciones asociadas a la hipertensión, como la disfunción endotelial o la rigidez vascular, mediante la secreción de diversas citoquinas (IL-17A, INF γ , TNF α , etc.) y quimiocinas (McMaster et al., 2015; Norlander et al., 2018). Además de los linfocitos T, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas también tienen un papel importante en la hipertensión a través de mecanismos que incluyen, entre otros, la activación del inflammasoma, con la consiguiente maduración y producción de IL-1 β e IL-18 (Zhang et al., 2016).

En la pared vascular, las células inmunes se acumulan especialmente en la grasa perivascular y en la adventicia, desde donde secretan ROS, citoquinas y MMP (McMaster et al., 2015; Norlander et al., 2018). Aunque las células inmunes son importantes fuentes de ROS, las citoquinas liberadas por ellas difunden por la pared vascular estimulando la producción de más

ROS en las CMLV y el endotelio mediante la activación de enzimas como la NAD(P)H oxidasa (McMaster et al., 2015), las cuales estimulan la expresión de multitud de genes y proteínas inflamatorias, como las isoformas inducibles de COX (COX-2) y NOS (iNOS), así como la mPGES-1, entre otras (Briones et al., 2000; Adeagbo et al., 2005; Alvarez et al., 2005; Jia et al., 2008, 2010). Estas enzimas son responsables de la producción de prostanoideos y de más ROS (Drummond et al., 2011; Touyz and Briones, 2011), las cuales, como se ha comentado, afectan al mantenimiento del tono vascular, el crecimiento y diferenciación celular, la apoptosis, la deposición de proteínas de matriz extracelular o la propia inflamación. Por lo tanto, los mecanismos inflamatorios que tienen lugar en la pared vascular en la hipertensión influyen activamente en la disfunción endotelial, el remodelado vascular y el aumento de la rigidez y, por lo tanto, en la aumentada resistencia vascular (McMaster et al., 2015; Norlander et al., 2018).

Entre los mecanismos responsables de esta respuesta inflamatoria se han descrito el estrés de la pared vascular dependiente de la presión o factores humorales como la Ang II. Los efectos deletéreos de Ang II están relacionados con sus acciones proinflamatorias tanto en la pared vascular como en otros órganos y tejidos. Así, Ang II induce la activación de diferentes rutas de señalización intracelular que, a su vez, llevan a la activación de factores de transcripción como NF- κ B o NFAT, entre otros, desencadenando la producción de citoquinas inflamatorias y moléculas de adhesión, e induciendo la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2 o mPGES-1 (Alvarez et al., 2005; Savoia and Schiffrin, 2007; Jia et al., 2008; Wang et al., 2008; Beltrán et al., 2009; Aguado et al., 2015; Avendaño et al., 2016, 2018). La activación de diferentes fuentes productoras de ROS por parte de Ang II también estimula vías de señalización sensibles a cambios redox que contribuyen a la respuesta inflamatoria vascular (Touyz and Briones, 2011; Viridis et al., 2011). Entre los mecanismos por los que Ang II activa el sistema inmune innato se incluye la activación del complemento y la liberación de otras DAMPs, que activan los receptores TLR. La producción de ROS dependiente de NAD(P)H oxidasa inducida por el estímulo hipertensivo no solo tiene lugar a nivel vascular, sino que también se produce en células inmunes como los macrófagos, los linfocitos T o las células dendríticas, donde conduce a la formación de neoantígenos que pueden activar a los linfocitos T y a otras células del sistema inmune adaptativo (Guzik et al., 2007; McMaster et al., 2015; Wenzel et al., 2016).

Ang II, a través de sus receptores AT₁R, también promueve la diferenciación, movilización y activación de monocitos proinflamatorios en el corazón, los vasos y los riñones. Los macrófagos M1 que se acumulan en el intersticio renal migran al subendotelio vascular y producen citoquinas inflamatorias y ROS, lo que origina fibrosis renal y daño vascular. Sin embargo, la activación de los receptores AT₁R directamente en los macrófagos suprime su polarización M1 y reduce el daño causado por Ang II en los órganos diana (Rucker and Crowley, 2017).

En la hipertensión se produce un incremento en la activación del SNS, el cual juega un papel en la activación tanto de las células T como de las células mieloides, mediante la inervación de la médula ósea, el bazo y los nódulos linfáticos (Singh et al., 2014a; Norlander et al., 2018). Esta actividad simpática incrementada también contribuye a la polarización y movilización de los macrófagos, como parte de la interacción neuroinmune (Harwani, 2018). Así, la activación del nervio simpático espláncico en respuesta a la infusión de Ang II en el SNC aumenta las citoquinas proinflamatorias M1 en algunos reservorios inmunes, como el bazo; de hecho, la inervación simpática en este órgano es necesaria para la hipertensión inducida por Ang II. El aumento de la actividad nerviosa simpática a nivel renal también participa en la activación de los macrófagos (Harwani, 2018). Además, esta sinapsis neuroinmune es bidireccional, ya que las citoquinas

liberadas por las células inmunes pueden potenciar la actividad simpática a través de su acción en el SNC, lo que a su vez aumenta la movilización, migración e infiltración de las células inmunes en los órganos (Singh et al., 2014a; McMaster et al., 2015).

5. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

El sistema **renina-angiotensina (SRA)** es un sistema vital para el cuerpo humano, encargado de controlar la concentración plasmática de Na^+ , la presión arterial y el volumen extracelular, manteniendo así el tono vascular; por ello, alteraciones en este sistema pueden afectar a la presión sanguínea, llevando a enfermedades agudas o crónicas o incluso a la muerte súbita, jugando un papel fundamental en el desarrollo de la hipertensión (Patel et al., 2017; Takimoto-Ohnishi and Murakami, 2019).

Estímulos como la presión arterial baja, la baja concentración de NaCl en la sangre o la activación del sistema nervioso simpático inducen la expresión de la renina (o angiotensinogenasa) y su secreción por las células yuxtaglomerulares del riñón. Este enzima hidroliza el angiotensinógeno liberado a nivel hepático dando lugar a angiotensina I (Ang I), un decapeptido que es sometido a un proceso de escisión, principalmente en los capilares pulmonares, las células endoteliales y las células epiteliales del riñón, por parte de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) unida al endotelio, que la convierte en Ang II (Patel et al., 2017). Además de la ECA, existen otras vías por las que la Ang I puede convertirse en Ang II, las cuales pueden ser particularmente importantes en situaciones patológicas. Entre ellas encontramos la activación de la quimasa, que puede representar una importante vía de producción de Ang II en el corazón y el riñón (Touyz and Schiffrin, 2000). La Ang I también puede convertirse en el heptapeptido Ang 1-7 por tres endopeptidasas tisulares, la endopeptidasa neutra (NEP) 24.11, la NEP 24.15 y la NEP 24.26, (Touyz and Schiffrin, 2000; Patel et al., 2017). Además, existe una segunda ECA (ECA 2) que hidroliza la Ang I a Ang 1-9 y la Ang II a Ang 1-7, siendo la formación de Ang 1-9 a partir de Ang I considerablemente más lenta que la hidrólisis de Ang II a Ang 1-7. La Ang 1-7 también puede formarse a partir de Ang 1-9 por la acción de la ECA (Rüster and Wolf, 2006; Ocaranza and Jalil, 2012). La Ang II, además, puede ser degradada por la aminopeptidasa A a Ang III, y esta, a su vez, a Ang IV por la aminopeptidasa N. La Ang II también puede transformarse en Ang 1-9 por la acción de endopeptidasas (**Figura 14**).

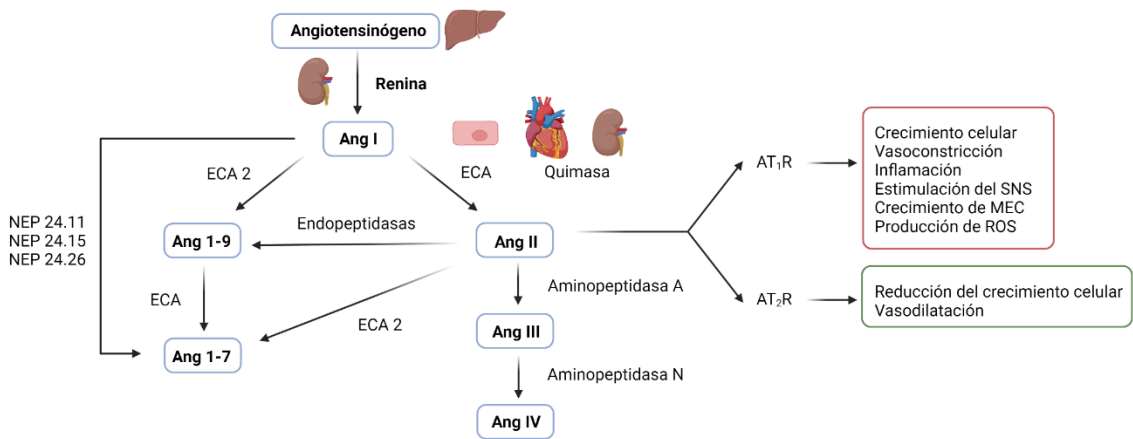


Figura 14. Esquema del sistema renina-angiotensina (SRA) y principales efectos de Ang II. Ang, angiotensina; AT₁R, receptor de angiotensina II tipo 1; AT₂R, receptor de angiotensina II tipo 2; ECA, enzima convertidora de angiotensina; NEP, endopeptidasa neutra. Creada con BioRender.com.

Como se ha mencionado anteriormente, la Ang II es el principal péptido efector del SRA, siendo un potente vasoconstrictor. Además de aumentar la presión arterial, la frecuencia cardíaca y el potencial protrombótico, la Ang II actúa a nivel de la corteza de la glándula suprarrenal para que secrete aldosterona, la cual mantiene la homeostasis de Na⁺ y K⁺ aumentando la reabsorción de Na⁺ en los túbulos distales del riñón, lo que conduce a una retención de este catión y a una pérdida de K⁺; además, actúa sobre el hipotálamo, estimulando el reflejo de la sed y la secreción de la hormona antidiurética; también influye en la secreción de la hormona adrenocorticotrófica, que regula la producción de cortisol en las glándulas suprarrenales. Además, puede promover la lipogénesis, aumentando la masa del tejido adiposo, por lo que se ha relacionado con la inflamación adiposa, la intolerancia a la glucosa y la resistencia a insulina (Patel et al., 2017).

La Ang II ejerce sus acciones biológicas al unirse a dos subtipos distintos de GPCRs, el receptor de Ang tipo 1 (**AT₁R**) y el receptor de Ang tipo 2 (**AT₂R**), aunque está bien establecido que la mayoría de sus efectos fisiológicos los ejerce a través de la estimulación de AT₁R. Tanto AT₁R como AT₂R juegan un papel importante en la regulación de las CMLV y los componentes de la matriz extracelular. Las vías de señalización de estos dos receptores son totalmente diferentes. Así, AT₁R, que se encuentra predominantemente en tejido adulto, estimula la fosforilación de varias proteínas que contienen tirosina, como Jak 2, Stat 1 y MAPK, además de mecanismos clásicos de transducción de señales como fosfolipasas C, D, A, canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y adenilato ciclasa, y la NAD(P)H oxidasa; la activación de este receptor se asocia con crecimiento celular en el corazón y las arterias, vasoconstricción generalizada, estimulación del sistema nervioso simpático, inflamación, y la producción de componentes de la MEC y de ROS (Touyz and Schiffrin, 2000; De Gasparo, 2002). Por su parte, AT₂R se expresa abundantemente en los tejidos fetales, pero en baja densidad en los adultos, aunque su expresión se incrementa en diversas situaciones patológicas, como la insuficiencia cardíaca. En cuanto a la vía de señalización, AT₂R estimula un mecanismo intracelular en el que participan diversas fosfatasa Tyr (tirosina) y Ser/Thr (serina/treonina), NO/GMPC y fosfolipasa A₂, contrarrestando los efectos de AT₁R; los efectos de la unión a AT₂R incluyen la inactivación de la MAPK, inhibición del crecimiento celular, promoción de la apoptosis, apertura de canales de K⁺ de rectificación

retardada, cierre de canales de Ca^{2+} de tipo T y estimulación de la diferenciación y regeneración nerviosa (De Gasparo, 2002) (*Figura 14*). El hecho de que los efectos mediados por ambos receptores sean antagónicos ha planteado la hipótesis de que la estimulación de AT_2R formaría parte del mecanismo de acción de los antagonistas de AT_1R (Touyz and Schiffrin, 2000; De Gasparo, 2002; Savoia and Volpe, 2011; Forrester et al., 2018). Como se ha comentado, predomina la acción de Ang II a través de sus receptores AT_1R , lo que favorece un incremento en el tono miogénico, en la respuesta proinflamatoria (con infiltración de macrófagos), el crecimiento celular y la fibrosis de la pared vascular y, por tanto, contribuye a las alteraciones vasculares observadas en la hipertensión (Savoia and Volpe, 2011).

5.1. SRA EN HIPERTENSIÓN

El SRA es uno de los mecanismos hormonales más importantes en el control de la estabilidad hemodinámica mediante la regulación de la presión arterial, el volumen de líquidos y el equilibrio $\text{Na}^+\text{-K}^+$, por lo que una alteración en cualquiera de las moléculas que lo componen contribuye al desarrollo de patologías como la hipertensión (Muñoz-Durango et al., 2016).

En un principio, se creía que el SRA era un sistema exclusivamente circulante que únicamente controlaba la presión arterial; sin embargo, se han identificado algunos de sus componentes en diversos tejidos y órganos como el cerebro, el riñón, la corteza adrenal, el corazón o la propia pared vascular, así como en las células inmunes (Touyz and Schiffrin, 2000; Bader et al., 2001; Guzik et al., 2007; Kobori et al., 2007), por lo que se ha propuesto que el SRA local tiene una función paracrina con importancia fisiológica para los tejidos en los que se expresa, estando implicado en los daños que se producen en los órganos diana en la hipertensión (Bavishi et al., 2016; Muñoz-Durango et al., 2016).

La hipertensión se ha relacionado con un incremento en la actividad del SRA y en los niveles circulantes de Ang II, habiéndose descrito que la infusión de este péptido aumenta la presión arterial (Ryan et al., 2004); además, algunos autores han observado en hipertensión niveles aumentados de AT_1R , receptor a través del cual Ang II ejerce sus efectos hipertensivos (Dhar et al., 2013; Bhatt et al., 2014). Además de los conocidos efectos de Ang II a nivel central y renal, sus acciones vasculares pueden contribuir a explicar el incremento en la presión arterial atribuido al SRA. Así, la Ang II no solo está implicada en la vasoconstricción, si no que estimula la proliferación celular en las CMLV a través de diferentes vías implicadas en el crecimiento, inflamación, migración y respuestas fibróticas (Rajagopalan et al., 1996; Touyz and Schiffrin, 2000; Ruiz-Ortega et al., 2001; Taniyama et al., 2004; Wu et al., 2005; Ruiz-Ortega et al., 2006); esto sugiere un papel crucial de este péptido en la integridad y funcionamiento de la pared vascular, de manera que el incremento en los niveles de Ang II observado en la hipertensión juega un papel importante en las alteraciones observadas en esta patología, tanto a nivel funcional como estructural (Mehta and Griendling, 2007). La Ang II participa en el remodelado vascular asociado a la hipertensión regulando procesos como el crecimiento celular, la hipertrofia y la fibrosis tisular, así como facilitando la producción y deposición de componentes de la MEC (Schiffrin and Touyz, 2004). Además, estos cambios estructurales van acompañados de alteraciones en la función vascular, incrementándose la producción de sustancias contráctiles y sus respuestas vasoconstrictoras, así como el deterioro de las relajaciones dependientes de endotelio (Schiffrin and Touyz, 2004; Mehta and Griendling, 2007).

Otro mecanismo por el cual Ang II contribuye a las alteraciones estructurales y funcionales asociadas a la hipertensión es la aumentada producción de ROS, que da lugar a reducción en la biodisponibilidad de NO, proliferación de monocitos e inducción de la síntesis de prostanoïdes (Rajagopalan et al., 1996; Schieffer et al., 2000; Álvarez et al., 2007; Dikalov et al., 2008; Zhao et al., 2015; Bavishi et al., 2016). El efecto proinflamatorio de Ang II a nivel local, junto con el incremento de la permeabilidad endotelial y de la expresión de moléculas de adhesión que permiten el reclutamiento de células inmunes, también contribuyen a las alteraciones vasculares que acompañan a la hipertensión (Pagé et al., 2002; Suzuki et al., 2003; Touyz, 2005).

Por todos estos efectos, no es sorprendente que el SRA se haya convertido en un objetivo terapéutico clave para el tratamiento de todas las formas de hipertensión, existiendo pruebas clínicas con inhibidores de este sistema que sugieren que los mecanismos dependientes de la renina pueden estar implicados en el origen de más del 70% de los casos de hipertensión esencial (Bavishi et al., 2016; Takimoto-Ohnishi and Murakami, 2019).

6. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN

6.1. TRATAMIENTOS EXISTENTES DE LA HIPERTENSIÓN

Para el tratamiento de la hipertensión arterial existen dos estrategias: los cambios en el estilo de vida y el tratamiento farmacológico. Recientemente están surgiendo nuevas terapias basadas en el uso de diversas estrategias, especialmente para la hipertensión arterial resistente, entre las que se encuentran dispositivos para estimular los barorreceptores carotídeos, la denervación renal con catéter mediante radiofrecuencia, ultrasonidos, la inyección perivascular de agentes neurotóxicos, o la anastomosis arteriovenosa iliaca central mediante un dispositivo de nitinol tipo *stent*; sin embargo, todavía no se ha demostrado su eficacia como opción de tratamiento (Williams et al., 2018).

Los **cambios en el estilo de vida** son la primera opción para tratar la hipertensión y no hay duda de que pueden reducir la presión arterial y, en algunos casos, el riesgo cardiovascular, pudiendo ser suficientes para retrasar o prevenir el tratamiento farmacológico, además de potenciar sus efectos. Dentro de estos cambios, los más efectivos han demostrado ser la restricción de la ingesta de sal, la moderación en el consumo de alcohol, un consumo abundante de frutas y verduras, la reducción y el control del peso, la actividad física regular y dejar de fumar. Sin embargo, la mayor parte de los pacientes hipertensos siguen requiriendo de tratamiento farmacológico para lograr un correcto control de la presión arterial (Williams et al., 2018).

En cuanto al **tratamiento farmacológico**, actualmente se recomienda el uso de cinco clases de fármacos, aunque existen contraindicaciones para cada uno de ellos; estos serían: **IECA** (inhibidores de la ECA), **ARA-II** (antagonistas de los receptores de Ang II), **BB** (beta-bloqueantes), **BCC** (bloqueadores de los canales de calcio) y **diuréticos** (tiacídicos y análogos tiacídicos). También existen otros tipos de fármacos, aunque con un uso menos extendido al estar asociados con mayor riesgo de efectos secundarios, como alfa-bloqueantes, fármacos de acción central y antagonistas del receptor de mineralocorticoides. Estos constituyen recursos adicionales para el tratamiento de pacientes cuya presión arterial no puede controlarse mediante las combinaciones probadas de los demás fármacos (Williams et al., 2018).

BLOQUEADORES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Dentro de este grupo se encuentran los IECA y los ARA-II, siendo los fármacos antihipertensivos más utilizados. Estos antihipertensivos presentan la misma eficacia que otras clases de fármacos en la prevención de complicaciones cardiovasculares graves y mortalidad (Thomopoulos et al., 2015a; Ettehad et al., 2016). Sin embargo, reducen el riesgo de albuminuria en mayor grado que otros fármacos antihipertensivos, siendo los que muestran una mayor evidencia de reducción del riesgo de enfermedad renal terminal (Thomopoulos et al., 2017). Además, son efectivos para la prevención o la regresión del daño orgánico causado por la hipertensión arterial, como la hipertrofia del ventrículo izquierdo y el remodelado vascular (Thomopoulos et al., 2015a).

En cuanto a su seguridad, los ARA-II se han asociado con una tasa de interrupción del tratamiento por efectos adversos significativamente menor que el resto de los fármacos antihipertensivos (Kronish et al., 2011); sin embargo, la combinación de ambos tipos de bloqueadores del SRA aumenta el riesgo de complicaciones renales adversas, a la vez que no aporta beneficios adicionales (ONTARGET Investigators et al., 2008; Fried et al., 2013).

Dentro de los IECA encontramos captopril, enalapril o fosinopril y de los ARA-II losartán, candesartán o valsartán.

BETA-BLOQUEANTES

Los BB han demostrado reducir de manera significativa el riesgo de ictus, la insuficiencia cardíaca y las complicaciones cardiovasculares en pacientes hipertensos, comparados con placebo (Thomopoulos et al., 2015b). Si se comparan con otros fármacos antihipertensivos, los BB tiene una eficacia equivalente para la prevención de complicaciones cardiovasculares graves, aunque son menos efectivos que los bloqueadores del SRA o los BCC en la prevención y la regresión de la hipertrofia del ventrículo izquierdo, el grosor intimomedial carotídeo, la rigidez aórtica y el remodelado vascular (Williams et al., 2018).

Los BB, al igual que los diuréticos, y particularmente cuando se combinan, se asocian con un mayor riesgo de diabetes de nueva aparición en pacientes con predisposición, además de presentar un perfil de efectos secundarios menos favorable que los bloqueadores del SRA, con una tasa de interrupción del tratamiento más alta en la clínica (Corrao et al., 2008).

Los BB son fármacos particularmente útiles para el tratamiento de la hipertensión arterial en situaciones específicas, como la angina sintomática, el control de la frecuencia cardíaca, el infarto de miocardio reciente y la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida, y como alternativa a los IECA o ARA-II en mujeres hipertensas jóvenes que planean gestar o están en edad fértil (Williams et al., 2018). Sin embargo, estos fármacos no son un grupo homogéneo, por lo que los efectos mencionados pueden variar de unos a otros.

Dentro de este grupo de fármacos encontramos atenolol, bisoprolol, propranolol o carvedilol, entre otros.

BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE CALCIO

Los BCC se usan ampliamente para el tratamiento de la hipertensión arterial, con una eficacia similar a otras clases de fármacos en el control de la presión arterial, las complicaciones cardiovasculares graves y la mortalidad (Thomopoulos et al., 2015a; Ettehad et al., 2016). Estos fármacos presentan un mayor efecto en la reducción del ictus que el estimado por la reducción de la presión arterial, pero parecen ser menos efectivos en la prevención de la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (Williams et al., 2018). Respecto al daño orgánico causado por la hipertensión arterial, los BCC son más efectivos que los BB en el retraso de la progresión de la aterosclerosis carotídea y en la reducción de la hipertrofia del ventrículo izquierdo y la proteinuria (Williams et al., 2018).

Los BCC son un grupo de fármacos heterogéneo entre los que podemos encontrar dihidropiridinas, como el amlodipino o el nifedipino, o no dihidropiridinas, como el verapamilo y el diltiazem (Williams et al., 2018). Entre estos fármacos, las dihidropiridinas llevan al desarrollo de edema, mientras que las no dihidropiridinas se han asociado a bradicardia y bloqueo cardíaco, por lo que deben evitarse en pacientes con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (Whelton et al., 2018).

DIURÉTICOS

Los diuréticos han sido la base del tratamiento antihipertensivo desde su introducción en la década de 1960, habiéndose demostrado su eficacia en la prevención de la morbilidad y mortalidad cardiovascular de todo tipo (Thomopoulos et al., 2015b); además, parecen ser más efectivos que otras clases de fármacos en la prevención de la insuficiencia cardíaca (Thomopoulos et al., 2015a).

Dentro de este grupo, se ha debatido si es preferible el uso de análogos tiacídicos, como clortalidona o indapamida, frente a los diuréticos tiacídicos convencionales, como hidroclorotiazida o bendrofluazida; sin embargo, no se ha probado su superioridad clínica en estudios de comparación directa. Si se ha asociado el uso de clortalidona e indapamida con beneficios cardiovasculares, además de que estos fármacos son más potentes por miligramo que la hidroclorotiazida en la reducción de la presión arterial y tienen una acción más prolongada, no habiendo evidencia de una mayor incidencia de efectos secundarios (Roush et al., 2015). Además, dosis bajas de análogos tiacídicos se asocian con una mayor reducción de complicaciones y mortalidad cardiovascular que dosis bajas de diuréticos tiacídicos (Olde Engberink et al., 2015). Un reciente metanálisis de estudios controlados por placebo sobre el uso de tiacidas, clortalidona e indapamida ha mostrado efectos similares de los tres tipos de diuréticos en las variables cardiovasculares (Thomopoulos et al., 2015b), por lo que se puede considerar el uso de estos tres tipos de diuréticos para el tratamiento antihipertensivo (Williams et al., 2018).

En pacientes con una tasa de filtración glomerular disminuida, los diuréticos tiacídicos y sus análogos son menos eficientes como antihipertensivos, siendo ineficientes cuando esta se encuentra por debajo de 30 ml/min y debiendo sustituirse por diuréticos de asa, como furosemida o torasemida (Williams et al., 2018).

Las tiazidas y los análogos tiazídicos tienen una mayor tasa de interrupción de tratamiento que los bloqueadores del SRA, lo que puede explicarse por su posible reducción del potasio sérico y su perfil de efectos secundarios menos favorable (Corrao et al., 2008; Thomopoulos et al., 2015b). Además, se asocian con efectos dismetabólicos que provocan un incremento de la resistencia a insulina y el riesgo de diabetes de nueva aparición. Un estudio reciente ha demostrado que la adición de un diurético ahorrador de potasio, como la espironolactona, podría reducir el efecto adverso de las tiazidas en el metabolismo de la glucosa (Brown et al., 2016; Williams et al., 2018).

6.2. ITH13001

A pesar de los abordajes existentes para el tratamiento de la hipertensión arterial, únicamente el 30-35% de los pacientes que se encuentran bajo tratamiento tienen la presión controlada (Menéndez et al., 2016; Williams et al., 2018); es por ello que todavía es necesario el desarrollo de nuevos fármacos para el control de esta patología y la reducción del daño en sus órganos diana.

Dado el importante papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la hipertensión arterial, se debe considerar el uso de fármacos antioxidantes para el tratamiento de esta patología; y más, si se tiene en cuenta que los efectos de muchos de los fármacos antihipertensivos clásicos pueden estar, en parte, mediados por la disminución del estrés oxidativo vascular; sin embargo, aunque se han realizado numerosos estudios y ensayos clínicos con compuestos antioxidantes, como se ha comentado anteriormente, no se ha llegado a resultados convincentes hasta el momento.

ITH13001 es un compuesto de fórmula (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrilato de 3-(2-acetamidoetil)-1*H*-indol-5-ilo, que se muestra en la **Figura 15**. Se trata de un nuevo derivado de melatonina que ha mostrado ventajas claras con respecto a ella y su otro precursor, el ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrílico. Este compuesto presenta una combinación de las actividades biológicas con efecto terapéutico de sus precursores, algo que no se produce en ninguna de ellas; por un lado, es un inductor de Nrf2, efecto que no posee la melatonina, suponiendo una ventaja frente a ella; y, por otro lado, tiene un efecto antioxidante, efecto que no posee el ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrílico. Además, este compuesto ha demostrado mejorar significativamente estas dos actividades con respecto a la combinación de sus precursores (León et al., 2016).

En cuanto al mecanismo de inducción de Nrf2 por este compuesto, se ha descrito que se produce mediante la liberación de Nrf2 de su represor Keap1, lo que conduce a su translocación al núcleo y da lugar a la transcripción de sus genes diana, los cuales ejercen funciones antioxidantes y antiinflamatorias; además, este compuesto posee capacidad secuestradora de radicales libres (León et al., 2016).

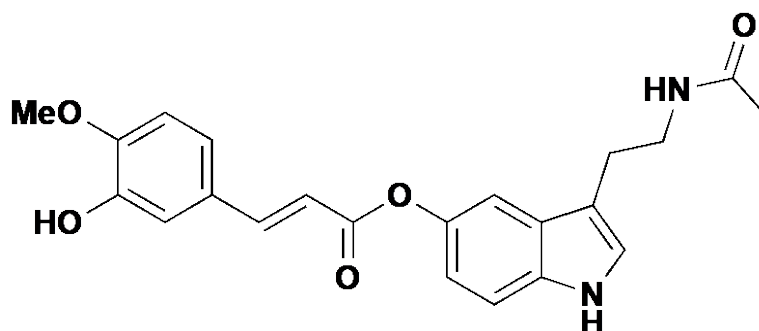


Figura 15. Estructura molecular del compuesto ITH13001 o (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrilato de 3-(2-acetamidoetil)-1*H*-indol-5-ilo.

Este compuesto se prepara según los métodos descritos por Buendia et al., (2015) y se administra convenientemente formulado con los excipientes adecuados por vía oral, inyectable o intravenosa a dosis diarias comprendidas entre 0,01 y 100 mg, preferiblemente entre 0,1 a 50 mg. El principio activo puede ser incorporado con excipientes normalmente usados en composiciones farmacéuticas como lactosa, estearato de magnesio, vehículos acuosos o no acuosos, sustancias grasas de origen vegetal o animal, derivados de parafina, glicoles, agentes de dispersión, emulsión o empapado y conservantes.

En cuanto a los efectos que este compuesto posee, se han observado potentes propiedades antioxidantes *in vitro*, a través de la eliminación directa de radicales libres, así como a través de la activación de las vías antiinflamatoria y antioxidante de fase II Nrf2-ARE. Estudios preclínicos llevados a cabo en células gliales estimuladas con LPS han demostrado la capacidad de ITH13001 para reducir la producción de citoquinas y la expresión de iNOS de forma independiente de Nrf2. Además, este compuesto mostró un potente efecto neurogénico protector en neuroesferas derivadas de rata. Cuando se analizó el efecto del tratamiento *in vivo* con este compuesto en un modelo de esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmune experimental, se obtuvo una reducción en la puntuación de la enfermedad de forma dependiente de la concentración gracias a la combinación de los distintos efectos observados en los estudios *in vitro* (Michalska et al., 2017). Por todo ello, el análisis del posible efecto de este compuesto en la hipertensión y las alteraciones cardiovasculares asociadas a su desarrollo reviste un especial interés.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Como se ha comentado anteriormente, la hipertensión cursa con un proceso inflamatorio crónico que, acompañado por una situación de estrés oxidativo, está implicado en las alteraciones cardiovasculares asociadas al desarrollo de esta patología. Así, la inflamación observada en la pared vascular, con infiltración de diversas células inmunes y elevados niveles de citoquinas y enzimas proinflamatorias, favorece una aumentada producción de ROS, y todo ello da lugar a alteraciones vasculares como la rigidez, el remodelado vascular y la disfunción endotelial, que se asocian a la incrementada resistencia vascular periférica que caracteriza a la hipertensión.

Dada la importancia que tienen los canales $K_v1.3$ en el fenotipo de los macrófagos y de las CMLV, nuestra hipótesis es que en hipertensión se produce un cambio en el fenotipo de los macrófagos, modulado por los canales $K_v1.3$, que podría tener un importante papel en la inflamación de la pared y en las alteraciones vasculares que se producen en esta patología, tanto a nivel estructural y mecánico como funcional. Además, la regulación del fenotipo de las CMLV por los canales $K_v1.3$ también podría participar en estas alteraciones.

Nrf2 es un factor de transcripción cuya activación tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios, por lo que juega un papel clave en la regulación de la respuesta celular frente a invasores y daño oxidativo. De acuerdo con esto, nuestra hipótesis es que Nrf2 es una vía de defensa que actuaría reduciendo los efectos deletéreos causados por las ROS y la inflamación en la hipertensión, de manera que su delección conduciría a una exacerbación de las alteraciones cardiovasculares asociadas a esta patología.

ITH13001 es un nuevo compuesto con actividad inductora de Nrf2, además de propiedades antioxidantes independientes de esta inducción. Puesto que un alto porcentaje de los pacientes hipertensos con tratamiento farmacológico sigue sin tener la presión arterial controlada, el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de esta afección es de gran importancia. Nuestra hipótesis es que ITH13001, como consecuencia de la combinación de las mencionadas propiedades, mejore las alteraciones cardiovasculares observadas en hipertensión, lo que le haría ser un buen candidato para el tratamiento de esta patología.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar la implicación de $K_v1.3$ y Nrf2 en el daño cardiovascular asociado a la hipertensión y su contribución al estrés oxidativo y la inflamación que tienen lugar en esta patología.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar si la hipertensión altera la expresión de los canales $K_v1.3$ en la pared vascular y en macrófagos.
2. Estudiar la participación de los canales $K_v1.3$ en el desarrollo de hipertensión y su participación en el estado inflamatorio que se observa en la misma.
3. Estudiar el papel de los canales $K_v1.3$ en las alteraciones vasculares funcionales, estructurales y mecánicas asociadas a la hipertensión.
4. Analizar si Nrf2 modula el desarrollo de hipertensión y su participación en el estado inflamatorio y el estrés oxidativo que caracteriza esta patología.
5. Estudiar el papel de Nrf2 en las alteraciones estructurales cardíacas, así como en las alteraciones vasculares funcionales, estructurales y mecánicas asociadas a la hipertensión.
6. Estudiar el efecto del tratamiento con un nuevo derivado de melatonina, ITH13001, en la hipertensión y las alteraciones cardiovasculares asociadas.
7. Determinar los mecanismos que contribuyen al efecto de ITH13001 en hipertensión.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELOS ANIMALES Y ASPECTOS ÉTICOS

1.1. RATONES TRATADOS CON HSTX[R14A]

Para la realización de este estudio, se utilizaron ratones macho C57BL/6J de tres meses de edad, distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos diferentes de la siguiente manera: 1) ratones control, tratados subcutáneamente con vehículo (Tampón P6N: NaHPO₄ 10 mM, NaCl 0,8%, Tween-20 0,05%, pH 6,0) cada dos días durante 15 días; 2) ratones infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.) mediante minibombas osmóticas implantadas subcutáneamente (modelo 2002, Alzet; Durect Corp., Cupertino, CA, EE. UU.) tras la anestesia por inhalación de isoflurano (2%), tratados subcutáneamente con vehículo; 3) ratones tratados con el inhibidor selectivo del canal K_v1.3 HsTX[R14A] (100 µg/Kg/inyección, subcutáneamente), cada dos días durante 15 días; y 4) ratones infundidos con Ang II y tratados con HsTX[R14A] cada dos días durante 15 días, comenzando el día anterior a la infusión de Ang II. Para confirmar los resultados obtenidos utilizando HsTX[R14A], algunos animales fueron tratados con otro inhibidor de los canales K_v1.3 [EWSS]ShK (100 µg/Kg/inyección, subcutáneamente), cada dos días durante 15 días.

En el día 14 del tratamiento con Ang II, los animales fueron sacrificados mediante exposición a CO₂, tras lo cual se obtuvieron la aorta, las arterias mesentéricas de primer orden y los macrófagos peritoneales, tal y como se comenta más adelante. Estas muestras se usaron para estudios de función, estructura y mecánica vascular, expresión génica e inmunofluorescencia (*Figura 16*).

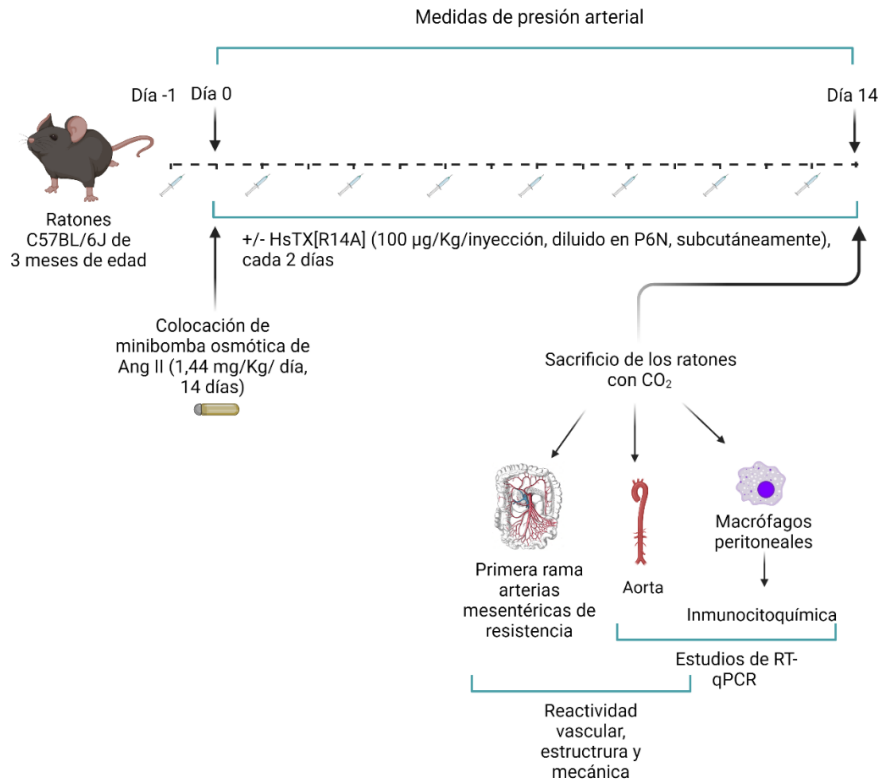


Figura 16. Modelo de ratones tratados o no con HsTX[R14A] e infundidos o no con angiotensina II (Ang II). Creada con BioRender.com.

1.2. RATONES KNOCKOUT PARA NRF2

En otro grupo de experimentos, se utilizaron ratones macho wild type (WT) y knockout para Nrf2 ($Nrf2^{-/-}$) con fondo genético C57BL/6J de tres meses de edad, facilitados por el Dr. Antonio Cuadrado del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”. Estos ratones, que fueron caracterizados previamente por Itoh et al. (1997), no mostraron diferencias aparentes en su fenotipo basal. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos diferentes de la siguiente manera: 1) ratones WT; 2) ratones WT infundidos con Ang II; 3) ratones $Nrf2^{-/-}$ y 4) ratones $Nrf2^{-/-}$ infundidos con Ang II.

En el día 14 tras la colocación de la bomba de Ang II, los animales fueron sacrificados mediante exposición a CO_2 , tras lo cual se obtuvieron sangre, la aorta, las arterias mesentéricas de primer orden y el corazón, tal y como se comenta más adelante. Estas muestras se usaron para estudios de función, estructura y mecánica vascular, hipertrofia cardíaca, expresión génica y medidas de parámetros de estrés oxidativo (**Figura 17**).

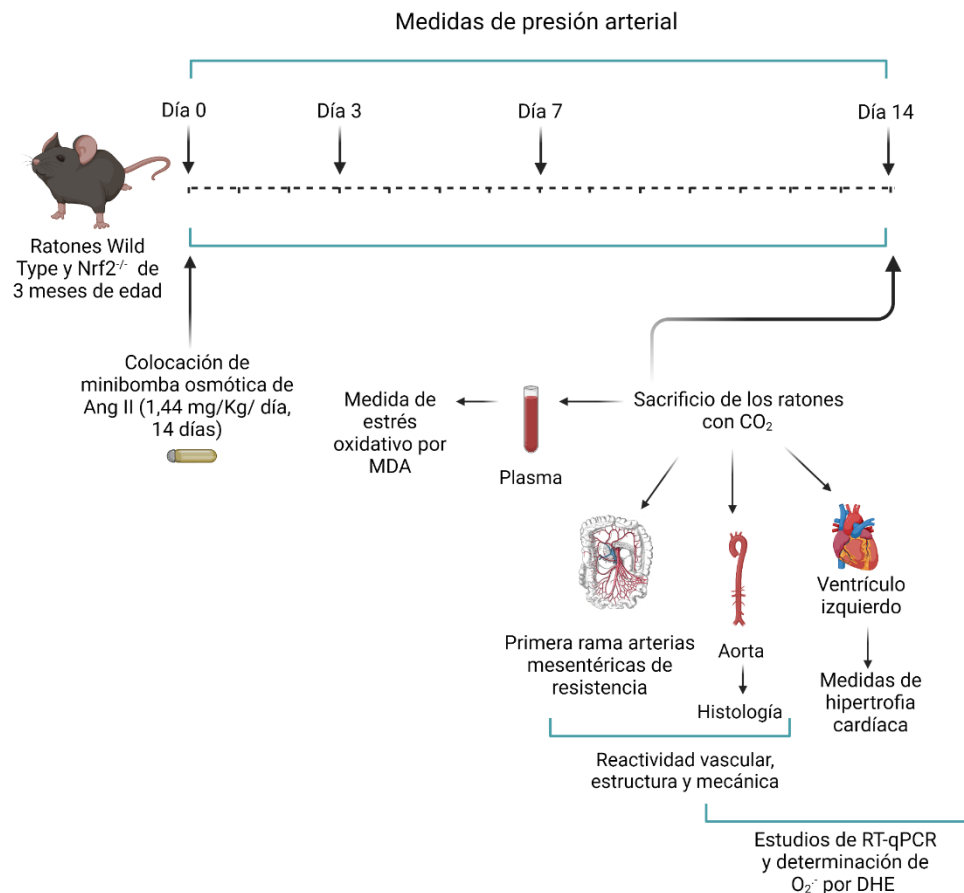


Figura 17. Modelo de ratones *Wild Type* y $Nrf2^{-/-}$ infundidos o no con angiotensina II (Ang II). DHE: dihidroetidio; MDA: malondialdehído. Creada con BioRender.com.

1.3. RATONES TRATADOS CON ITH13001

Adicionalmente, se utilizaron ratones macho C57BL/6J de tres meses de edad distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos diferentes de la siguiente manera: 1) ratones control tratados intraperitonealmente con vehículo (dimetilsulfóxido, DMSO, Sigma-Aldrich Co.); 2) ratones infundidos durante 14 días con Ang II; 3) ratones tratados con ITH13001 (1 mg/Kg/día, diluido en DMSO al 0,5%, i.p.) facilitado por el Dr. Rafael León de la Universidad Autónoma de Madrid y 4) ratones infundidos con Ang II y tratados con ITH13001.

En el día 14 tras el inicio del tratamiento con Ang II, los animales fueron sacrificados mediante exposición a CO₂, tras lo cual se obtuvieron sangre, la aorta, las ramas mesentéricas de primer orden, el corazón y los macrófagos peritoneales, tal y como se comenta más adelante. Estas muestras se usaron para estudios de función, estructura y mecánica vascular, hipertrofia cardíaca, expresión génica y proteica, medidas de parámetros de estrés oxidativo y medidas de los niveles de NO (**Figura 18**).

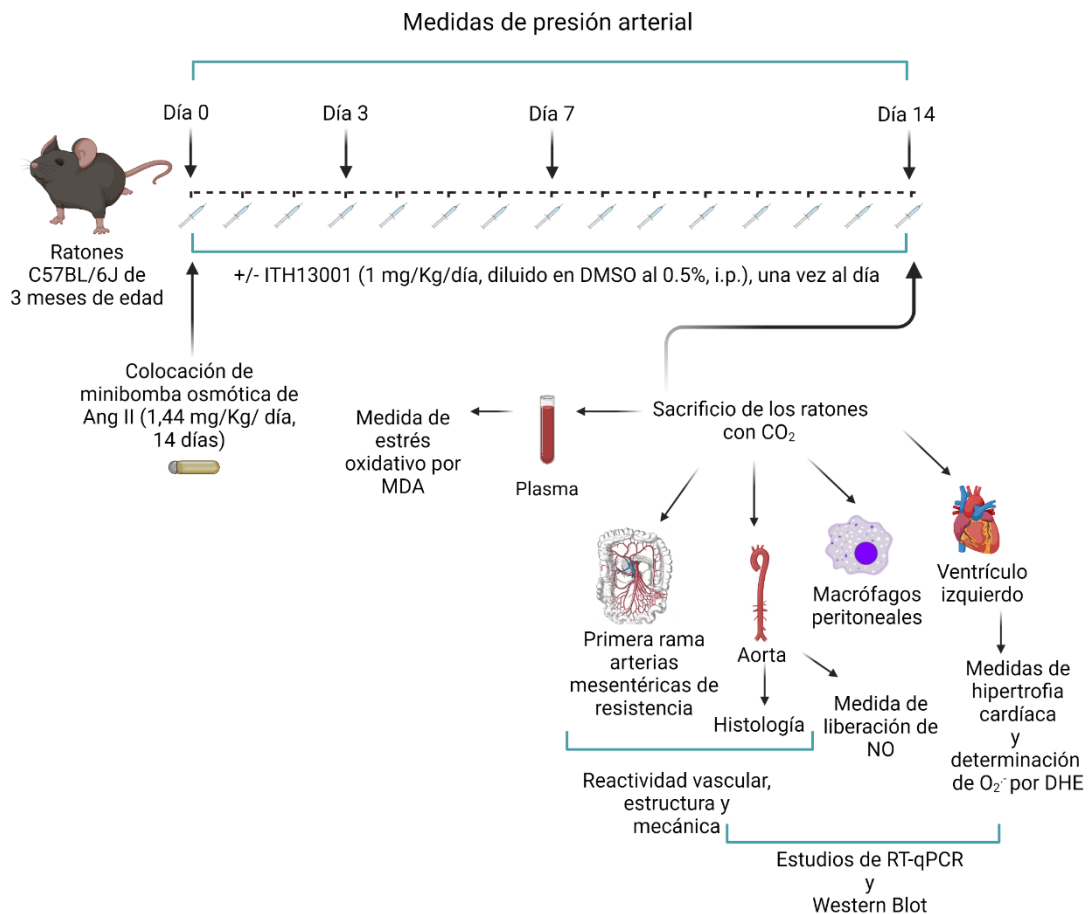


Figura 18. Modelo de ratones tratados o no con ITH13001 e infundidos o no con angiotensina II (Ang II). DHE: dihidroetidio; NO: óxido nítrico; MDA: malondialdehído. Creada con BioRender.com.

En los distintos modelos animales se midió la presión arterial mediante pletismografía de la arteria caudal, de acuerdo con el método originalmente descrito por Buñag (1973), usando un equipo modelo NIPREM 645 (Cibertec, Madrid, España). Los animales fueron entrenados

durante una semana antes de las mediciones finales de la presión arterial. Para llevar a cabo las medidas, los animales se mantuvieron en una estufa a 37°C durante 10 min, permitiendo así la dilatación de la arteria caudal. A continuación, se colocó el manguito de presión y el sensor de pulso en la cola del ratón. A cada ratón se le realizaron diez medidas de presión sistólica y se calculó la media de ellas.

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y la Dirección General de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, España (PROEX 345/14 y PROEX 183.2/20). El cuidado y uso de los animales se ajustó a la Política Española de Protección Animal RD 53/2013, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los experimentos se llevaron a cabo cumpliendo con la normativa de Investigación con Animales: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE). Todos los ratones fueron criados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) (número de registro ES28092000023) y en el del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (número de registro ES280790000188) (Madrid, España), y mantenidos bajo condiciones controladas a 22±2°C, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso *ad libitum* a agua y comida.

2. OBTENCIÓN DE TEJIDOS Y MACRÓFAGOS PERITONEALES

En el día 14 tras la colocación de la bomba de Ang II, los animales fueron sacrificados por exposición a CO₂. La **sangre** fue recogida cuidadosamente para evitar la lisis de los hematíes en tubos con 15% K₃EDTA como anticoagulante (Deltalab, Rubí, España) y fue conservada en hielo. A continuación, la sangre se centrifugó (800 g, 15 min, 4°C), se recogió el plasma y se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

Los **macrófagos peritoneales** se obtuvieron como ha sido descrito (Zhang et al., 2008). Para ello, se inyectaron 10 mL de PBS en la cavidad peritoneal de los ratones; a continuación, se recuperó el PBS, se centrifugó (72 g, 5 min) y el pellet se resuspendió en DMEM-baja glucosa (Sigma-Aldrich Co.) con 5 mM de glutamina (Sigma-Aldrich Co.), suero bovino fetal descomplementado al 10% (FBS, Sigma-Aldrich Co.) y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Los macrófagos se colocaron en placas de 60 mm y el medio se cambió después de 2 horas. A continuación, los macrófagos se cultivaron en 1 mL de ese medio durante 24 horas. El medio condicionado de dichos macrófagos se recogió y se almacenó a -80°C para posteriores experimentos. El ARNm de los macrófagos fue obtenido para los estudios de expresión génica por qRT-PCR. La proteína fue extraída, cuantificada y usada como factor de normalización en los experimentos de función vascular realizados con el medio condicionado ([Sección 5.2](#)).

El **corazón, la aorta y las arterias mesentéricas** de primer orden se diseccionaron libres de grasa y tejido conectivo y se colocaron en solución fría de Krebs-Henseleit (KHS) (NaCl 115 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4,7 mM, Mg SO₄·7H₂O 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, glucosa 11,1 mM y Na₂EDTA 0,01 mM). Los vasos se dividieron en segmentos para los análisis de la función ([Sección 5](#)), la estructura y la mecánica ([Sección 6](#)) vasculares que se llevaron a cabo el mismo día de la eutanasia. Para la histología ([Sección 7](#)), los segmentos aórticos se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA) y se incluyeron posteriormente en parafina. Los segmentos aórticos y de ventrículo izquierdo utilizados para la determinación de O₂⁻ ([Sección 11](#)) se

colocaron en KHS con sacarosa al 30% durante 2 horas, se transfirieron a un criomolde con medio de inclusión OCT Tissue Tek (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Países Bajos) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C . Los segmentos aórticos y de ventrículo izquierdo restantes se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el día de los estudios de expresión génica por qRT-PCR ([Sección 10](#)) y proteica por Western Blot ([Sección 11](#)).

3. CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Las células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1, ATCC®, CRL-3243™, RRID:CVCL_0307, Middlesex, Reino Unido) se cultivaron siguiendo las instrucciones del fabricante con medio MCDB131 (Corning, NY, EE. UU. Cat No 702564) suplementado con 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (Sigma-Aldrich Co.), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hidrocortisona (Sigma-Aldrich Co.), glutamina 10 mM, FBS al 10% y 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se colocaron en medio sin suero durante 24 horas antes de la estimulación. A continuación, las células endoteliales fueron estimuladas o no con Ang II (1 nM durante 6 y 24 h). Se aisló el ARN para realizar experimentos de RT-qPCR.

4. CULTIVO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

En algunos experimentos se usó la línea celular de células musculares lisas vasculares de aorta de ratón MOVAS (ATCC® CRL-2797 TM, Manassas, VA, EE. UU.) que se cultivó en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Glucosa 25 mM, Sigma-Aldrich Co.) suplementado con FBS al 10% y 0,2 mg/mL de gentamicina G-418 (Sigma-Aldrich Co.) a 37°C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 5% CO_2 y 95% de aire atmosférico. Para los experimentos, se utilizaron células en pases 3-12, que se hicieron quiescentes mediante la incubación en DMEM con 0% FBS y 0,2 mg/mL de solución G-418 durante 24 horas. Las células se estimularon con ITH13001 10 μM durante 24 horas; como control positivo se utilizó tert-butil-hidroquinona (tBHQ, 20 μM , 24 horas; Sigma-Aldrich Co.).

5. EXPERIMENTOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

Para estudiar la reactividad vascular se utilizó el método descrito por Mulvany y Halpern (1977). Para ello, segmentos de aproximadamente 2 mm de longitud de aorta y arterias mesentéricas de resistencia se transfirieron a un baño de órganos de un miógrafo dual isométrico (JP-Trading, Aarhus, Dinamarca), en el cual se introdujeron dos alambres de acero de 40 μm de diámetro por la luz de la arteria ([Figura 19](#)). Después de un periodo de estabilización de 30 min en KHS oxigenado (con una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2) a 37°C y pH de 7,4, los segmentos se estiraron gradualmente hasta conseguir su tensión óptima en función de su diámetro. Esta se determinó basándose en la relación circunferencia interna/tensión de la pared de los segmentos, ajustando su circunferencia interna, L_0 , al 90% de la que tendrían los vasos si estuvieran expuestos a una tensión pasiva equivalente a la producida por una presión transmural de 100 mmHg.

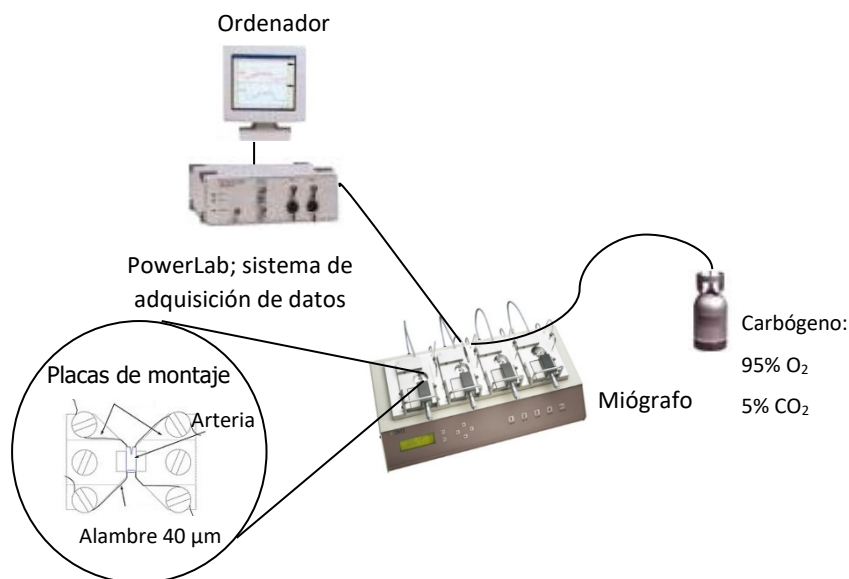


Figura 19. Esquema representativo del miógrafo de alambres donde se realizaron los experimentos de reactividad vascular.

Una vez acabado el proceso de normalización, los segmentos arteriales se lavaron con KHS y se equilibraron durante 30 min; a continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de los mismos a una solución de alta concentración de potasio (K⁺-KHS 120 mM, idéntica a la de KHS, salvo que se sustituyó el NaCl por KCl sobre una base equimolar). Tras un periodo de equilibrio, se contrajeron los segmentos arteriales con fenilefrina (Phe, Sigma-Aldrich Co.) hasta una contracción de, aproximadamente, el 50% de la contracción inducida por K⁺-KHS; una vez la respuesta a Phe fue estable se añadió acetilcolina (ACh, 10 µM, Sigma-Aldrich Co.) con el fin de determinar la presencia de endotelio funcional. Se consideraron segmentos con endotelio funcional aquellos en los que ACh produjo una relajación de más de un 80% del tono previo en ratones control y más de un 60% en ratones infundidos con Ang II. Tras el lavado con KHS y un periodo de estabilización de 30 min, se realizó una curva concentración-respuesta con concentraciones crecientes de ACh (1 nM-10 µM) en segmentos arteriales previamente contraídos con Phe. Después del lavado con KHS y un periodo de estabilización de 30 min, se realizó una curva concentración-respuesta con concentraciones crecientes de Phe (1 nM-10 µM). Por último, se realizó una curva concentración-respuesta al donante de NO Dietilamin NONOato (DEA-NO, 1 nM-10 µM, Sigma-Aldrich Co.) en arterias precontraídas con Phe. En el caso del modelo de ratones tratados con HsTX[R14A] la precontracción de las arterias mesentéricas de resistencia se llevó a cabo con el agonista del receptor de TXA₂ U46619 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

En el modelo de ratones tratados con ITH13001, se analizaron los efectos del inhibidor selectivo de NOX-1, ML-171 (2-acetilfenotiazina, 0,5 µM, Sigma-Aldrich Co.), el eliminador de O₂⁻, tirón (1 mM, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.), el antioxidante dirigido a mitocondrias, Mito-Tempo (0,5 µM, Santa Cruz Biotechnology Inc.), y el inhibidor no selectivo de NOS L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginina metil ester, 0,1 mM, Sigma-Aldrich Co.), sobre las respuestas inducidas por Phe y ACh. Estos fármacos se incubaron durante 30 min antes de la adición de Phe (**Figura 20**).

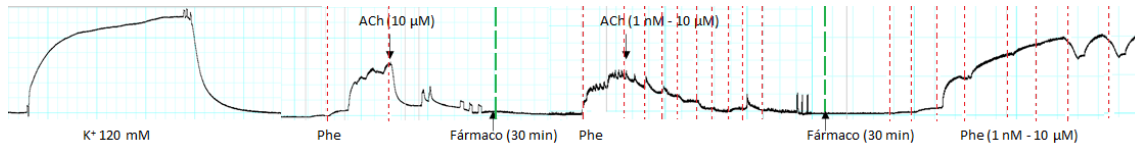


Figura 20. Registro representativo del protocolo experimental realizado en los experimentos de reactividad vascular.

Las respuestas vasodilatadoras se expresaron como porcentaje del tono previo generado por la Phe o U46619. Las respuestas vasoconstrictoras se expresaron como porcentaje del tono generado por el K^+ -KHS para cada segmento. Para comparar el efecto de L-NAME sobre la respuesta a la Phe en segmentos de los distintos grupos, los resultados se expresaron como las diferencias de las áreas bajo las curvas de concentración-respuesta (dAUC) en presencia y ausencia de L-NAME en las situaciones de control y experimental. Las AUC se calcularon a partir de los gráficos individuales de la curva concentración-respuesta utilizando el software GraphPad Prism (v8.0.2); las diferencias se expresaron como el porcentaje de la AUC de la situación de control correspondiente.

5.1. EFECTOS VASOACTIVOS DE ITH13001

EFECTO VASODILADOR INDUCIDO POR ITH13001

Se evaluó la relajación inducida por ITH13001 en segmentos de aorta y la primera rama de arterias mesentéricas de resistencia de ratones C57BL/6J. Para ello, tras el proceso de normalización, los segmentos arteriales se lavaron con KHS y se equilibraron durante 30 min; a continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de los mismos a K^+ -KHS 120 mM. Una vez comprobada la presencia de endotelio funcional, y tras el lavado con KHS y un periodo de estabilización de 30 min, se realizó una curva concentración-respuesta con concentraciones crecientes del compuesto ITH13001 (1 nM-30 μ M) o su vehículo, DMSO [0,01-100% (1,41 mM-1,41 M)] en los segmentos arteriales previamente contraídos con Phe hasta una contracción de aproximadamente el 50% de la contracción del K^+ -KHS (**Figura 21**).

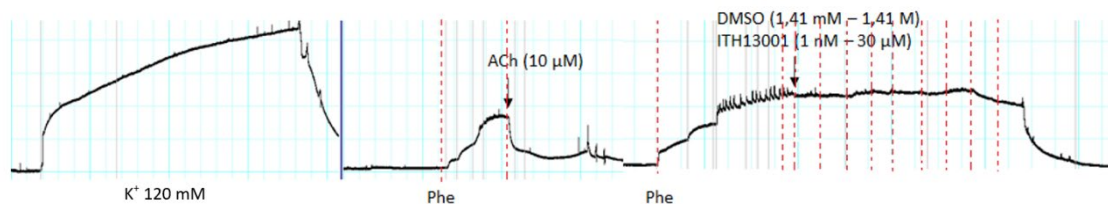


Figura 21. Registro representativo del protocolo experimental en el que se analizaban las respuestas vasodilatadoras a ITH13001 y su vehículo (DMSO) en aorta de ratones C57BL/6J.

EFECTO DE ITH13001 SOBRE LA RELAJACIÓN Y LA CONTRACCIÓN VASCULAR

Por otra parte, se analizó el efecto de ITH13001 sobre las respuestas inducidas por Phe y ACh en segmentos de aorta de ratones C57BL/6J. Para ello, y tras el proceso de normalización y la comprobación de la contractilidad y la presencia de endotelio funcional, los segmentos

arteriales se incubaron con ITH13001 30 μM o su vehículo, DMSO (1,41 M), durante 1 hora antes de realizar la curva concentración-respuesta a ACh y a Phe (**Figura 22**).

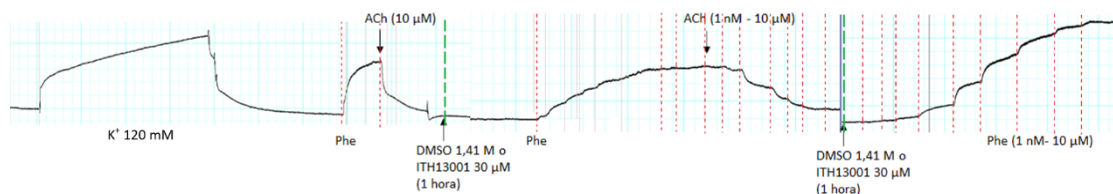


Figura 22. Registro representativo del protocolo experimental en el que se analizaba el efecto de la incubación durante 1 hora con ITH13001 o su vehículo (DMSO) sobre la respuesta a acetilcolina (ACh) y fenilefrina (Phe) en segmentos aórticos de ratones C57BL/6J.

A continuación, se analizó si ITH13001 modificaba el efecto inducido por Ang II sobre las respuestas a Phe y ACh. Para ello, segmentos de aorta de ratones C57BL/6J se incubaron *ex vivo* durante 24 horas en medio DMEM-alta glucosa con 5 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina sin FBS en las siguientes condiciones: 1) segmento incubado en DMEM con DMSO (1,41 M); 2) segmento incubado en DMEM con ITH13001 30 μM ; 3) segmento incubado en DMEM con Ang II y DMSO; y 4) segmento incubado en DMEM con Ang II e ITH13001 (**Figura 23**).

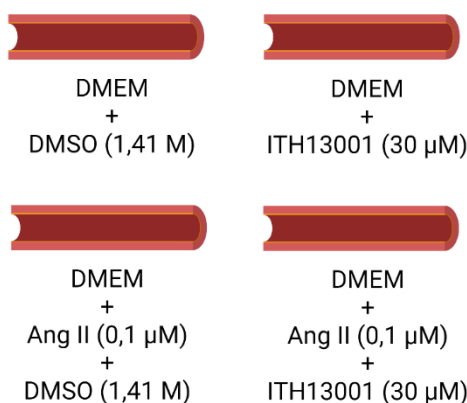


Figura 23. Condiciones experimentales empleadas para analizar si ITH13001 modificaba el efecto inducido por angiotensina II (Ang II, 24 h) sobre las respuestas a fenilefrina (Phe) y acetilcolina (ACh) en segmentos aórticos de ratones C57BL/6J. Creada con BioRender.com.

Tras la incubación en las condiciones anteriormente mencionadas, se procedió al montaje de los segmentos vasculares como se ha descrito previamente y se evaluaron los efectos de dichas incubaciones en las respuestas inducidas por ACh y Phe (**Figura 24**).

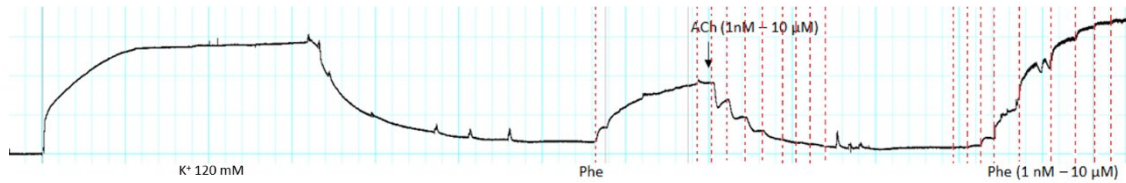


Figura 24. Registro representativo del efecto de la incubación durante 24 horas con ITH13001 (30 µM) o su vehículo (DMSO) en presencia o ausencia de angiotensina II (Ang II) (0,1 µM) sobre la respuesta inducida por fenilefrina (Phe) y acetilcolina (ACh) en segmentos aórticos de ratones C57BL/6J.

5.2. INCUBACIÓN EX VIVO DE SEGMENTOS AÓRTICOS CON MEDIOS CONDICIONADOS DE MACRÓFAGOS

En algunos experimentos se expusieron segmentos aórticos de ratones C57BL/6J al medio condicionado de macrófagos durante 20 h. El volumen de medio utilizado para la incubación se normalizó al contenido total de proteínas de los macrófagos.

En algunos experimentos, las arterias se coincubaron con el antagonista de la IL-1 β anakinra (100 µg/mL, Swedish Orphan Biovitrum, S.L., Madrid, España) o el inhibidor selectivo de la COX-2 celecoxib (1 µM, Pfizer Inc., NY, EE. UU.) en presencia de medios condicionados de macrófagos. Se realizaron curvas de concentración-respuesta a la ACh y a DEA-NO en cada segmento, como se ha descrito anteriormente.

6. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y MECÁNICAS DE ARTERIAS MESENTÉRICAS

6.1. ESTUDIOS DE MIOGRAFÍA DE PRESIÓN

Las propiedades estructurales y mecánicas de las arterias mesentéricas se estudiaron utilizando un miógrafo de presión (Danish Myo Tech, Modelo P100, J.P. Trading I/S, Aarhus, Dinamarca), como se ha descrito previamente (Hernanz et al., 2015); este sistema permite medir los cambios en el diámetro externo e interno del vaso en condiciones que se asemejan a las fisiológicas. Para este estudio, se utilizaron segmentos de la primera rama de la arteria mesentérica que se colocaron entre dos microcánulas de vidrio en un baño de perfusión para vasos pequeños y se aseguraron con sutura quirúrgica de nailon. Durante estos experimentos, los vasos se sumergieron en KHS sin calcio (0Ca²⁺-KHS; omitiendo el calcio y añadiendo 1 mM de EGTA) para evitar la presencia de tono miogénico. Después de anudar cualquier rama pequeña, se ajustó la longitud del vaso hasta que las paredes del mismo fueran paralelas sin estirarse. A continuación, el segmento se perfundió intravascularmente con 0Ca²⁺-KHS y se ajustó a una presión intraluminal de 45 mmHg, estabilizándose durante 60 min a 37°C. A continuación, se redujo la presión intraluminal a 3 mmHg y se realizó una curva de presión-diámetro aumentando la presión intraluminal en pasos de 20 mmHg cada 2 min, desde 3 hasta 120 mmHg. Finalmente, la arteria se ajustó a 45 mmHg en 0Ca²⁺-KHS, se fijó con PFA 4%, pH 7,2-7,4 a 37°C durante 60 min y se mantuvo en PFA 4% a 4°C para los estudios de microscopía confocal (*Figura 25*).

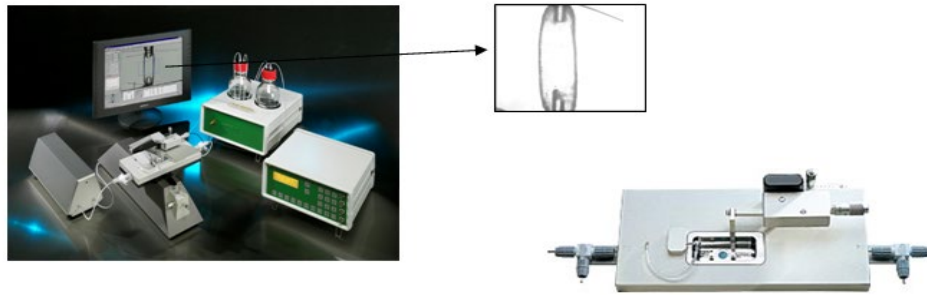


Figura 25. Imagen del miógrafo de presión y del baño de perfusión con un segmento de arteria mesentérica de resistencia montado entre 2 cánulas.

Los diámetros externo e interno se midieron continuamente en condiciones pasivas (D_{e0Ca} , D_{i0Ca}) a cada presión intraluminal. El valor final utilizado fue la media de las medidas tomadas durante los últimos 30 s, cuando las medidas alcanzaron un estado estable. A partir de estas medidas del diámetro externo e interno, se calcularon los siguientes parámetros estructurales y mecánicos:

Grosor de la pared [Wall thickness (WT)] = $(D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2$

Relación media/luz = $(D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2D_{i0Ca}$

La **distensibilidad incremental** representa el porcentaje de cambio en el diámetro interno arterial por cada cambio de mmHg en la presión intraluminal, y se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Distensibilidad incremental} = \Delta D_{i0Ca} / (D_{i0Ca} \times \Delta P) \times 100$$

Donde ΔP es el incremento de presión.

El **estrés circunferencial de la pared (σ)** es la fuerza por unidad de área ejercida por la pared en sentido opuesto a la fuerza ejercida por la presión arterial, y se expresa en N/m^2 o en $dinas/cm^2$.

$$\text{Estrés circunferencial de la pared} = (P \times D_{i0Ca}) / (2WT)$$

Donde P es la presión intraluminal ($1 \text{ mmHg} = 1,334 \times 10^3 \text{ dinas/cm}^2$) y WT es el grosor de la pared a cada presión intraluminal en $0Ca^{2+}$ -KHS.

La **tensión (ϵ)** es el incremento fraccional en el diámetro de un vaso cuando se somete a una presión intraluminal.

$$\text{Tensión} = (D_{i0Ca} - D_{00Ca}) / D_{00Ca}$$

Donde D_{00Ca} es el diámetro interno a 3 mmHg y D_{i0Ca} es el diámetro interno observado a las distintas presiones, ambos medidos en $0Ca^{2+}$.

La **rigidez arterial**, independientemente de la geometría, viene determinada por el módulo elástico de Young E ($E = \text{estrés}/\text{tensión}$). Como se ha comentado anteriormente, el estrés vascular es la fuerza aplicada a una arteria dividida por la superficie sobre la que se aplica dicha fuerza. La fuerza ejercida sobre la pared del vaso resulta de la combinación de las fuerzas de cizallamiento procedentes del flujo sanguíneo, las fuerzas longitudinales procedentes del tejido circundante y las fuerzas circunferenciales procedentes de la presión sanguínea. Estas fuerzas

pueden generar deformaciones en el vaso, refiriéndose el término *strain* (tensión) a la relación entre el área deformada con respecto a la no deformada, cuantificando la deformación independientemente de la geometría original (Wagenseil and Mecham, 2009).

Sin embargo, en este caso, no es del todo apropiado utilizar la relación estrés-tensión debido al comportamiento no lineal del material y a las deformaciones finitas que caracterizan a las arterias *in vivo* (Boutouyrie et al., 2021). Debido a la naturaleza compuesta de la pared arterial y a la compleja microestructura de sus constituyentes, la rigidez arterial cambia de forma no lineal con el aumento de la presión, por lo que es importante tener en cuenta que toda medida de rigidez arterial debe interpretarse en función de la presión arterial (Boutouyrie et al., 2021). Debido a esto, es más apropiado medir la rigidez arterial usando un módulo elástico tangencial o incremental (E_{inc}) determinado por la pendiente de la curva estrés-tensión ($E_{inc} = \delta\sigma/\delta\varepsilon$) (Wagenseil and Mecham, 2009).

Para determinar la rigidez intrínseca de un tejido, el E_{inc} se calcula aproximando los datos de la relación estrés-tensión de cada animal a una curva exponencial usando la ecuación $\sigma = \sigma_{orig}e^{\beta\varepsilon}$, donde σ_{orig} es el estrés en el diámetro inicial (diámetro a 3 mmHg). Realizando la derivada de dicha ecuación se obtiene $E_{inc} = \beta\sigma$. Para un valor determinado de σ , E_{inc} es directamente proporcional a β . Un incremento en β implica un incremento en E_{inc} , lo que significa un incremento en la rigidez intrínseca.

6.2. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE NÚCLEOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

La cuantificación de la distribución de los núcleos se analizó en segmentos mesentéricos intactos fijados a presión, tal y como describieron Hernanz et al. (2015). Los segmentos fijados se incubaron con el colorante nuclear Hoechst 33342 (0,01 mg/mL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) durante 15 min. Después de lavar las arterias, se montaron en portaobjetos utilizando pocillos de silicona para evitar la deformación de las arterias. Se visualizaron con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con fuentes de láser de Argón y Helio-Neón usando un objetivo de inmersión en aceite x40, zoom 3.5 (longitud de onda de excitación 351-364 nm y longitud de onda de emisión 400-500 nm). Se tomaron al menos dos secciones ópticas en series (*stacks* de imágenes) de cortes ópticos de 0,5 μm de grosor, desde la adventicia hasta el lumen en diferentes regiones a lo largo de la arteria. Para la cuantificación se utilizó el software de análisis de imágenes Metamorph (Molecular Devices Corp. Downingtown, PA, EE. UU.). El número de núcleos se midió en el eje Z como se describió previamente (Briones et al., 2007), con pequeñas modificaciones.

Para permitir la comparación entre los diferentes grupos, se realizaron los siguientes cálculos sobre la base de segmentos de 1 mm de longitud: volumen de la arteria (en mm^3) [volumen = área de la sección transversal de la pared (CSA) (mm^2) x 1 mm], número total de células adventiciales y de músculo liso (n de células = n de núcleos por *stack* x n de *stacks* por volumen de la arteria); número total de células endoteliales [calculado por superficie luminal de la arteria de 1 mm de longitud; superficie luminal = 2π x diámetro (mm) x 1 mm / 2].

6.3. ORGANIZACIÓN DE LA LÁMINA ELÁSTICA INTERNA

La organización de la elastina dentro de la lámina elástica interna se estudió en segmentos intactos de MRA fijados a presión, utilizando microscopía confocal de fluorescencia (Leica TCS SP2); esta determinación se basa en las propiedades autofluorescentes de la elastina (longitud de onda de excitación 488 nm y longitud de onda de emisión 500-560 nm), tal y como se ha descrito previamente (Briones et al., 2003). Se captaron secciones ópticas en serie desde la adventicia hasta el lumen de 0,5 μm de grosor con un objetivo de inmersión en aceite x40 (Zoom 4), utilizando la línea de 488 nm del microscopio confocal. Se captaron un mínimo de dos *stacks* de imágenes de diferentes regiones en cada segmento arterial. El análisis cuantitativo de la lámina elástica se llevó a cabo con el software de análisis de imágenes Metamorph, tal y como se describió anteriormente (Briones et al., 2003). A partir de cada *stack* de imágenes seriadas se reconstruyeron las proyecciones individuales de la lámina elástica interna y se midió el área media de las ventanas y el número de estas por área de la imagen.

7. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE AORTA

Para el estudio de las propiedades estructurales de la aorta se llevó a cabo la tinción con Hematoxilina-Eosina en anillos de aorta fijados con PFA 4% e incluidos en parafina. Para ello, se realizaron cortes transversales de 5 μm con microtomo que se mantuvieron en una estufa a 65°C durante 30 min para retirar la parafina. A continuación, los cortes se introdujeron en xilol durante 5-10 min, en una serie decreciente de alcoholes (100%, 90% y 70%, 5 min en cada concentración) y en agua durante 5 min para hidratarlos. Más tarde, se cubrieron los cortes con hematoxilina (Sigma-Aldrich Co.) durante 5 min y se lavaron con agua hasta eliminar toda la hematoxilina; a continuación, se cubrieron los portaobjetos con eosina (VWR Chemicals, Rachor, PA, EE. UU.) durante 4 min y se introdujeron en una serie creciente de alcoholes (90% y 100%, 5 min en cada concentración). Por último, se volvieron a introducir los portaobjetos en xilol durante 10 min, se dejaron secar y, finalmente, se cubrieron con DPX (Sigma-Aldrich Co.) para su montaje.

Las imágenes fueron captadas en un microscopio invertido (Microscopio invertido Axio Vert. A1, Zeiss, Oberkochen, Germany) y una cámara (AxioCam 105 color, Zeiss) con objetivo x10 y analizadas con el software de análisis de imagen Metamorph, mediante la cuantificación de los perímetros externo e interno de los anillos, así como del grosor de la pared.

En el modelo de ratones tratados con HsTX[R14A], los estudios de las propiedades estructurales en aorta se llevaron a cabo en secciones de este tejido incluidas en OCT, las cuales se tiñeron con el colorante nuclear Hoechst 33342 (0,01 mg/mL) durante 10 min y, posteriormente, se lavaron con PBS. El grosor de la capa media de cada aorta se midió usando el software ImageJ (NIH, RRID:SCR_001935, Bethesda, MD, EE. UU.).

8. ESTUDIO DE HIPERTROFIA DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO

Los estudios de hipertrofia del ventrículo izquierdo se llevaron a cabo mediante el cálculo de la relación entre el peso del ventrículo y la longitud de la tibia según el método descrito por Yin et al. (1982). Para ello, se seccionó la pata izquierda del animal por encima de la articulación de la

rodilla, se eliminó el músculo y la piel de la tibia mediante pelado mecánico y se midió la longitud de la tibia desde los cóndilos hasta la punta del maléolo medial con un calibrador micrométrico. Las medidas de hipertrofia del ventrículo izquierdo se expresaron como peso del ventrículo en gramos por cm de longitud de la tibia.

9. ESTUDIO DE HIPERTROFIA DE LOS CARDIOMIOCITOS

El área media de los cardiomiocitos se evaluó en secciones de ventrículo izquierdo de 5 μm de grosor embebidas en parafina, cortadas con microtomo y teñidas con aglutinina de germen de trigo (WGA). Las secciones de tejido se incubaron en una cámara húmeda con WGA-CY3 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Biotium Inc., Fremont, CA, EE. UU.) y Hoechst 33342 (0,01 mg/mL) en PBS-Tween (PBS-T, 0,05%), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con PBS-T, se cubrieron con Prolong Live Antifade (Thermo Fisher Scientific) y se almacenaron a 4°C. Se captaron tres *stacks* por animal usando un objetivo de inmersión x63 con Zoom 1 en un microscopio confocal Leica TCS SP5 y se reconstruyeron las proyecciones individuales. Se midieron al menos 30 cardiomiocitos en cada campo utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ y se hizo el promedio de sus áreas.

10. DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN PLASMA

La producción de estrés oxidativo en plasma se determinó mediante la detección de malondialdehído (MDA). El MDA es ampliamente utilizado como biomarcador de estrés oxidativo, tratándose de un compuesto resultante de la peroxidación lipídica, un fenómeno en cadena que da lugar a la formación de diversos compuestos activos que provocan daños celulares. Su vida media y su alta reactividad le permiten actuar en el interior y exterior celular, reaccionando con proteínas y ADN en diferentes procesos patológicos; es por ello que su monitorización se ha usado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* como un biomarcador clave en varias patologías, como la hipertensión, la diabetes, la aterosclerosis o la insuficiencia cardíaca (Muñiz et al., 2014; Singh et al., 2014b).

Para llevar a cabo esta medida, se utilizó plasma congelado de los ratones de los diferentes modelos animales. Se mezcló 1 mL de plasma con 1 mL de solución de ácido tricloroacético (TCA, 20% en HCl 0,6 M) y se mantuvo en hielo durante 20 min; a continuación, se centrifugó a 1500 g durante 15 min a temperatura ambiente para precipitar las proteínas y se recogió el sobrenadante. A este sobrenadante se le añadió ácido tiobarbitúrico (TBA, 120 mM en Tris 260 mM, pH 7) en una relación 1:5 y se hirvió a 97°C durante 30 min, formándose un compuesto rojo 1:2, MDA-TBA, con un coeficiente de extinción molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en el espectro visible, que se midió a 535 nm a 20°C, utilizando como blanco 1 mL de PBS con el mismo procesamiento que las muestras.

11. DETECCIÓN IN SITU DE LA PRODUCCIÓN DE $\text{O}_2^{\cdot-}$

La producción de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) *in situ* se determinó mediante el análisis de la fluorescencia emitida por la oxidación del dihidroetidio (DHE), como previamente se ha descrito (Jiménez-Altayó et al., 2006). El DHE es un derivado de etidio que al oxidarse por acción del $\text{O}_2^{\cdot-}$

se intercala entre el ADN de las células, emitiendo una fluorescencia roja, lo que permite analizar la producción de $O_2^{\cdot -}$ *in situ*.

Se evaluó la producción de $O_2^{\cdot -}$ en cortes de ventrículo izquierdo y aorta procedentes de ratones de los diferentes grupos de tratamiento. Para ello, después de extraer los tejidos y limpiarlos, se mantuvieron en Krebs con sacarosa al 30% durante 2 horas. A continuación, se congelaron en medio OCT y se mantuvieron a $-80^{\circ}C$ hasta el día del experimento. Se realizaron cortes transversales del ventrículo izquierdo y la aorta de 8 μm de grosor con un criostato, que se recogieron en portaobjetos xilanizados y se secaron en una estufa a $37^{\circ}C$ durante 2 horas. Después, se realizó un lavado de los portaobjetos con Krebs-HEPES (NaCl 130 mM, KCl 5,6 mM, $CaCl_2$ 2 mM, HEPES 8,3 mM, glucosa 11 mM, pH 7,4) y se equilibraron durante 30 min a $37^{\circ}C$ con esta solución. A continuación, los portaobjetos se incubaron con Krebs-HEPES conteniendo DHE (5 μM , Sigma-Aldrich Co.) durante 30 min a $37^{\circ}C$ en una cámara húmeda protegida de la luz, se secaron y se cubrieron con Prolong Live Antifade. La fluorescencia fue detectada usando un objetivo de inmersión de x40 con Zoom 1, en el caso de los ventrículos, y un objetivo de inmersión x63 con Zoom 1, en el caso de las aortas, en un microscopio confocal Leica TCS SP5, equipado con un láser kriptón/argón, con una longitud de onda de excitación de 561 nm.

Para la cuantificación, se analizaron de tres a cuatro secciones de cada animal, se promediaron y se calcularon las densidades medias de fluorescencia en la región objetivo usando el software de análisis de imagen Metamorph. Para minimizar las fluctuaciones del láser de un día a otro, cada día se analizaron en paralelo cortes de los cuatro grupos experimentales del modelo, usando las mismas condiciones de captura de imágenes. Los datos se expresaron como % de la señal en los animales control.

12. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA

La producción de $O_2^{\cdot -}$ generada por la NAD(P)H oxidasa se determinó mediante un ensayo de quimioluminiscencia. El ventrículo izquierdo se homogeneizó en tampón fosfato (KH_2PO_4 50 mM, EGTA 1 mM, sacarosa 150 mM, pH 7,4). La reacción se inició añadiendo NAD(P)H (100 μM , Sigma-Aldrich Co.) a una placa que contenía lucigenina (5 μM , Sigma-Aldrich Co.) y una mezcla de proteínas de la muestra y tampón fosfato hasta un volumen final de 250 μL . La quimioluminiscencia se determinó cada 1,8 seg durante 3 min en un luminómetro de placa de microtitulación (EnSpire multimode Plate Reader, Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). La actividad de referencia en ausencia de NAD(P)H se restó de cada lectura y se normalizó con la concentración de proteína. La actividad se calculó como porcentaje de unidades luminosas relativas por mg de proteína y se expresó en porcentaje respecto al grupo control, que fue considerado el 100%.

13. MEDIDAS DE LIBERACIÓN DE NO

La producción de NO fue determinada en segmentos aórticos de los distintos grupos experimentales. En primer lugar, se estabilizaron los segmentos aórticos con Krebs-HEPES durante 30-45 min a $37^{\circ}C$. Posteriormente se incubaron con la sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, 20 μM , Sigma-Aldrich Co.) en Krebs-HEPES durante 45 min a $37^{\circ}C$ (Martínez-Revelles et al., 2013). A continuación, los segmentos aórticos fueron permeabilizados con tritón (0,05 %, 3-5 min, Sigma-Aldrich Co.), se les añadió Phe (1 μM , 3-5 min) y, finalmente,

ACh (30 μ M, 10 min). Los niveles de NO se midieron en el sobrenadante utilizando un espectrofluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Para evitar variaciones en la fluorescencia entre diferentes días, todas las condiciones experimentales fueron medidas cada día. Como control negativo se utilizaron segmentos incubados con L-NAME (0,1 mM). La cantidad de NO liberado se calculó en unidades arbitrarias por mg de proteína y fue expresada en porcentaje respecto al grupo control, considerando este como 100%.

Además, se utilizó el kit de detección de NO DetectX[®] (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, EE. UU.) diseñado para medir cuantitativamente los nitratos y nitritos presentes en gran variedad de muestras. Los nitritos son el único producto final estable de la autooxidación del NO en solución acuosa, y su concentración es proporcional a la cantidad de NO. A su vez, estos nitritos se oxidan fácilmente a nitratos en solución acuosa a pH 7,4, proceso que ocurre normalmente en el organismo. Con la suma de la medida de nitratos y nitritos obtenida del kit obtuvimos el contenido de NO. El protocolo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se usaron sobrenadantes de arterias que fueron estabilizadas en Krebs-HEPES durante 30 min a 37°C y a las que se añadió Phe (1 μ M, 5 min) y ACh (30 μ M, 10 min). Como control negativo se utilizaron segmentos incubados con L-NAME (0,1 mM). Los resultados se expresaron en concentración (μ M) de nitritos por mg de proteína.

14. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

Los niveles de ARNm de genes específicos fueron determinados mediante la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) en lisados celulares de CMLV, células endoteliales y macrófagos, así como en segmentos aórticos y muestras de ventrículo izquierdo.

Una vez finalizados los distintos tratamientos en los cultivos celulares, se retiró el medio de cultivo de las placas, se lavaron con PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} frío y se aisló el ARN total utilizando TRIreagent (Sigma-Aldrich Co.), según el protocolo del fabricante. Para realizar la extracción de ARN de las arterias y los ventrículos izquierdos, estos se homogeneizaron en frío usando un triturador de muestras o un Politrón (PT-2010, Kinematica AG, Lucerna, Suiza), respectivamente, siguiendo el mismo protocolo indicado para el TRIreagent. El ARN extraído se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

A continuación, se transcribió 1 μ g de RNA de forma inversa con el kit de síntesis High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). La cuantificación de los niveles de ARNm se realizó mediante PCR en tiempo real con cebadores *forward* y *reverse* y sondas específicas para PCR en tiempo real ([Tabla 2](#)) utilizando el kit NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x), ROX (Nzytech, Lisboa, Portugal) para cebadores *forward* y *reverse* o el kit NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2), ROX (Nzytech) para sondas y un sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems de Life Technologies), usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante 30 s a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 5 s y 30 s a 60°C. Al final de la PCR, se realizó un análisis de la curva de fusión para mostrar la especificidad del producto de la PCR. Para calcular el índice relativo de expresión génica se usó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como calibrador muestras no tratadas de ratones control. Se utilizó *$\beta 2$ -microglobulina* o *18S* como

control endógeno, agua como control negativo y todas las reacciones se realizaron por duplicado.

<i>Gen</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Adgre1 (F4/80)</i>	5' TGCTCTAACTCTGTGGGAAGC 3'	5' GTTCAGGGCAAACGTCTCG 3'
<i>β2m</i>	5' ACCCTGGTCTTTCTGGTGCTT 3'	5' TAGCAGTTCAGTATGTTCCGGCTT 3'
<i>Bnp</i>	5' AATTCAAGATGCAGAAGCTG 3'	5' GAATTTTGAGGTCTCTGCTG 3'
<i>Ccl2 (MCP-1)</i>	5' CATCCACGTTGCTCA 3'	5' GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT 3'
<i>Cd3e</i>	5' TGGCTACTACGTCTGCTAA 3'	5' TATGGCTACTGCTCAGGT 3'
<i>Colágeno I</i>	5' GTCCTAGTCGATGGCTGCTC 3'	5' AGCACCACCAATGTCCAGAG 3'
<i>Cybb (Nox2)</i>	5' TGTATGCTGATCCTGCTGCC 3'	5'GTGACCTTCTGTCCAGTTG 3'
<i>Hmox-1</i>	5' CACGCATATACCCGCTACTC 3'	5' CCAGAGTGTTCAATTCGAGCA 3'
<i>Il-1β</i>	5' TGTATGCTGATCCTGCTGCC 3'	5' GTGACCTTCTGTCCAGTTG 3'
<i>Il-6</i>	5' TGATGGATGCTACCAAAGTGG 3'	5' TTCATGTACTCCAGGTAGCTATGG 3'
<i>Kcna3</i>	5' AGTATATGGTGATCGAAGAGG 3'	5' AGTGAATATCTTCTTGATGTT 3'
<i>Kcna5</i>	5' TCCGACGGCTGGACTCAATAA 3'	5' CAGCTCCTGAGGCATAGGG 3'
<i>Lamp2 (Mac3)</i>	5' TCCTGATCTTTCTGTTTCTA 3'	5' GCCTTGTCAGGTAAGTCAAT 3'
<i>Nox1</i>	5' CAACAGCACTACCAATGCC 3'	5' ACATCCTCACTGACTGTGCC 3'
<i>Nqo1</i>	5' CCATGTACGACAACGGTCCT 3'	5' CACGGGGACATGAACGTCA 3'
<i>Nrf2</i>	5' ATCCAGACAGACACCAAGTGA 3'	5' GTCTCTGCCAAAAGCTGCATAC 3'
<i>Ptges2 (COX-2)</i>	5' TTCGGGAGCACAACAGAGT 3'	5' TAACCGCTCAGGTGTTGCAC 3'
<i>Tnfa</i>	5' CCACGCTTCTGTCTACTG 3'	5' TGAGGGTCTGGCCATAGA 3'
<i>KCNA3</i>	Hs.PT.58.25941067.g [Integrated DNA Technologies (IDT) Inc., Coralville, IA, EE. UU.]	
<i>18S</i>	4310893E (Thermo Fisher Scientific)	

Tabla 2. Cebadores comerciales (Sigma-Aldrich Co.) y sondas usadas en los análisis de RT-qPCR.

15. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA Y WESTERN BLOT (WB)

La expresión de proteína se analizó mediante técnicas de Western Blot. Para la obtención de la proteína, los cultivos de CMLV se lavaron 2 veces con PBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} después del tratamiento y se rascaron en 100 μl de tampón de lisis (Tris ultrapuro 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2,19 mM, EGTA 1,99 mM, Tritón 0,2%, NP40 0,3%). En el caso de las aortas y ventrículos izquierdos, estos fueron homogeneizados con un homogeneizador de vidrio en el mismo tampón de lisis. El tampón de lisis se suplementó con una mezcla de inhibidores de proteasas "Inhibitor Cocktail Complete" 50X/50 mL (Roche Diagnostics, Barcelona, España) y con distintos inhibidores de fosfatasa, incluyendo NaF 50 mM (inhibidor de tirosin fosfatasa, Sigma-Aldrich

Co.), ortovanadato sódico 1mM (inhibidor de serin-treonin fosfatasas, Sigma-Aldrich Co.) y β -glicerofosfato 20 mM (falso sustrato para fosfatasas, Sigma-Aldrich Co.).

Para la obtención de extractos nucleares, las CMLV fueron lavadas con PBS frío 2 veces y homogeneizadas en 120 μ l de tampón 1 (HEPES 20 mM, pH 7,9; KCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; glicerol 10%; NP40 0,2%). Tras ello, se transfirió el volumen a un eppendorf, se agitó suavemente y se dejó en hielo durante 5 min. Pasado ese tiempo, se centrifugaron 5 min a 4°C y 900 g, se separó el sobrenadante del precipitado, donde se encuentran los extractos nucleares y se lavó con 100 μ l de PBS. Se centrifugó 5 min a 4°C y 500 g y se descartó el sobrenadante para posteriormente añadir 100 μ l de tampón 2 (HEPES 20 mM, pH 7,9; NaCl 400 mM; NaDoc 0,5%; glicerol 2%) y resuspender el pellet, dejándolo 30 min en agitación orbital a 4°C. Tras este periodo se agitó con vortex 10 seg y se centrifugó 10 min a 4°C y a 13000 g. El sobrenadante donde se encuentran los extractos nucleares se almacenó a -80°C hasta su utilización.

La cuantificación de proteína se realizó con el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Se calculó el volumen de muestra necesario en función de la cantidad de proteína que se deseaba cargar y se mezcló con solución de tampón de carga o tampón Laemmli 5X (Tris-HCl 300 mM, pH 6,8; SDS 10%; β -mercaptoetanol 25%; azul de bromofenol 0,5% (p/v); glicerol 50%). La mezcla se incubó a 95°C durante 1 min para desnaturalizar las proteínas.

En un sistema de electroforesis Mini-Protean® 3 Cell (Bio-Rad Laboratories) se polimerizaron dos geles de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-Page), gel 1 o gel separador (Acrilamida 7,5 o 10%; Tris-HCl 4,6%, pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato amónico 0,038%; temed 0,033%; glicerol 3,4%) y gel 2 o gel concentrador (Acrilamida 3%; Tris-HCl 1,49%, pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato amónico 0,98%; temed 0,053%), donde se cargaron las proteínas para su separación.

Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting 0,2 μ m, Bio-Rad Laboratories). Para ello, el gel, la membrana y varias láminas de papel Whatman se colocaron en un sistema "sándwich" dentro de un sistema de transferencia Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad Laboratories), inmersos en solución de transferencia (Tris 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,05%; metanol 20%) al que se aplicó una corriente constante de 2,5 A y hasta 25 V durante 7 min.

Una vez transferidas las proteínas, los sitios de unión no específicos se bloquearon con leche en polvo no grasa al 5% en solución salina tamponada con Tris y Tween (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente y las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón para p65 e iNOS o de conejo para MyD88, NLRP3, HO-1 o Nrf2 ([Tabla 3](#)) durante toda la noche a 4°C en agitación continua. A continuación, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón (1:4000, Bio-Rad Laboratories, número de catálogo #1706516) o anti-conejo (1:2000, Bio-Rad Laboratories, número de catálogo #1706515) conjugado con peroxidasa de rábano durante 1 hora. Los inmunocomplejos se detectaron en un sistema de imágenes ChemiDocTMMP (Bio-Rad Laboratories). Las señales del inmunoblot se cuantificaron con el software Image lab versión 6.0 (Bio-Rad Laboratories). La misma membrana se utilizó para determinar la expresión de α -tubulina, GAPDH o TBP como control de carga utilizando anticuerpos monoclonales de ratón o policlonales de conejo ([Tabla 3](#)). Los datos de expresión proteica se expresaron como la relación entre las señales en el inmunoblot correspondiente a la proteína estudiada y la de la tubulina, GAPDH o TBP. Para comparar los resultados de la expresión proteica, se asignó un valor de 1 a las muestras de los animales control.

<i>Nombre</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fuente</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Número de catálogo</i>
<i>α-tubulina</i>	1:20000	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich Co.	T5168
<i>GAPDH</i>	1:5000	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich Co.	CB1001
<i>HO-1</i>	1:1000	Monoclonal de conejo	Enzo Life Science Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.	ADI-SPA-895
<i>MyD88</i>	1:1000	Monoclonal de conejo	Abcam, Cambridge, RU	ab2064
<i>NLRP3</i>	1:1000	Monoclonal de conejo	Abcam	ab263899
<i>NOS2</i> <i>(iNOS)</i>	1:1000	Monoclonal de ratón	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.	610432
<i>Nrf2</i>	1:1000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, EE. UU.	#12721
<i>p65</i>	1:1000	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc.	SC-8008
<i>TFIID (TBP)</i>	1:1000	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology Inc.	SC-204

Tabla 3. Anticuerpos usados en los análisis de Western Blot.

16. INMUNOCITOQUÍMICA DE LOS CANALES $K_v1.3$ EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

Los macrófagos peritoneales se sembraron en placas de 24 pocillos, en las que se había colocado previamente un cubreobjetos de vidrio circular estéril. Los siguientes pasos del protocolo se llevaron a cabo en una cámara húmeda y, entre cada paso, las preparaciones se lavaron con PBS. Los macrófagos se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo IgG anti $K_v1.3$ (extracelular) (1:150, APC-101, RRID:AB_2040149, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) durante 24 h a 4°C. El anticuerpo primario se diluyó en DMEM sin suero ni antibióticos. Las células se fijaron en PFA al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadió una solución de bloqueo compuesta por PBS con 10% de FBS durante 45 min a temperatura ambiente para reducir las reacciones no específicas. Se utilizó la solución de cabra Alexa IgG anti-conejo (1:500, A11035, RRID:AB_2534093, Thermo Fisher Scientific) como anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente; se utilizó el reactivo de tinción nuclear DAPI (1:1.000, Invitrogen Life Technologies, Paisley, Reino Unido) durante 5 min a temperatura ambiente. Tanto el anticuerpo secundario como el DAPI se diluyeron en la solución de bloqueo. Los cubreobjetos se montaron con el reactivo Prolong Live Antifade, se examinaron con un microscopio confocal espectral LSM710 (Zeiss) y se procesaron con el sistema de adquisición de imágenes ZEN2009 (Zeiss). Cuando se omitió el paso de incubación con el anticuerpo anti- $K_v1.3$, no se detectó ninguna

señal, apoyando la especificidad del anticuerpo primario (experimentos de control negativo). Además, se utilizaron macrófagos polarizados con LPS que se sabe que expresan canales Kv1.3 como controles positivos; sus membranas plasmáticas se inmunizaron con éxito con este anticuerpo anti-Kv1.3 (experimentos de control positivo). La intensidad de la fluorescencia se cuantificó utilizando el software ImageJ.

17. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (v8.0.2). Todos los valores se expresan como el valor medio \pm SEM y los gráficos de puntos o n representan el número de animales estudiados o de cultivos usados. Para elegir la prueba estadística adecuada, se estudió la distribución de los datos mediante la prueba de normalidad Saphiro-Wilk. Las diferencias entre medias se analizaron mediante pruebas de Mann-Whitney, t de Student no pareada o ANOVA de una o dos vías seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Se consideró significativo un valor de probabilidad menor del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1. PAPEL DE LOS CANALES $K_v1.3$ EN LAS ALTERACIONES VASCULARES EN HIPERTENSIÓN

Se ha descrito que los canales $K_v1.3$ juegan un papel importante en el control del tono vascular, en el fenotipo de las CMLV y en funciones celulares como la secreción, migración, proliferación y apoptosis (Cidad et al., 2012). Además, estos canales también regulan el fenotipo de los macrófagos, de manera que pueden estar implicados en procesos inflamatorios en diversos tejidos, incluida la pared vascular. Por todo ello, estos canales podrían tener un papel significativo en las alteraciones vasculares observadas en la hipertensión. Así, evaluamos el papel de estos canales en dichas alteraciones usando el bloqueador de los mismos HsTX[R14A]. También se utilizó otro bloqueador de estos canales, [EWSS]ShK, con el que se llevaron a cabo experimentos que permitieron confirmar algunos de los resultados obtenidos.

1. EFECTO DE ANGIOTENSINA II SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES $K_v1.3$ A NIVEL VASCULAR

En primer lugar, analizamos la expresión de los canales $K_v1.3$ a nivel vascular en aortas de ratones infundidos durante dos semanas con Ang II. La infusión de Ang II aumentó los niveles del ARNm de *Kcna3* en dicho tejido; el bloqueo de los canales $K_v1.3$ abolió dicho incremento (**Figura 27A**). Sin embargo, el tratamiento con HsTX[R14A] (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no modificó la expresión vascular de *Kcna3* en aorta de animales control (resultados no mostrados).

La expresión de $K_v1.5$ también parece tener un papel relevante en el fenotipo de las CMLV (Jackson, 2018), por lo que, analizamos la expresión de este canal en aortas de ratones tratados con Ang II. En este caso, la infusión de Ang II tendió a aumentar los niveles de ARNm de *Kcna5*, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo; el tratamiento con HsTX[R14A] no modificó dicha expresión (**Figura 26B**); consecuentemente, en los animales infundidos con Ang II no se modificó la proporción *Kcna3/Kcna5* (**Figura 26C**).

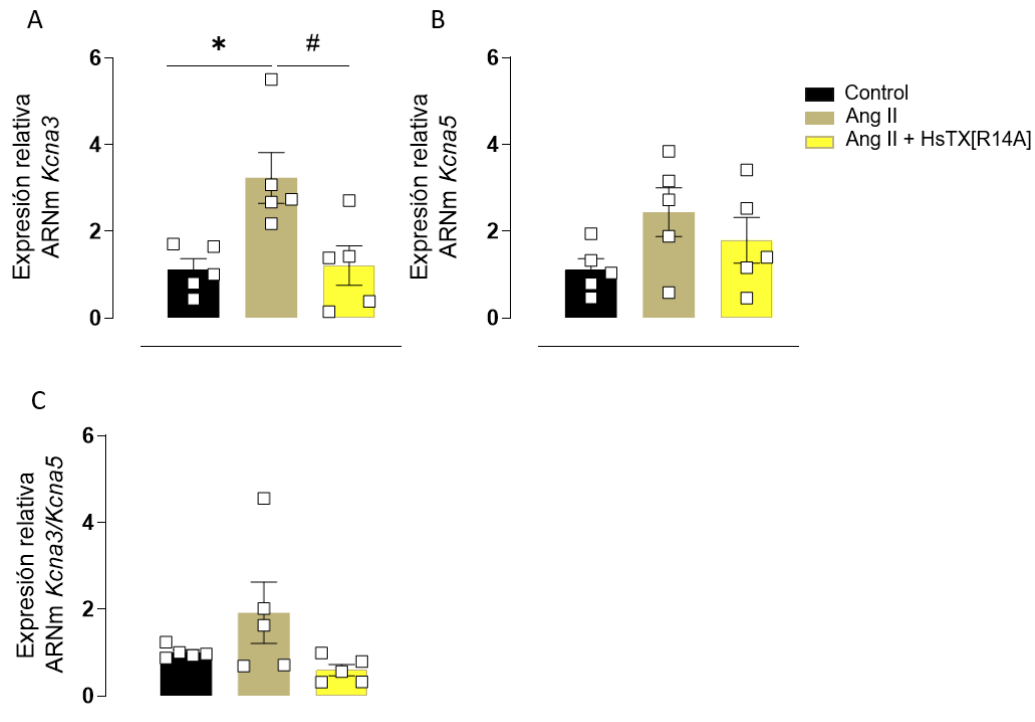


Figura 26. El bloqueo de los canales $K_v1.3$ previene el incremento de sus niveles de ARNm inducido por Ang II en aorta. Expresión relativa de los niveles de ARNm de *Kcna3* (A) y *Kcna5* (B) y relación *Kcna3/Kcna5* (C) en aorta de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 µg/Kg/inyección, cada 2 días) (n = 5-6). Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HsTX[R14A] SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

Una vez comprobada la presencia del canal $K_v1.3$ a nivel vascular, y puesto que Ang II induce su expresión, evaluamos el papel de dichos canales sobre la presión arterial. La infusión de Ang II produjo un incremento significativo en la presión arterial con respecto a los ratones control; el tratamiento con el bloqueador de los canales $K_v1.3$ HsTX[R14A] no afectó al desarrollo de hipertensión (Figura 27) y tampoco modificó la presión arterial en animales control (resultados no mostrados). Resultados similares se obtuvieron cuando usamos otro bloqueador de $K_v1.3$, [EWSS]ShK (resultados no mostrados).

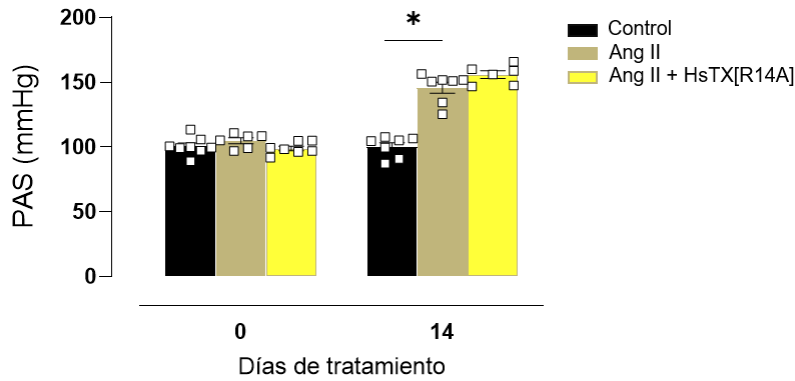


Figura 27. El bloqueo de los canales $K_v1.3$ no afecta al desarrollo de hipertensión inducido por Ang II. Presión arterial sistólica (PAS) en ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (n = 6-8). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs Control por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HsTX[R14A] SOBRE EL REMODELADO VASCULAR

A continuación, comprobamos el papel de los canales $K_v1.3$ en el remodelado vascular inducido por Ang II en aorta, caracterizado por un incremento en el grosor de la pared vascular (*Wall thickness*), como se había descrito anteriormente (Martínez-Revelles et al., 2013); este parámetro no se vio modificado por el tratamiento con HsTX[R14A] (**Figura 28**).

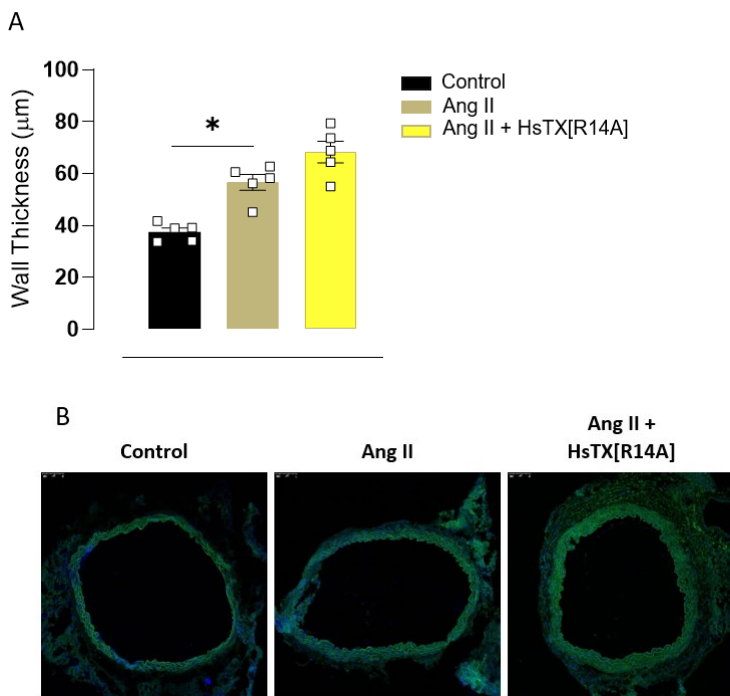


Figura 28. El bloqueo de los canales $K_v1.3$ no afecta al remodelado vascular inducido por Ang II en aorta. Espesor de la pared vascular aórtica (*wall thickness*) (A) e imágenes representativas obtenidas mediante tinción con el colorante nuclear Hoechst 33342 (tamaño de la imagen: 1055 x 1055 μm) (B) de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 μg /Kg/inyección, cada 2 días) (n = 5). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs Control por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

En cuanto a las arterias mesentéricas de resistencia, la infusión de Ang II también produce una alteración de la estructura de la pared vascular, tal y como nuestro grupo ha descrito previamente (Hernanz et al., 2015). Este remodelado se caracterizó por una reducción del diámetro interno vascular (**Figura 29A**) y un incremento en el espesor de la pared vascular (**Figura 29B**), así como en la relación media/luz (**Figura 29C**); el tratamiento con HsTX[R14A] no modificó ninguno de estos parámetros (**Figura 29A-C**). Del mismo modo, el tratamiento con [EWSS]ShK tampoco mostró ningún efecto sobre el remodelado vascular de arterias mesentéricas de resistencia (resultados no mostrados).

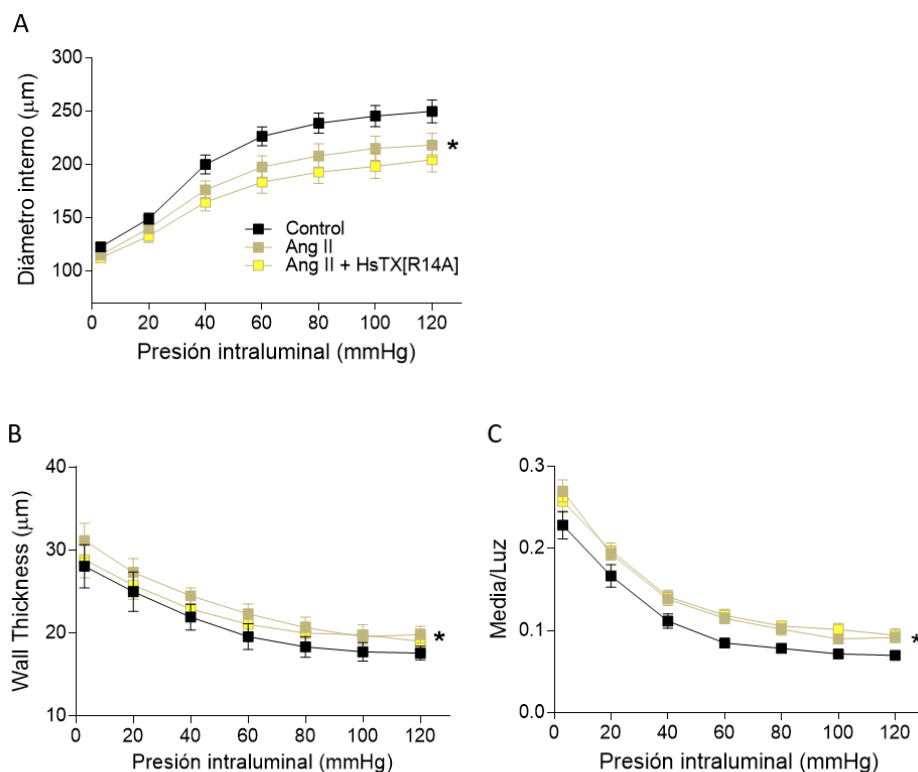


Figura 29. El bloqueo de los canales Kv1.3 no afecta al remodelado vascular inducido por Ang II en arterias mesentéricas de resistencia. Diámetro interno (A), espesor de la pared (*wall thickness*) (B) y relación media/luz (C) de arterias mesentéricas de resistencia de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 µg/Kg/inyección, cada 2 días) (n = 6-7). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0,05 vs Control por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HsTX[R14A] SOBRE LA RIGIDEZ VASCULAR

Además del efecto sobre el remodelado vascular, Ang II indujo un incremento en la rigidez vascular, caracterizado por el desplazamiento hacia la izquierda de la curva estrés-tensión (**Figura 31A**). Puesto que la relación estrés-tensión no es lineal, se obtuvo un módulo elástico tangencial o incremental (β) que determina la pendiente de la curva estrés-tensión; el aumento del valor de β encontrado es indicativo de una mayor rigidez vascular (**Figura 30B**). Además, evaluamos la distensibilidad incremental en estas arterias, observándose una reducción de este parámetro en los ratones infundidos con Ang II (**Figura 30C**). Los cambios observados en la rigidez no se vieron afectados por el tratamiento con HsTX[R14A] ni de los animales hipertensos

(Figura 30A-C) ni de animales control (resultados no mostrados), así como tampoco con [EWSS]ShK (resultados no mostrados).

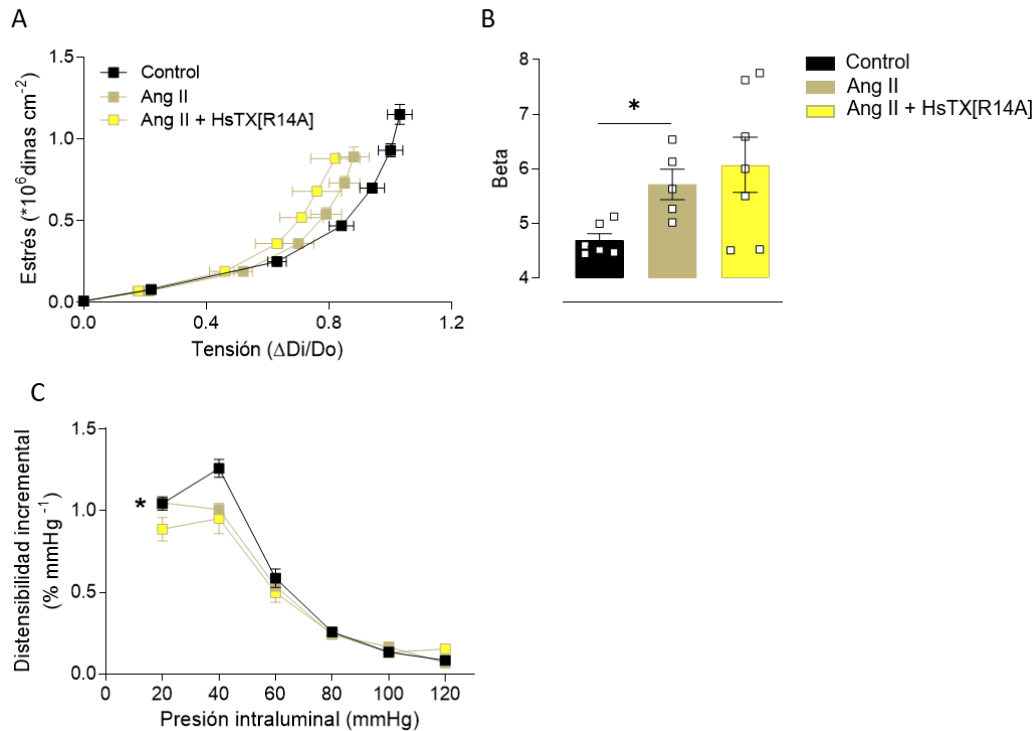


Figura 30. El bloqueo de los canales $K_v1.3$ no afecta al aumento de la rigidez vascular inducido por Ang II en arterias mesentéricas de resistencia. (A) Relación estrés-tensión, (B) cálculo del módulo elástico tangencial o incremental (β) y (C) distensibilidad incremental de arterias mesentéricas de resistencia de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 μ g/Kg/inyección, cada 2 días) ($n = 5-7$). D_o , diámetro interno a 3 mmHg; D_i , diámetro interno observado para una presión intravascular dada. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs Control por ANOVA de una vía (B) o de dos vías (C) seguido de test de Bonferroni.

5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HsTX[R14A] SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

Además de cambios en la estructura y mecánica vascular, la hipertensión arterial está asociada a alteraciones en la función vascular causando, entre otras cosas, disfunción endotelial; por ello, analizamos el efecto del tratamiento de ratones hipertensos con el bloqueador de los canales $K_v1.3$ sobre la función vascular, tanto en aorta como en arterias mesentéricas de resistencia.

La infusión de Ang II provocó un deterioro de las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina, tanto en aorta (Figura 31A) como en arterias mesentéricas (Figura 31C); el tratamiento con el bloqueador selectivo del canal $K_v1.3$ HsTX[R14A] previno esta disfunción endotelial en ambos tipos vasculares (Figura 31A, C).

En cuanto a la relajación independiente de endotelio inducida por el donador de NO DEA-NO, no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos, ni en aorta ni en arterias mesentéricas, independientemente del tratamiento con Ang II (Figura 31B, D). Por otro lado, las respuestas vasoconstrictoras a una solución de alto potasio tampoco se modificaron por la infusión de Ang II ni por el bloqueo de los canales $K_v1.3$ en ninguno de los dos lechos vasculares

(resultados no mostrados); estos resultados sugieren que la función muscular de estos vasos no está afectada por el bloqueo del canal.

Del mismo modo que HsTX[R14A], el tratamiento con [EWSS]ShK previno la disfunción endotelial inducida por Ang II en aorta, no mostrando diferencias en la relajación independiente de endotelio inducida por DEA-NO (resultados no mostrados). Por otra parte, HsTX[R14A] y [EWSS]ShK no modificaron la relajación inducida por ACh o DEA-NO, ni la contracción inducida por una solución de alto potasio en la aorta o en las arterias mesentéricas de los ratones control (resultados no mostrados).

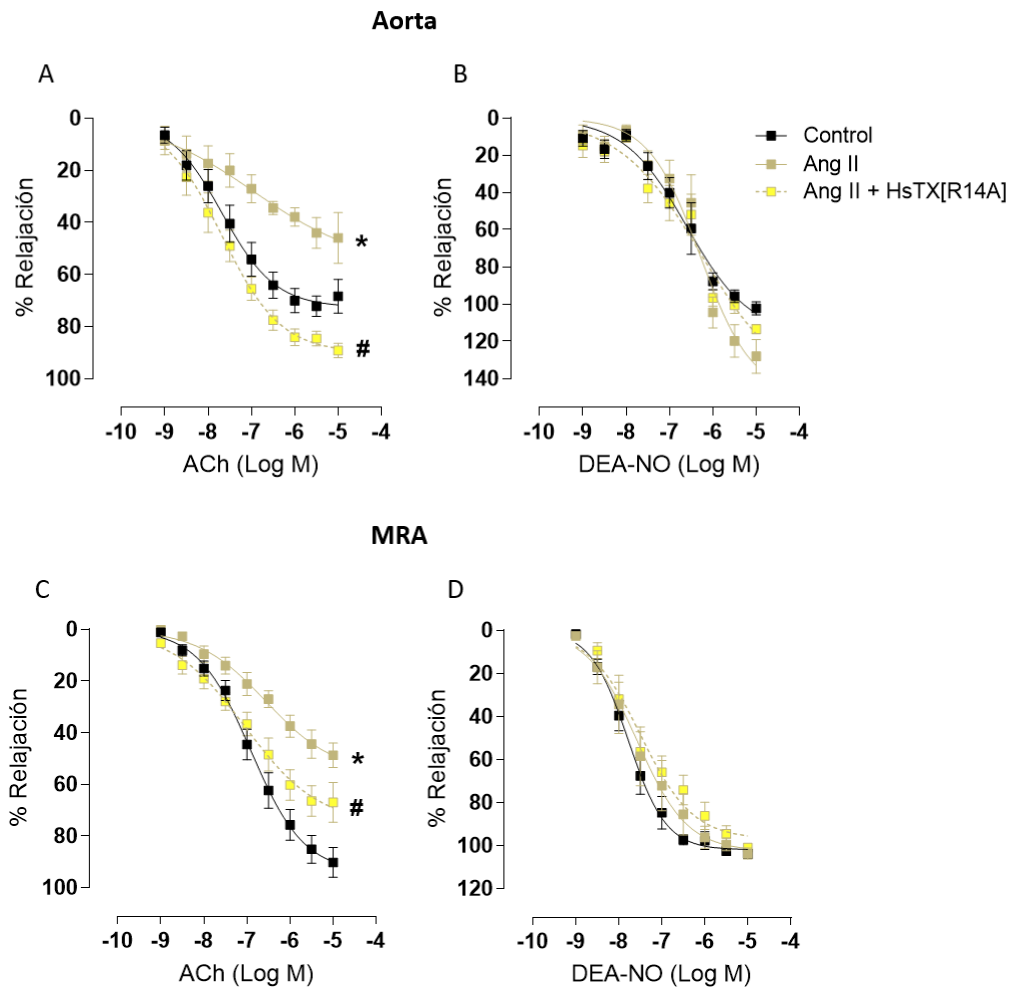


Figura 31. El bloqueo de los canales $K_v1.3$ previene la disfunción endotelial inducida por Ang II en aorta y en arterias mesentéricas de resistencia. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) y NONOato de dietilamina (DEA-NO) en aortas (A, B) ($n = 5-7$) y arterias mesentéricas de resistencia (MRA) (C, D) ($n = 7-8$) de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 μ g/Kg/inyección, cada 2 días). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a Phe. * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

6. EFECTO DE ANGIOTENSINA II SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES $K_v1.3$ EN CÉLULAS ENDOTELIALES

Dados los resultados obtenidos tras el bloqueo de los canales $K_v1.3$ en la disfunción endotelial, evaluamos el efecto de Ang II sobre la expresión de los canales $K_v1.3$ a nivel endotelial, para lo que utilizamos cultivos de células endoteliales microvasculares humanas expuestas a Ang II. La incubación durante 6 o 24 horas con Ang II (1 nM) no modificó los niveles de ARNm de *KCNA3* (Figura 32), lo que parece excluir el papel de los canales $K_v1.3$ endoteliales en la disfunción endotelial inducida por Ang II.

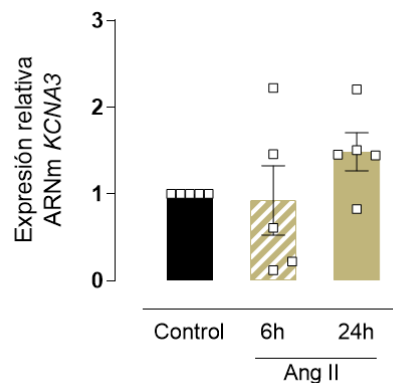


Figura 32. Ang II no modifica la expresión de $K_v1.3$ en células endoteliales. Expresión relativa de los niveles de ARNm de *KCNA3* en células endoteliales microvasculares humanas incubadas con Ang II (1 nM) durante 6 y 24 h (n = 5). Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control.

7. EFECTO DE ANGIOTENSINA II SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES $K_v1.3$ EN EL TEJIDO ADIPOSITO PERIVASCULAR Y SOBRE LA INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS

A la vista de los resultados obtenidos, los cuales sugieren que los canales $K_v1.3$ implicados en la disfunción endotelial no se encontrarían ni en las CMLV ni en las células endoteliales, evaluamos los niveles de $K_v1.3$ en la parte más externa de los vasos. Los grandes vasos, como la aorta, están rodeados de PVAT, el cual está en contacto muy estrecho con la adventicia, la capa externa de la pared vascular (Gao, 2017), por lo que medimos los niveles de ARNm de *Kcna3* en este tejido; observamos un incremento en la expresión del canal en el tejido adiposo perivascular de ratones infundidos con Ang II (Figura 33).

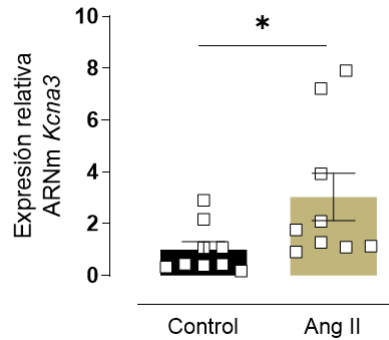


Figura 33. Ang II incrementa la expresión de los canales Kv1.3 en el tejido adiposo perivascular. Expresión relativa de los niveles de ARNm de *Kcna3* en tejido adiposo perivascular de aorta de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 9). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. * $p < 0,05$ por t de Student no pareada.

El PVAT es un tejido que, además de adipocitos, contiene células inmunes, habiéndose descrito que Ang II incrementa la infiltración de macrófagos en él (Mikolajczyk et al., 2016); además, es sabido que los canales de potasio modulan la fisiología de los macrófagos, de manera que se ha relacionado la estequiometría de los canales Kv1.3/Kv1.5 con la proliferación y activación de estas células, observándose un incremento de Kv1.3 en la activación clásica (M1) y una reducción en la activación alternativa (M2) (Chandy et al., 2004; Villalonga et al., 2010; Moreno et al., 2013). Por ello, en primer lugar, evaluamos la infiltración de macrófagos en PVAT, analizando la expresión génica de los marcadores de macrófagos *Lamp2* (Mac-3) y *Adgre1* (F4/80) en dicho tejido. En este sentido, confirmamos el incremento en la expresión de estos marcadores tras la infusión de Ang II; dicha expresión se redujo significativamente con el tratamiento con HsTX[R14A] (Figura 34). En animales control, el tratamiento con HsTX[R14A] no modificó el contenido de macrófagos en el tejido adiposo perivascular (resultados no mostrados). Por otra parte, en aortas de animales a los que se les había retirado el tejido adiposo, no se observaron cambios en el contenido de macrófagos (resultados no mostrados). Estos datos sugieren que los canales Kv1.3 juegan un papel en el incremento de la infiltración de macrófagos en el PVAT inducido por la infusión de Ang II.

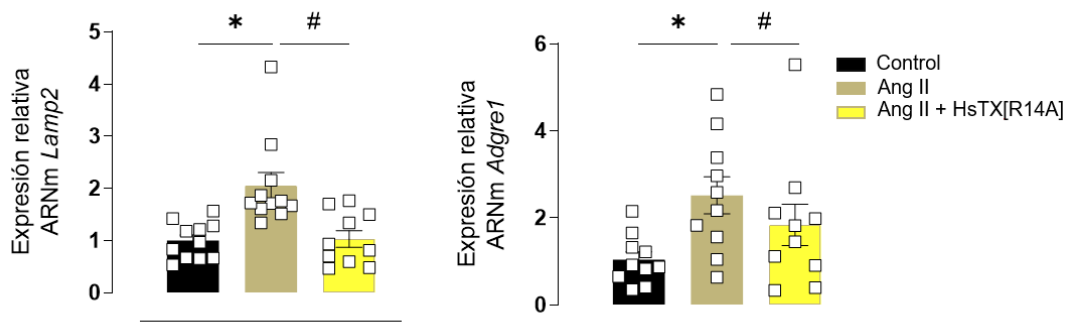


Figura 34. El bloqueo de los canales Kv1.3 previene la infiltración de macrófagos en tejido adiposo perivascular inducida por Ang II. Expresión relativa de los niveles de ARNm de los marcadores de macrófagos *Lamp2* y *Adgre1* en tejido adiposo perivascular de aorta de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 μ g/Kg/inyección, cada 2 días) (n = 8-11). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Teniendo en cuenta estos resultados y dado el papel descrito para la relación de la expresión de los canales $K_v1.3/K_v1.5$ en la proliferación y activación de los macrófagos (Villalonga et al., 2010; Moreno et al., 2013), medimos los niveles de ambos canales en macrófagos peritoneales de los ratones de nuestro modelo. La infusión de Ang II aumentó de forma importante los niveles tanto de proteína (**Figura 35A**) como de ARNm de $K_v1.3$ en estas células, sin afectar a la expresión de ARNm de *Kcna5* (**Figura 35B**), dando como resultado un incremento de la relación *Kcna3/Kcna5* (**Figura 35C**). El tratamiento de los animales infundidos con Ang II con HsTX[R14A] abolió completamente el incremento de la expresión de *Kcna3* inducido por Ang II, sin afectar de nuevo a la expresión de *Kcna5* (**Figura 35B**), reduciéndose así la proporción *Kcna3/Kcna5* (**Figura 35C**). En los macrófagos peritoneales de los animales control, el bloqueo de los canales $K_v1.3$ no modificó la expresión de ninguno de estos dos canales (resultados no mostrados).

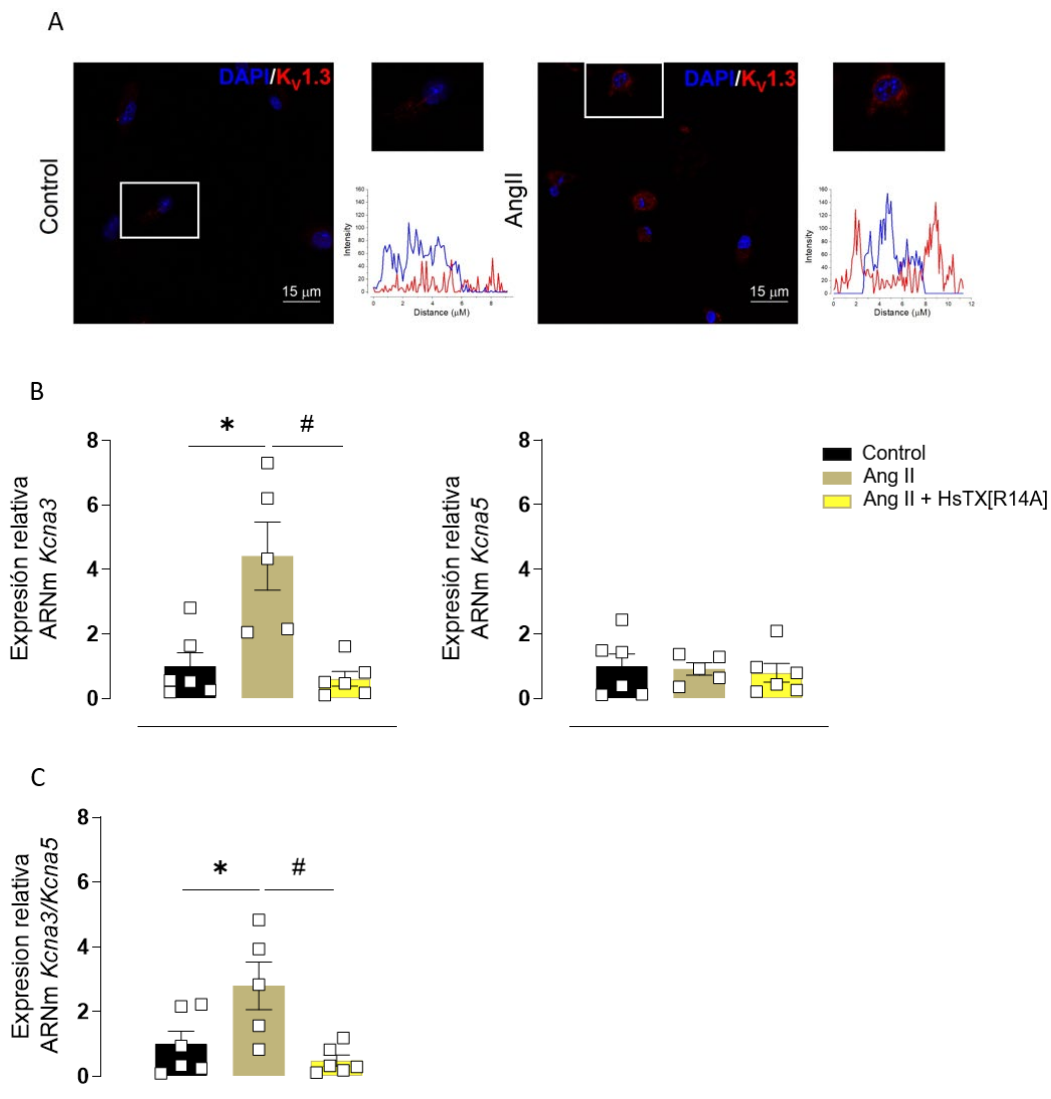


Figura 35. El bloqueo del canal $K_v1.3$ previene el aumento en la expresión de dicho canal inducido por Ang II en macrófagos peritoneales. (A) Imágenes representativas de la expresión proteica de $K_v1.3$ en macrófagos peritoneales de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 4-6). (B) Expresión relativa de los niveles de ARNm de *Kcna3* y *Kcna5* y (C) relación *Kcna3/Kcna5* en macrófagos peritoneales de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II, tratados o no con HsTX[R14A] (100 μ g/Kg/inyección, cada 2 días) (n = 5-6). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

8. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HsTX[R14A] SOBRE EL FENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS

A continuación, evaluamos en macrófagos peritoneales los niveles de expresión génica de algunos marcadores del fenotipo M1, como son las citoquinas proinflamatorias *IL-6*, *IL-1 β* y *TNF α* , la enzima proinflamatoria COX-2 (*Ptgs2*) o la subunidad de la NAD(P)H oxidasa Nox2 (*Cybb*), con el fin de analizar la posible polarización de dichas células hacia un fenotipo proinflamatorio.

La infusión de Ang II incrementó significativamente los niveles de ARNm de *IL-6*, *IL-1 β* y *Ptgs2*, sin observarse modificaciones en *TNF α* y Nox2. Los macrófagos peritoneales de los ratones infundidos con Ang II y tratados con el bloqueador de K_v1.3 HsTX[R14A] presentaron una reducción en los niveles de ARNm de *IL-1 β* y *Ptgs2*, pero no en los de *IL-6* (Figura 36). En cuanto a los macrófagos peritoneales procedentes de ratones control, el tratamiento con HsTX[R14A] no modificó la expresión de ninguno de estos genes (resultados no mostrados).

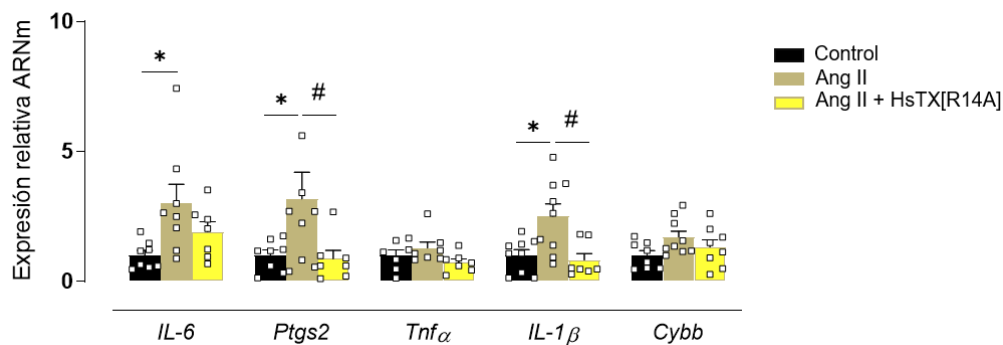


Figura 36. El bloqueo de los canales K_v1.3 reduce el incremento en la expresión de marcadores del fenotipo proinflamatorio M1 inducido por Ang II en macrófagos peritoneales. Niveles de ARNm de los marcadores M1 proinflamatorios *IL-6*, COX-2 (*Ptgs2*), *Tnf α* , *IL-1 β* y Nox2 (*Cybb*) en macrófagos peritoneales de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 μ g/Kg/inyección, cada 2 días) (n = 7-9). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

En resumen, los datos obtenidos indican que la infusión de Ang II incrementa la infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo perivascular y modifica el fenotipo de los mismos hacia un fenotipo proinflamatorio, efecto que se previene con el tratamiento con el bloqueador de los canales K_v1.3 HsTX[R14A], lo que sugiere la implicación de estos canales en la vía de activación clásica de los macrófagos peritoneales en ratones infundidos con Ang II.

9. PAPEL DE LOS CANALES K_v1.3 SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL INDUCIDA POR MACRÓFAGOS

Como acabamos de ver, los macrófagos se infiltran en la grasa perivascular de las arterias de ratones infundidos con Ang II; además, es conocido que estas células inmunes participan en la disfunción endotelial inducida por este péptido (De Ciuceis et al., 2005; Mikolajczyk et al., 2016). Por ello, evaluamos si el efecto beneficioso sobre la función endotelial que habíamos observado tras el bloqueo sistémico de los canales K_v1.3 podría deberse a la modulación del fenotipo proinflamatorio de los macrófagos que inducen estos canales.

Para llevar a cabo este análisis, incubamos aortas de ratones C57BL/6J control con el medio condicionado de macrófagos de los ratones de nuestro modelo experimental. La incubación con medio condicionado procedente de macrófagos de ratones control no modificó la relajación inducida por ACh o DEA-NO con respecto a la incubación con DMEM (resultados no mostrados); sin embargo, el medio condicionado de los macrófagos procedentes de ratones infundidos con Ang II redujo significativamente la relajación dependiente de endotelio (**Figura 37A**), reducción que no se observó cuando el medio condicionado procedía de los macrófagos de animales infundidos con Ang II y tratados con HsTX[R14A] (**Figura 37A**). En la relajación independiente de endotelio a DEA-NO de segmentos aórticos de animales control no se observaron diferencias tras la incubación con el medio condicionado de los macrófagos de ratones control o infundidos con Ang II, independientemente del tratamiento o no con el bloqueador de los canales $K_v1.3$ (**Figura 37B**).

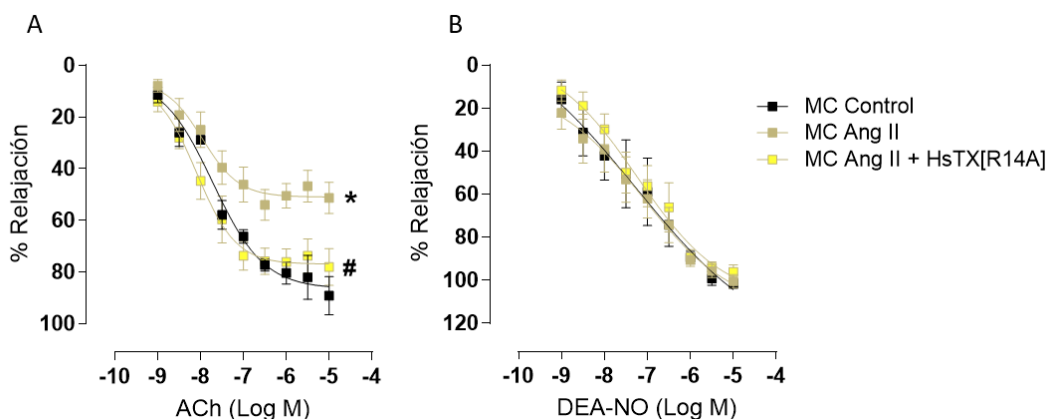


Figura 37. El bloqueo de los canales $K_v1.3$ previene la disfunción endotelial inducida por macrófagos en hipertensión. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh, A) y NONOato de dietilamina (DEA-NO, B) en aortas de ratones C57BL/6J control incubadas durante 20 horas con el medio condicionado (MC) de macrófagos procedentes de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) tratados o no con HsTX[R14A] (100 μ g/Kg/inyección, cada 2 días) (n = 5-8). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a Phe. * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

Por otra parte, diversos estudios, algunos de ellos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en este modelo animal, han demostrado el papel de COX-2 e IL-1 β en la disfunción endotelial en hipertensión (Jiménez-Altayó et al., 2006; Martínez-Revelles et al., 2013; Vallejo et al., 2014). Por ello, en otro grupo de experimentos se llevó a cabo la coincubación con el medio condicionado de los macrófagos y con el antagonista del receptor de IL-1 β anakinra o con el inhibidor selectivo de COX-2 celecoxib. La incubación tanto con celecoxib (1 μ M) como con anakinra (100 μ g/mL) abolió la disfunción endotelial inducida por el medio condicionado de los macrófagos procedentes de ratones infundidos con Ang II (**Figura 38**); sin embargo, ninguno de los dos fármacos afectó a la relajación inducida por ACh en las arterias incubadas con el medio condicionado de los macrófagos procedentes de ratones control (resultados no mostrados).

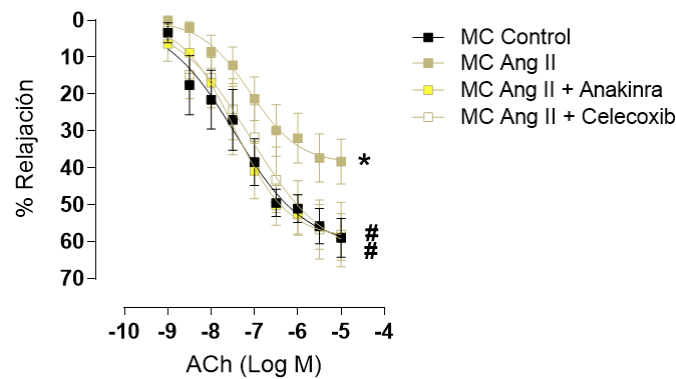


Figura 38. Derivados de COX-2 e IL-1 β contribuyen a la disfunción endotelial inducida por macrófagos. Curva concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en aortas de ratones C57BL/6J control incubadas durante 20 horas con el medio condicionado (MC) de macrófagos procedente de ratones C57BL/6J control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) en presencia o ausencia de anakinra (100 μ g/mL) o celecoxib (1 μ M) (n = 6-8). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a Phe. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

Finalmente, medimos los niveles de ARNm de *Kcna3* y *Kcna5* en aortas de los ratones control incubadas con el medio condicionado de los macrófagos procedentes de animales control e infundidos con Ang II. La expresión génica de ambos canales fue similar al incubar con los dos tipos de medio condicionado (**Figura 39**). Estos resultados confirman la implicación de los canales K $_v$ 1.3 de los macrófagos, y no de los canales presentes en las células vasculares, en la función vascular.

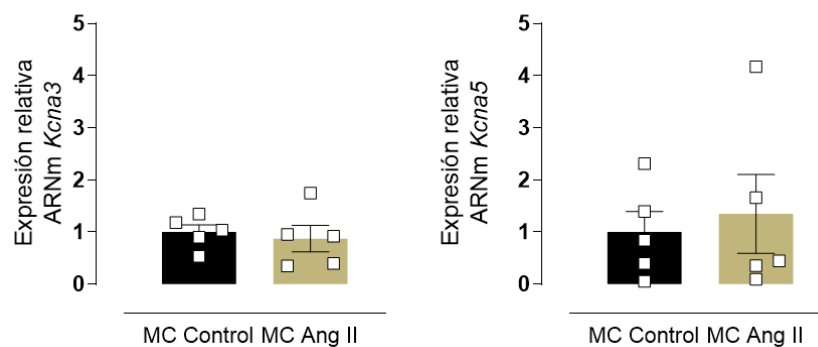


Figura 39. La expresión vascular de los canales K $_v$ 1.3 es similar tras la incubación con medio condicionado de los macrófagos procedentes de animales infundidos con Ang II y de animales control. Expresión relativa de los niveles de ARNm de *Kcna3* y *Kcna5* en aorta de ratones C57BL/6J control incubados durante 20 horas con el medio condicionado (MC) de macrófagos peritoneales procedentes de ratones control e infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 5). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 por t de Student no pareada.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran el papel de los canales K $_v$ 1.3 como mediadores de la disfunción endotelial dependiente de macrófagos en hipertensión.

CAPÍTULO 2. PAPEL DE Nrf2 EN LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES EN HIPERTENSIÓN

Nrf2 es un factor de transcripción sensible a electrófilos y oxidantes, con un importante papel en la defensa frente al estrés oxidativo y la inflamación, situaciones que contribuyen, en gran medida, al desarrollo de la patología hipertensiva y a las complicaciones derivadas de ella, tanto a nivel vascular como cardíaco. En este capítulo evaluamos el papel de Nrf2 en las alteraciones cardiovasculares asociadas a la hipertensión. Para ello, utilizamos un modelo animal de ratones knockout para Nrf2 (Nrf2^{-/-}) con hipertensión inducida por Ang II y su correspondiente control WT.

1. EFECTO DE LA DELECCIÓN DE Nrf2 EN LA PRESIÓN ARTERIAL

En primer lugar, evaluamos el papel de Nrf2 sobre la presión arterial. La delección de Nrf2 mostró una tendencia a reducir la presión arterial en animales control con respecto a los animales WT, aunque sin llegar a mostrar cambios estadísticamente significativos (Figura 40). Por otra parte, la infusión de Ang II incrementó la presión arterial de forma similar en los ratones WT y en los ratones Nrf2^{-/-} (Figura 40), sugiriendo que la delección de Nrf2 no afecta al desarrollo de hipertensión inducido por Ang II.

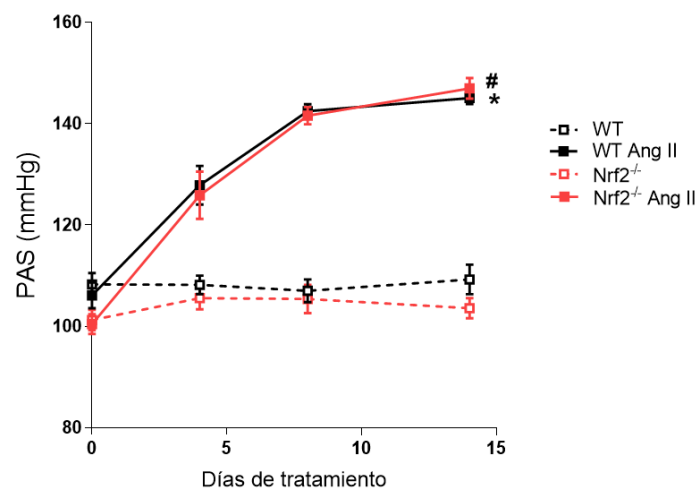


Figura 40. La delección de Nrf2 no afecta al desarrollo de hipertensión inducido por Ang II. Presión arterial sistólica (PAS) en ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 9-15). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0,05 vs WT, #p<0,05 vs Nrf2^{-/-} por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

EFECTO DE LA DELECCIÓN DE Nrf2 EN EL ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICO

Está ampliamente descrito que la hipertensión se asocia a un incremento en la producción de ROS (Touyz and Briones, 2011; Hernanz et al., 2014); dado el papel que tiene Nrf2 en la transcripción de genes que codifican para proteínas antioxidantes, analizamos los niveles plasmáticos de MDA en los ratones Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II. Los niveles de MDA fueron similares en ratones WT y en los deficientes en Nrf2. Observamos un incremento de estos niveles tras la infusión de Ang II en los ratones WT con respecto a sus controles; sin embargo, este

incremento no se observó en los ratones $Nrf2^{-/-}$ infundidos con Ang II (**Figura 41**), lo que indica que, contrariamente a lo esperado, la ausencia del gen que codifica para Nrf2 previene el estrés oxidativo plasmático inducido por Ang II.

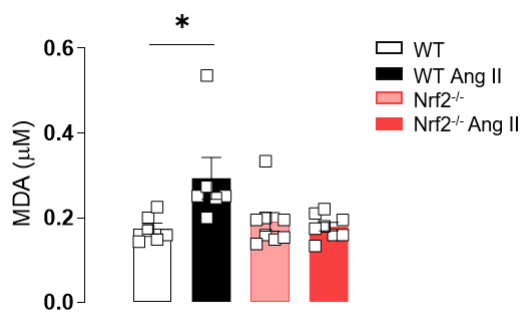


Figura 41. La delección de Nrf2 previene el estrés oxidativo plasmático inducido por Ang II. Niveles de malondialdehído (MDA) en el plasma de ratones WT y $Nrf2^{-/-}$ infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 6-8). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs WT por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

2. EFECTO DE LA DELECIÓN DE Nrf2 EN LAS ALTERACIONES CARDÍACAS EN HIPERTENSIÓN

A continuación, analizamos el papel de Nrf2 en las alteraciones que tienen lugar con la hipertensión en tejidos específicos del sistema cardiovascular, comenzando por el corazón.

EFECTO DE LA DELECIÓN DE Nrf2 EN LA HIPERTROFIA CARDÍACA

Una de las alteraciones observadas en hipertensión es el desarrollo de hipertrofia cardíaca, por lo que evaluamos el papel de Nrf2 en ella; dicha hipertrofia fue medida como la relación entre el peso del ventrículo izquierdo y la longitud de la tibia, así como por el tamaño de los cardiomiocitos, marcando el tejido cardíaco con WGA.

Con respecto a estos parámetros, la delección de Nrf2 no alteró la relación peso del ventrículo/longitud de la tibia (**Figura 42A**) ni el área de los cardiomiocitos (**Figura 42B**), con valores muy similares a los obtenidos para los controles WT. Por su parte, en los ratones WT, Ang II indujo hipertrofia del ventrículo izquierdo e incrementó el tamaño de los cardiomiocitos, mientras que estas alteraciones no se observaron en los ratones $Nrf2^{-/-}$ (**Figura 42**).

Estos resultados muestran un papel protector de la delección de Nrf2 en la prevención de la hipertrofia cardíaca inducida por Ang II.

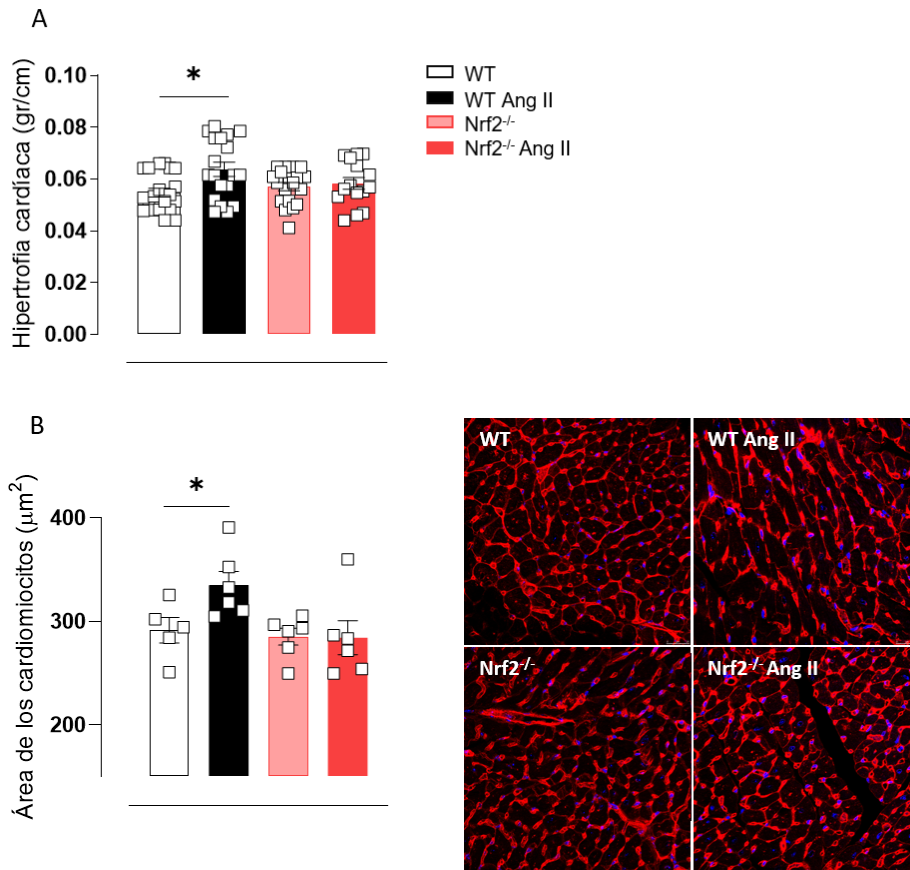


Figura 42. La delección de Nrf2 previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca inducido por Ang II. (A) Medida de hipertrofia del ventrículo izquierdo (n = 15-20) y (B) cuantificación e imágenes representativas de la tinción *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) para la medida del área de los cardiomiocitos (n = 5-6) (objetivo x63, zoom x1; tamaño de la imagen: 246,03 x 246,03 µm) de ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0,05 vs WT por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DE LA DELECCIÓN DE Nrf2 EN LA FIBROSIS CARDÍACA

Además del papel de Nrf2 en la hipertrofia cardíaca, evaluamos su contribución al desarrollo de fibrosis cardíaca analizando los niveles de ARNm de *Colágeno I* y *Bnp* (péptido natriurético tipo B) como marcadores de este parámetro. El Colágeno I forma parte de la matriz extracelular, habiéndose observado incrementos de su acumulación en situaciones de hipertrofia cardíaca asociada a hipertensión, lo que contribuye a alteraciones en el correcto funcionamiento del miocardio (Erne, 1996; Susic and Frohlich, 2000; Nwabuo and Vasan, 2020). Por su parte, Bnp es secretado por los cardiomiocitos en respuesta a estiramiento cardíaco e isquemia, constituyendo un importante marcador en pacientes con insuficiencia cardíaca, hipertensión e hipertrofia cardíaca (Okamoto et al., 2019).

En primer lugar, comprobamos que no existían diferencias en los niveles cardíacos de estos marcadores entre ambos genotipos (**Figura 43**). A continuación, analizamos el efecto de la infusión con Ang II y observamos en ratones WT un incremento en los niveles cardíacos del ARNm tanto de *Colágeno I* como de *Bnp*, lo que indica presencia de fibrosis cardíaca. Este efecto

no se observó en los ratones *Nrf2*^{-/-} (**Figura 43**), mostrando así que la delección de *Nrf2* protege frente a esta alteración, al igual que se observaba con la hipertrofia cardíaca.

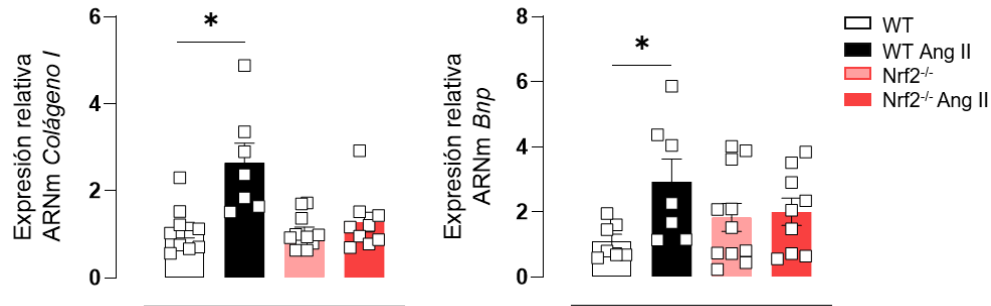


Figura 43. La delección de *Nrf2* protege frente a la fibrosis cardíaca inducida por Ang II. Expresión relativa de los niveles de ARNm de *Colágeno tipo I* y *Bnp* en ventrículo izquierdo de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 7-11). Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control (WT). *p<0,05 vs WT por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DE LA DELECCIÓN DE *Nrf2* EN EL ESTRÉS OXIDATIVO CARDÍACO

Además de los niveles plasmáticos de estrés oxidativo, evaluamos los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en ventrículo izquierdo de los animales de nuestro modelo, midiendo la intensidad de fluorescencia de la sonda DHE en los núcleos celulares.

La delección de *Nrf2* no modificó los niveles de fluorescencia del DHE con respecto a los controles WT (**Figura 44**). En el caso de los animales infundidos con Ang II, este péptido incrementó los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en los ratones WT con respecto a sus controles, pero no en los ratones *Nrf2*^{-/-} (**Figura 44**).

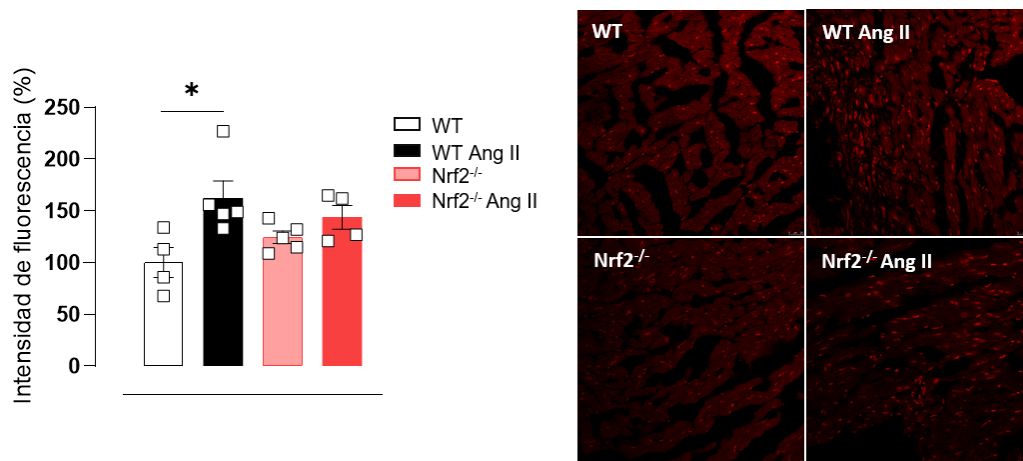


Figura 44. La delección de *Nrf2* previene el incremento en el estrés oxidativo cardíaco inducido por Ang II. Cuantificación y fotografías representativas (objetivo x40, zoom x1; tamaño de la imagen: 387,5 x 387,5 μ m) de la producción de anión superóxido en ventrículo izquierdo de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 4-5). Los resultados (media ± ES) se expresan en porcentaje de los niveles en animales control (WT). *p<0,05 vs WT por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

La NAD(P)H oxidasa es una de las principales fuentes de producción de ROS a nivel cardiovascular (Touyz and Briones, 2011), encontrándose presentes en corazón las subunidades Nox2 y 4 (Cadenas, 2018); por ello, evaluamos sus niveles de expresión génica en este tejido.

Del mismo modo que observamos en los niveles de $O_2^{\cdot-}$, la ausencia de Nrf2 no alteró la expresión de Nox2 (*Cybb*) y Nox4 en ratones control (**Figura 45**); la infusión de Ang II incrementó los niveles de ambos genes en animales WT, sin mostrar diferencias significativas en los animales deficientes en Nrf2 (**Figura 45**).

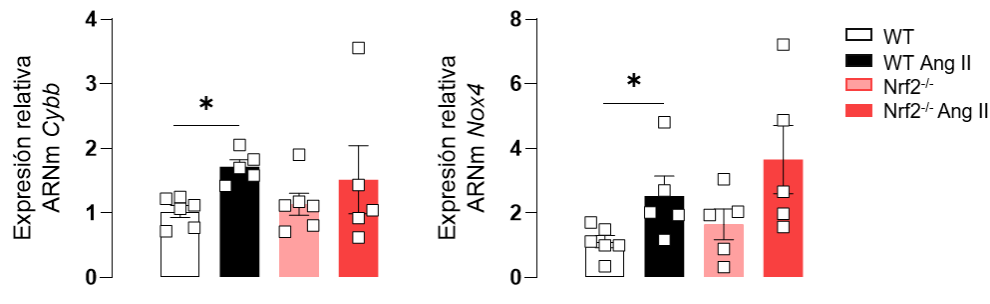


Figura 45. La delección de Nrf2 previene el incremento en la expresión cardíaca de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa Nox2 y Nox4 inducido por Ang II. Expresión relativa de los niveles de ARNm de Nox2 (*Cybb*) y Nox4 en ventrículo izquierdo de ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 5-6). Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control (WT). *p<0,05 vs WT por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Una de las proteínas diana de Nrf2 es HO-1, la cual, por su acción enzimática, da lugar a compuestos de gran importancia en situaciones de estrés oxidativo, por lo que estudiamos la expresión de esta enzima en nuestro modelo.

En ventrículo izquierdo, la delección de Nrf2 no alteró los niveles de *Hmox-1* con respecto a los animales WT (**Figura 46**). En cuanto a los animales infundidos con Ang II, observamos una tendencia a aumentar los niveles del ARNm de *Hmox-1* en animales WT, llegando a incrementarse de manera muy significativa en los animales Nrf2^{-/-} infundidos con Ang II (**Figura 46**).

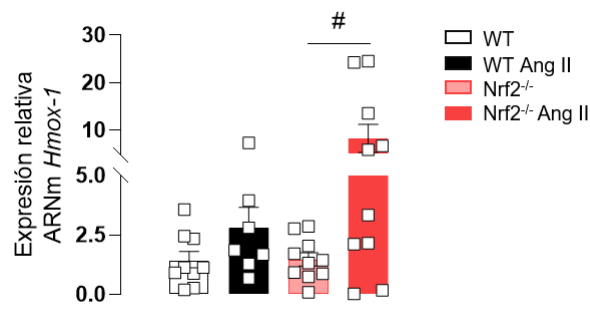


Figura 46. La delección de Nrf2 incrementa la expresión cardíaca de *Hmox1* en ratones infundidos con Ang II. Niveles de ARNm de *Hmox-1* en ventrículo izquierdo (n = 7-10) de ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días). Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control (WT). #p<0,05 vs Nrf2^{-/-} por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DE LA DELECCIÓN DE *Nrf2* EN LA INFLAMACIÓN CARDÍACA

Como se ha comentado previamente, la hipertensión está asociada a un estado inflamatorio en el que células inmunes invaden diferentes tejidos y, a través de la producción de citoquinas y quimiocinas, contribuye al daño tisular asociado a esta patología (Norlander et al., 2018). Debido a ello, a la relación de la inflamación con el estrés oxidativo y a los efectos antiinflamatorios descritos resultantes de la acción de *Nrf2* (Pall and Levine, 2015), evaluamos los niveles de ARNm de algunos marcadores inflamatorios, como las citoquinas proinflamatorias *IL-1 β* , *IL-6* y *Ccl-2*, el marcador de células T *Cd3*, y la enzima proinflamatoria COX-2 (*Ptgs2*), en ventrículo izquierdo de estos ratones.

La delección de *Nrf2* incrementó la expresión de *IL-6* y COX-2, sin observarse diferencias en la expresión del resto de marcadores con respecto a los ratones control WT (**Figura 47**). La infusión de Ang II incrementó la expresión génica de *IL-1 β* , *IL-6* y COX-2 en animales WT; el incremento en *IL-1 β* e *IL-6* inducido por Ang II también se observó tras la delección de *Nrf2*, encontrándose, además, en este grupo de animales, una mayor expresión de *Ccl-2* con respecto a sus controles (**Figura 47**).

A la vista de estos resultados, podríamos decir que el efecto cardioprotector de la delección de *Nrf2* observado en los ratones infundidos con Ang II no parece estar mediado por una reducción en los parámetros inflamatorios.

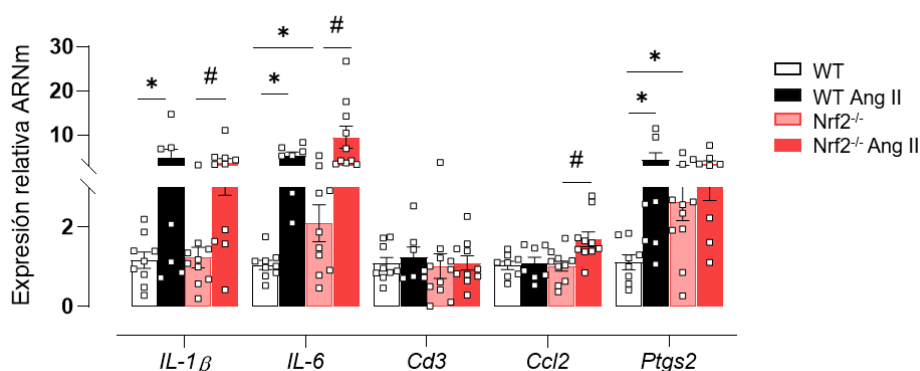


Figura 47. La delección de *Nrf2* incrementa parámetros inflamatorios a nivel cardíaco, sin modificar la inflamación inducida por Ang II. Niveles de ARNm de los marcadores inflamatorios *IL-1 β* , *IL-6*, *Cd3*, *Ccl2* y COX-2 (*Ptgs2*) en ventrículo izquierdo de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 7-11). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control (WT). * $p < 0,05$ vs WT, # $p < 0,05$ vs *Nrf2*^{-/-} por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

3. EFEECTO DE LA DELECCIÓN DE *Nrf2* EN LAS ALTERACIONES VASCULARES EN HIPERTENSIÓN

Además de los efectos sobre el corazón, estudiamos el papel de *Nrf2* en las alteraciones vasculares asociadas a la patología hipertensiva, tanto a nivel estructural y mecánico como funcional, en diferentes lechos vasculares.

EFEECTO DE LA DELECCIÓN DE *Nrf2* EN EL REMODELADO VASCULAR

En primer lugar, evaluamos el papel de *Nrf2* en la estructura de la aorta. El espesor de la pared vascular y la relación media/luz fue similar en ratones control WT y *Nrf2*^{-/-}. Por su parte, la infusión con Ang II mostró una tendencia a incrementar el espesor de la pared vascular, así como la relación media/luz en animales WT, aunque las diferencias no alcanzaron valores estadísticamente significativos (**Figura 48A, B**). En el caso de los ratones *Nrf2*^{-/-}, Ang II aumentó de forma significativa la relación media/luz, mostrando, además, una tendencia a incrementar el espesor de la pared vascular (**Figura 48A, B**).

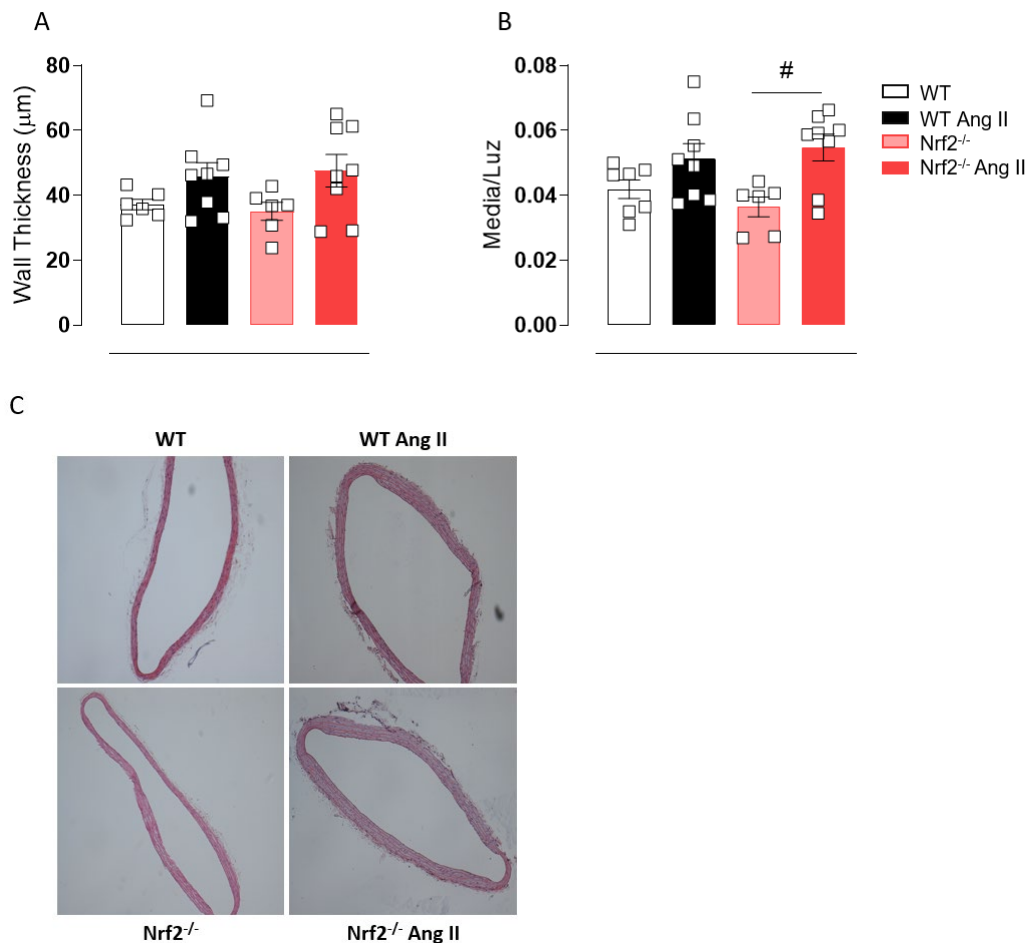


Figura 48. La delección de *Nrf2* incrementa la relación media/luz en aorta de ratones infundidos con Ang II. (A) Espesor de la pared (*wall thickness*), (B) relación media/luz y (C) imágenes representativas de tinción hematoxilina-eosina (tamaño de la imagen: 1402,88 x 1052,16 µm) de segmentos aórticos de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 6-8). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. #p<0,05 vs *Nrf2*^{-/-} por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

A continuación, evaluamos el papel de *Nrf2* en el remodelado de arterias mesentéricas de resistencia. En los ratones *Nrf2*^{-/-} se observó un incremento de los diámetros interno y externo con respecto a los ratones WT, dando lugar a vasos de mayor calibre (**Figura 49A**); sin embargo, estos cambios no afectaron al espesor de la pared, ni a la relación media/luz (**Figura 49B**).

La infusión con Ang II indujo un incremento en el espesor de la pared vascular, así como en la relación media/luz en ratones WT (**Figura 49B**); sin embargo, en ratones *Nrf2*^{-/-}, Ang II redujo los

diámetros interno y externo (**Figura 49A**), a pesar de lo cual no se modificaron ni el espesor de la pared vascular ni la relación media/luz (**Figura 49B**).

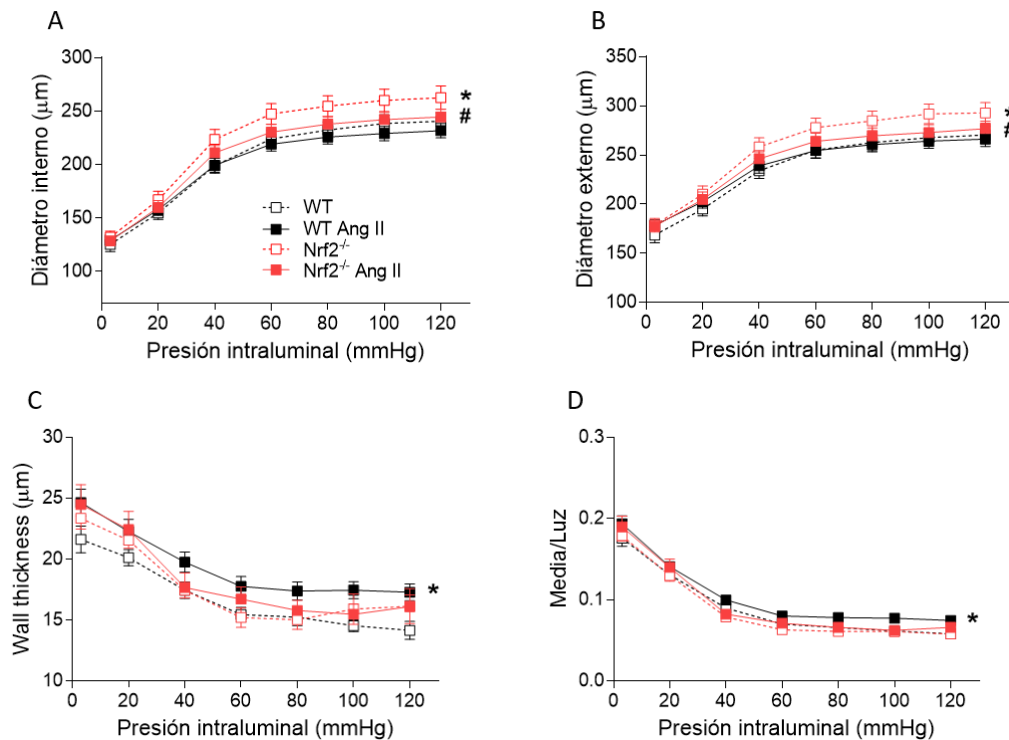


Figura 49. La delección de *Nrf2* previene el remodelado vascular inducido por Ang II en arterias mesentéricas de resistencia. Diámetro interno (A), externo (B), espesor de la pared (*wall thickness*, C) y relación media/luz (D) de arterias mesentéricas de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 8-13). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0,05 vs WT, #p<0,05 vs *Nrf2*^{-/-} por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

Para profundizar en el estudio de las alteraciones en la estructura de la pared vascular analizamos el espesor de las capas que la componen y el número de células que hay en ellas. Las arterias mesentéricas de resistencia de ratones control, tanto WT como *Nrf2*^{-/-}, mostraron similar grosor de las capas media y adventicia (**Figura 50A**), al igual que ocurría con el grosor de la pared vascular; sin embargo, en los ratones *Nrf2*^{-/-} este lecho vascular mostró un incremento en el número de células musculares lisas con respecto al de ratones WT, sin que se viera afectado el número de células adventiciales y endoteliales (**Figura 50B**).

La infusión de Ang II no afectó al espesor de la capa adventicia, pero incrementó el espesor de la capa media en los ratones WT, no observándose este efecto tras la delección de *Nrf2*^{-/-} (**Figura 50A**); en cuanto al número de células, este péptido redujo el número de células endoteliales de las arterias mesentéricas de resistencia, tanto en ratones WT como en ratones *Nrf2*^{-/-}, sin afectar al número de células musculares lisas y adventiciales (**Figura 50B**).

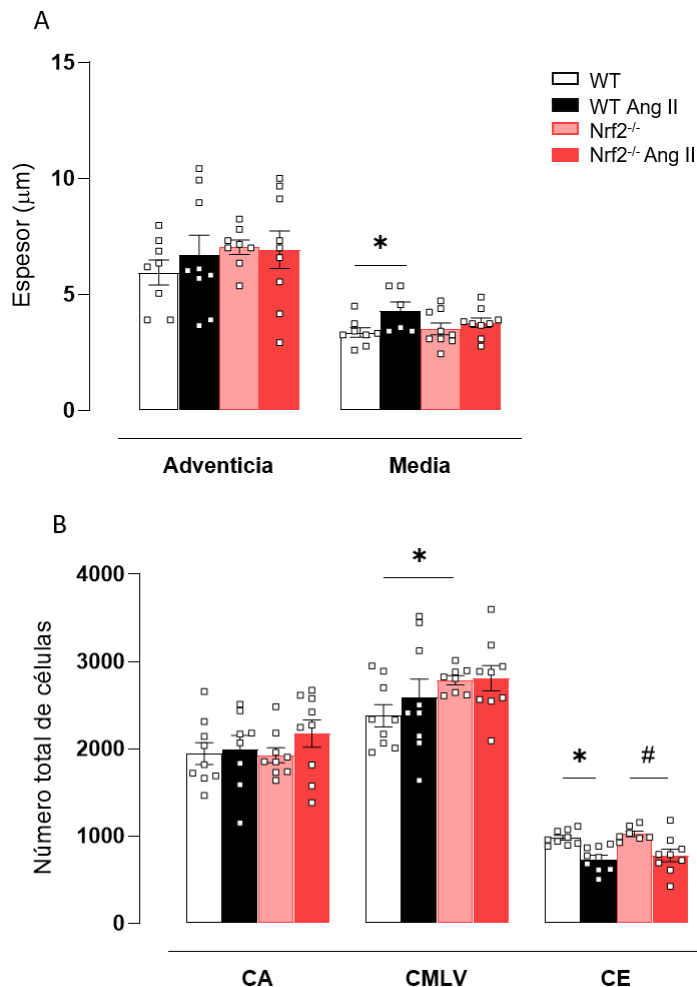


Figura 50. La delección de Nrf2 previene el incremento en el espesor de la capa media vascular, sin afectar a la reducción del número de células endoteliales inducida por Ang II. (A) Espesor de las capas adventicia y media y (B) número total de células adventiciales (CA), musculares lisas (CMLV) y endoteliales (CE) de arterias mesentéricas de ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 9). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. *p<0,05 vs WT, #p<0,05 vs Nrf2^{-/-} por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DE LA DELECCIÓN DE Nrf2 EN LA RIGIDEZ VASCULAR

Para evaluar el papel de Nrf2 en la rigidez vascular, analizamos los valores de la relación entre el estrés circunferencial y la tensión de arterias mesentéricas de resistencia. En primer lugar, comprobamos que esta relación era similar en ratones WT y Nrf2^{-/-}. Tras la infusión de Ang II, los vasos de ratones WT presentaron una menor elasticidad, como muestra el desplazamiento hacia la izquierda de la curva estrés/tensión y el mayor valor de β observado; sin embargo, Ang II no produjo esta alteración en arterias de ratones Nrf2^{-/-} (**Figura 51A, B**).

También analizamos la distensibilidad incremental. En arterias de ratones deficientes en Nrf2 se observó un ligero aumento de este parámetro frente a las de WT, aunque sin alcanzarse diferencias estadísticamente significativas. Tras la infusión de Ang II, se redujo la distensibilidad incremental en arterias de ratones WT; sin embargo, en las de ratones deficientes en Nrf2, la infusión de Ang II no modificó este parámetro. (**Figura 51C**).

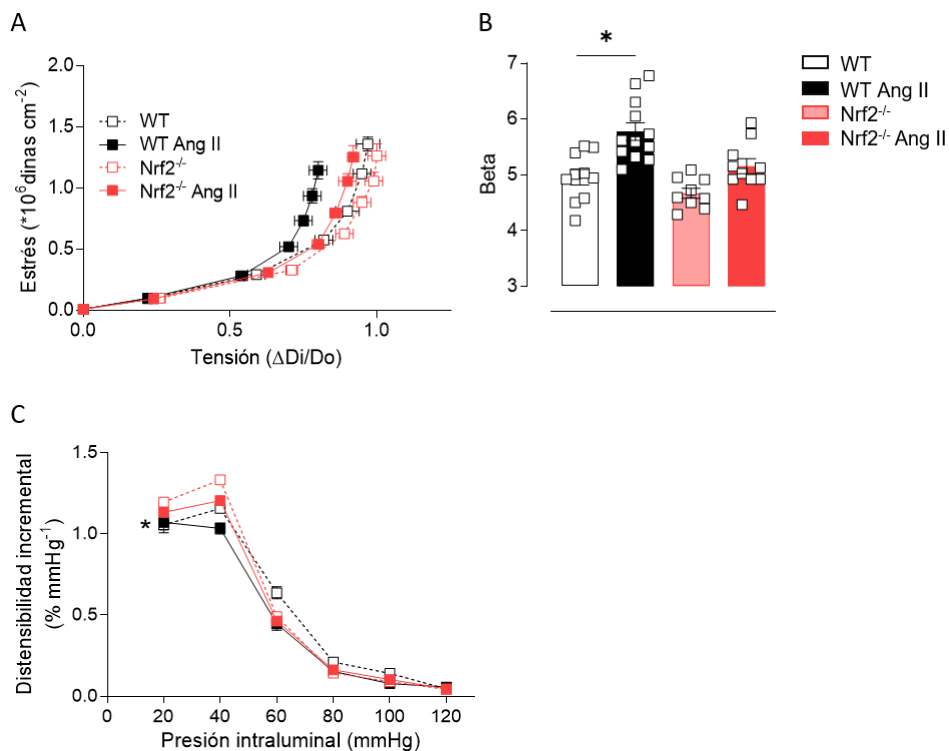


Figura 51. La delección de Nrf2 previene la rigidez vascular inducida por Ang II en arterias mesentéricas de resistencia. (A) Relación estrés-tensión, (B) cálculo del módulo elástico tangencial o incremental (β) y (C) distensibilidad incremental de arterias mesentéricas de ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 10-12). Do, diámetro interno a 3 mmHg; Di, diámetro interno observado para una presión intravascular dada. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. *p<0,05 vs WT por ANOVA de dos vías (C) o de una vía (B) seguido de test de Bonferroni.

También evaluamos las fenestras de la lámina elástica interna vascular, la cual determina la elasticidad y las propiedades mecánicas de los vasos, distribuyendo la tensión de manera uniforme en la pared (Wagenseil and Mecham, 2009). El área y el número de las fenestras fue similar en arterias mesentéricas de ratones WT y deficientes en Nrf2. La infusión de Ang II no afectó al área de las fenestras, pero si provocó una reducción de su número, tanto en los ratones WT como en los Nrf2^{-/-} (**Figura 52A, B**).

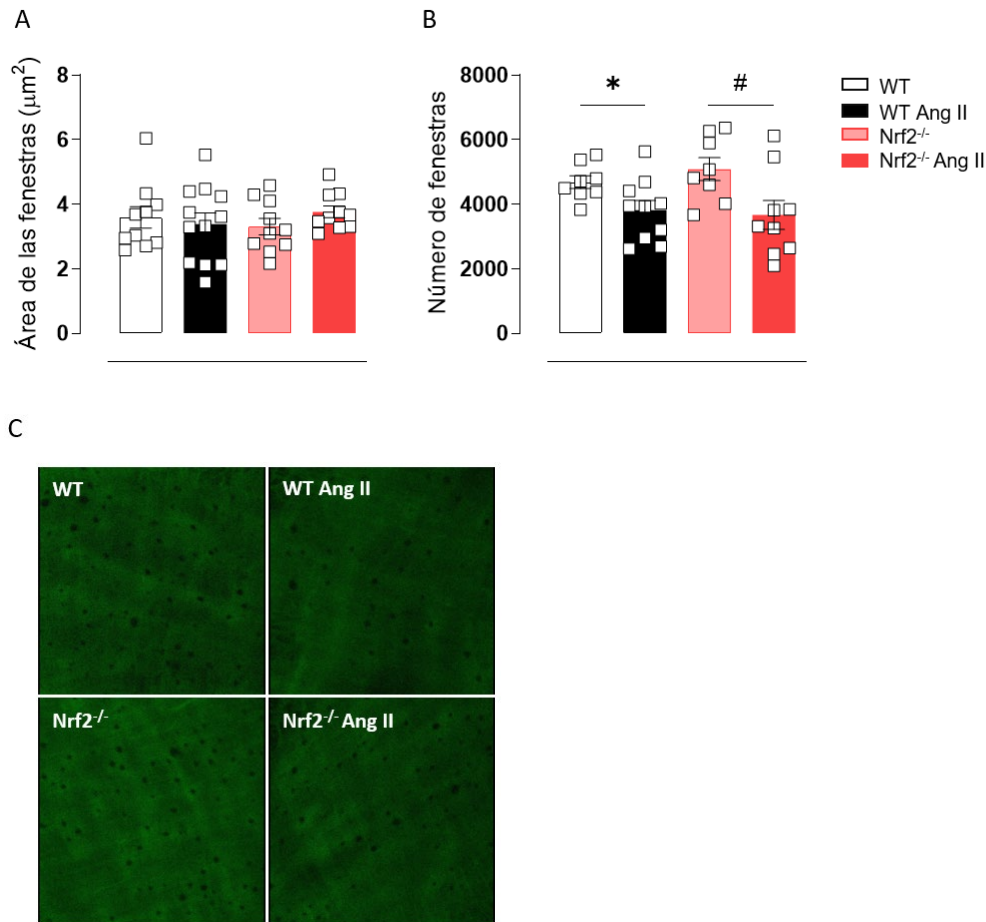


Figura 52. La delección de Nrf2 no afecta a la reducción en el número de fenestras de la lámina elástica interna inducida por Ang II en arterias mesentéricas de resistencia. Cuantificación del área (A) y el número (B) de fenestras de la lámina elástica interna, y (C) imágenes representativas de la lámina elástica interna (objetivo x40, zoom x4; tamaño de la imagen: 93,75 x 93,75 μm) de arterias mesentéricas de resistencia de ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 8-12). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. *p<0,05 vs WT, #p<0,05 vs Nrf2^{-/-} por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DE LA DELECIÓN DE Nrf2 EN LA FUNCIÓN VASCULAR

Como hemos visto anteriormente, además de cambios en la estructura y mecánica vascular, la hipertensión arterial está asociada a alteraciones en la función vascular, de manera que evaluamos el papel de Nrf2 en este parámetro en segmentos aórticos y de arterias mesentéricas de los animales del modelo de estudio.

En primer lugar, comprobamos que la contracción inducida por fenilefrina en aorta de ratones Nrf2^{-/-} fue similar a la observada en ratones WT. La infusión de Ang II incrementó esta respuesta contráctil en aorta de ratones WT, efecto que no se observó en ratones Nrf2^{-/-} (**Figura 53A**).

La aorta de ratones control Nrf2^{-/-} presenta un deterioro en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina con respecto a los WT (**Figura 53B**). La infusión con Ang II redujo esta respuesta en aorta de ratones WT (**Figura 53C**), mientras que en aorta de ratones Nrf2^{-/-} Ang II no solo no redujo, sino que incluso incrementó la relajación

inducida por ACh (**Figura 53D**). Estos resultados sugieren la participación de Nrf2 en las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio, y que la delección de este factor tiene un efecto protector frente a la disfunción endotelial inducida por Ang II.

En cuanto a las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio inducidas por DEA-NO, estas fueron similares en aorta de ratones WT y deficientes en Nrf2; la infusión de Ang II no modificó esta relajación en ninguno de los dos genotipos (**Figura 53E**). Del mismo modo, no se observaron alteraciones en las respuestas vasoconstrictoras inducidas por una solución de alto potasio en ninguno de los grupos experimentales (resultados no mostrados).

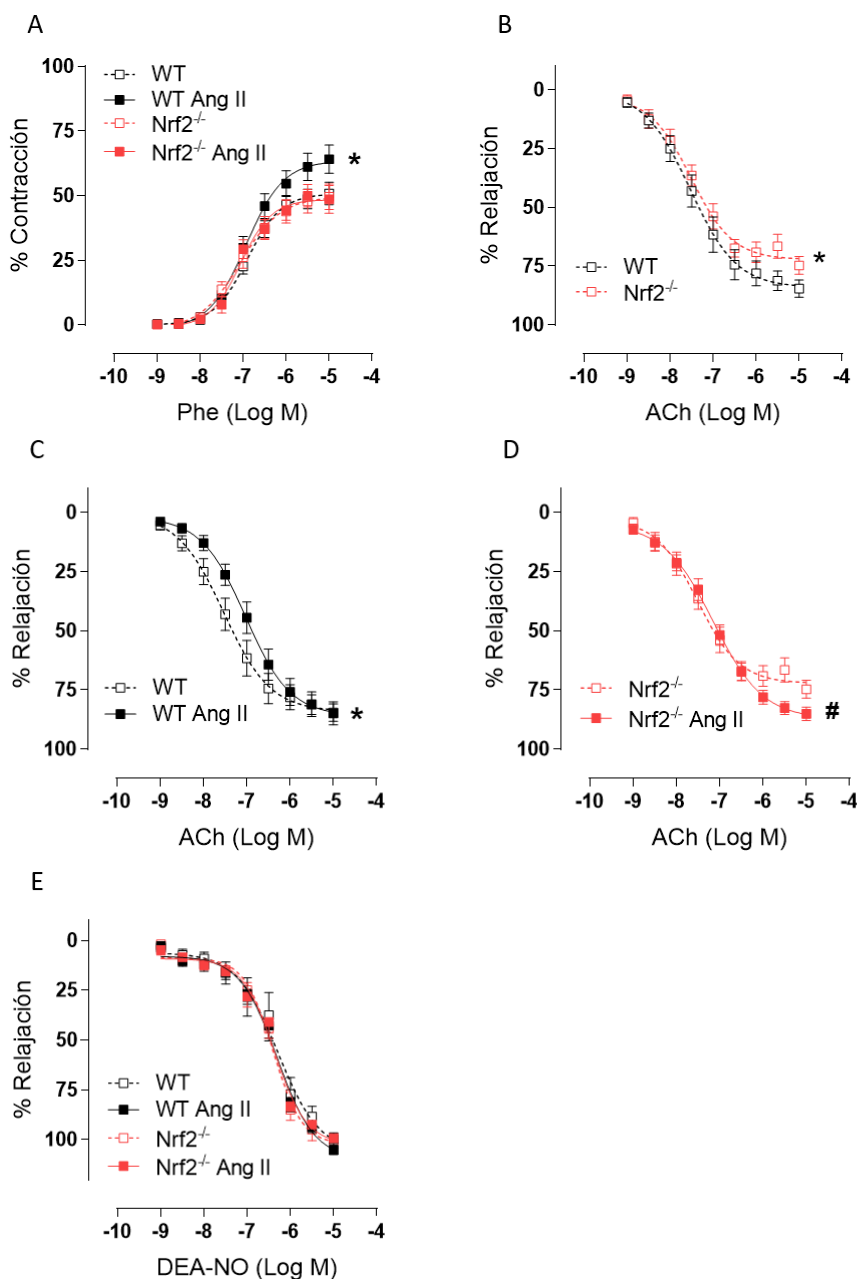


Figura 53. La delección de Nrf2 produce deterioro de la vasodilatación dependiente de endotelio, pero protege de la disfunción endotelial inducida por Ang II en aorta. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe, A), acetilcolina (ACh, B, C y D) y NONOato de dietilamina (DEA-NO, E) en aortas de ratones WT y Nrf2^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n= 4-14). Los resultados (media ± ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS (A) o Phe (B-E). *p<0,05 vs WT, #p<0,05 vs Nrf2^{-/-} por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

En arterias mesentéricas de resistencia, la contracción inducida por fenilefrina fue similar en los ratones WT y *Nrf2*^{-/-}; el tratamiento con Ang II no modificó la contracción en ninguno de los dos genotipos (**Figura 54A**). La relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina fue similar en arterias procedentes de ratones WT y deficientes en *Nrf2*; la infusión de Ang II condujo a una reducción en la vasodilatación dependiente de endotelio, que fue similar en arterias de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} (**Figura 54B**).

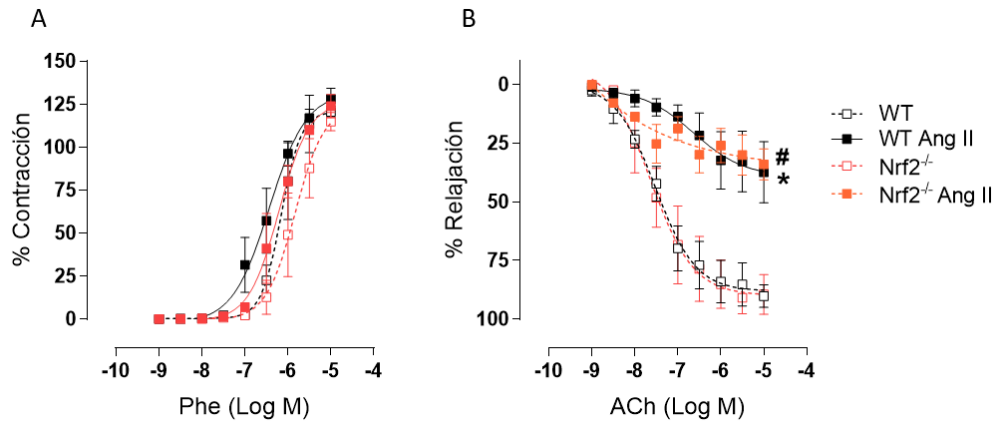


Figura 54. La delección de *Nrf2* no afecta al desarrollo de disfunción endotelial inducido por Ang II en arterias mesentéricas de resistencia. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe, A) y acetilcolina (ACh, B) en arterias mesentéricas de resistencia de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n= 3-4). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS (A) o Phe (B). *p<0,05 vs WT, #p<0,05 vs *Nrf2*^{-/-} por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DE LA DELECCIÓN DE *Nrf2* EN EL ESTRÉS OXIDATIVO VASCULAR

Al igual que realizamos en ventrículo izquierdo, evaluamos los niveles de O₂⁻ en aorta usando la sonda fluorescente DHE. En este tejido, los animales control *Nrf2*^{-/-} mostraron mayores niveles de fluorescencia y, por tanto, de O₂⁻ que los WT. La infusión de Ang II produjo un incremento del O₂⁻ vascular en animales WT; sin embargo, en ratones deficientes en *Nrf2*, se observó una reducción de la intensidad de fluorescencia tras la infusión con Ang II (**Figura 55**).

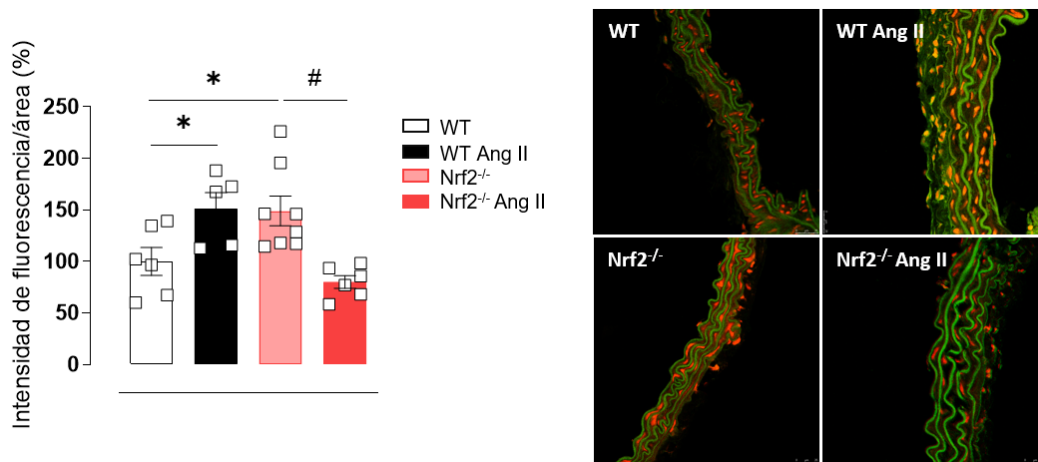


Figura 55. La delección de *Nrf2* incrementa el estrés oxidativo vascular en animales control, mientras que previene el incremento de este parámetro inducido por Ang II. Cuantificación en la capa media vascular y fotografías representativas (objetivo x63, zoom 1; tamaño de la imagen: 246 x 246 μm) de la producción de aniones superóxido de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 5-8). Los resultados (media \pm ES) se expresan en porcentaje de los niveles en animales control (WT). * $p < 0,05$ vs WT, # $p < 0,05$ vs *Nrf2*^{-/-} por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Del mismo modo que en el corazón, medimos *Hmox-1* en aorta. En primer lugar, comprobamos que la delección de *Nrf2* reducía la expresión génica de *Hmox-1* en animales control. En animales WT, la infusión de Ang II mostró una tendencia a incrementar los niveles de ARNm de *Hmox-1* en aorta, sin llegar a ser este incremento significativo estadísticamente. En ratones *Nrf2*^{-/-}, la infusión de Ang II incrementó significativamente los niveles de *Hmox-1* vasculares (**Figura 56**).

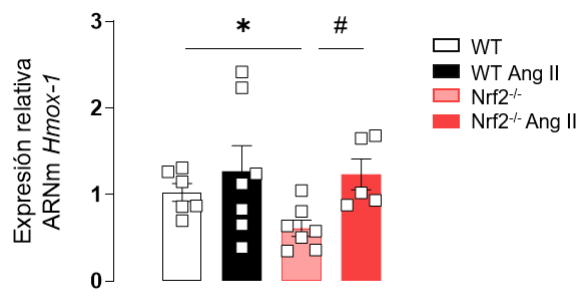


Figura 56. La delección de *Nrf2* reduce la expresión de *Hmox-1* en aorta, la cual se incrementa tras la infusión de Ang II. Niveles de ARNm de *Hmox-1* en aorta (n = 5-7) de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control (WT). * $p < 0,05$ vs WT, # $p < 0,05$ vs *Nrf2*^{-/-} por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DE LA DELECIÓN DE *Nrf2* EN LA PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FUNCIÓN VASCULAR

A la vista de los resultados obtenidos en relación con el estrés oxidativo y dado el papel descrito de *Nrf2* en la protección frente a él (Chen et al., 2015; Pall and Levine, 2015), analizamos su implicación en las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras de animales WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II. Para ello, incubamos segmentos de aorta de estos animales con los

compuestos antioxidantes ML-171, inhibidor de Nox1, y Mito-TEMPO, antioxidante dirigido a mitocondrias.

La incubación con ML-171 (0,5 μ M) y Mito-TEMPO (0,5 μ M) no modificó la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina en animales control de ninguno de los genotipos (**Figura 57A**). En cuanto a la relajación dependiente de endotelio inducida por ACh, ni ML-171 ni Mito-TEMPO modificaron dicha respuesta en animales WT; sin embargo, ML-171 mejoró la reducida relajación observada en los animales *Nrf2*^{-/-}, y Mito-TEMPO mostró una tendencia a mejorarla, aunque no alcanzó niveles estadísticamente significativos (**Figura 57B**).

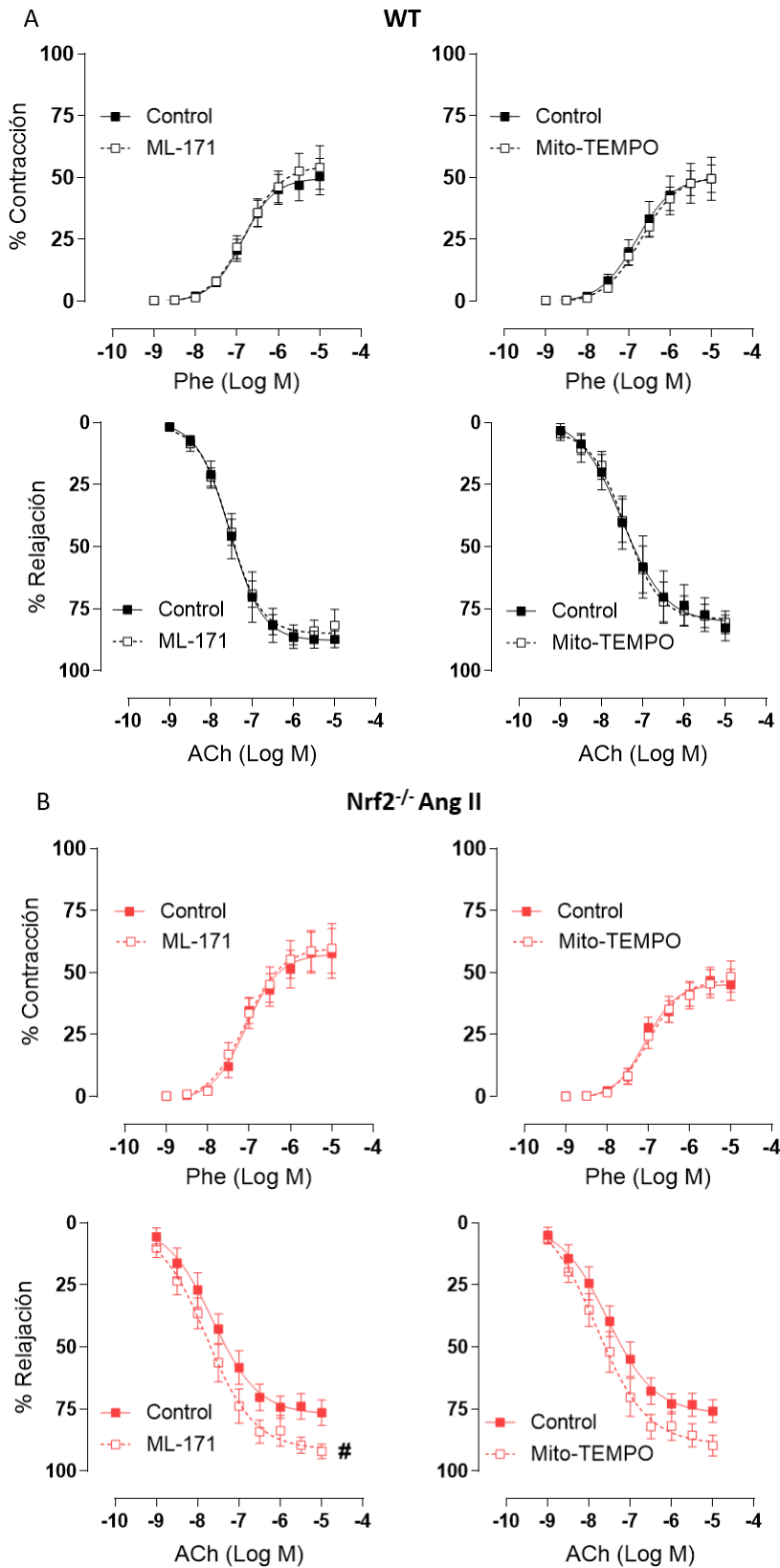


Figura 57. La delección de Nrf2 induce disfunción endotelial mediante el aumento del estrés oxidativo. Efecto de ML-171 (0,5 μ M) y Mito-TEMPO (0,5 μ M) sobre las curvas de concentración-respuesta a fenilefrina (Phe) y acetilcolina (ACh) en segmentos aórticos de ratones WT (A) y Nrf2^{-/-} (B) (n = 6-9). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS o fenilefrina. #p<0,05 vs Nrf2^{-/-} por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

En ratones infundidos con Ang II, tanto la incubación con ML-171 como con Mito-TEMPO redujo la incrementada respuesta vasoconstrictora y mejoró la reducida respuesta vasodilatadora en aorta de ratones WT, lo que confirma la participación del estrés oxidativo en estas alteraciones (**Figura 58A**). En aorta de ratones Nrf2^{-/-} tratados con Ang II, ni ML-171 ni Mito-TEMPO modificaron la función vascular (**Figura 58B**). Estos resultados sugieren que, si bien la delección de Nrf2 podría tener un papel deletéreo en las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio mediante el incremento del estrés oxidativo, induciría un efecto protector sobre la disfunción endotelial producida por Ang II por reducir el estrés oxidativo inducido por este tratamiento.

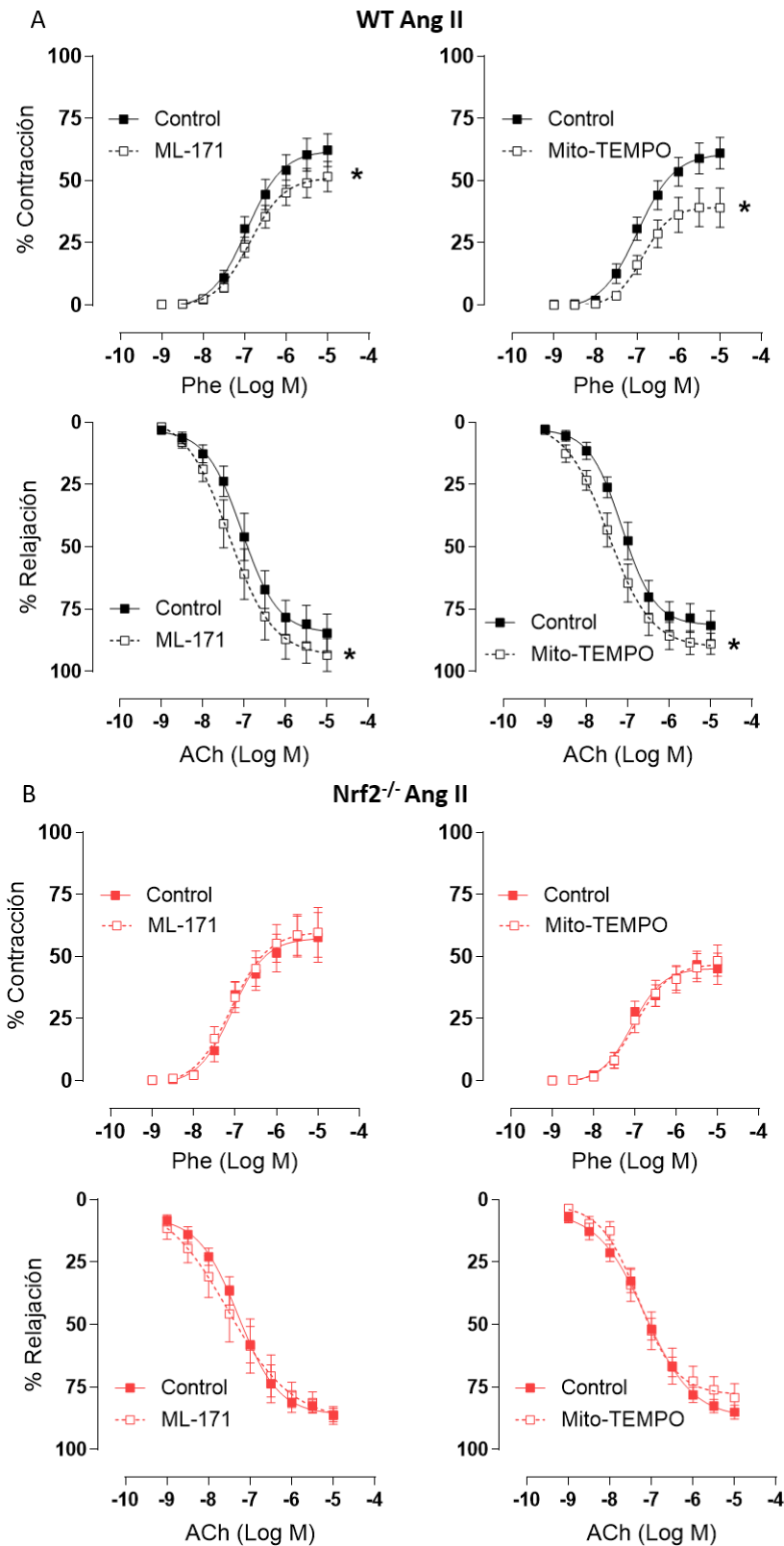


Figura 58. La delección de Nrf2 previene la disfunción endotelial inducida por Ang II mediante la reducción del estrés oxidativo. Efecto de ML-171 (0,5 μ M) y Mito-TEMPO (0,5 μ M) sobre las curvas de concentración-respuesta a fenilefrina (Phe) y acetilcolina (ACh) en segmentos aórticos de ratones WT (A) y Nrf2^{-/-} (B) infundidos con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 7-11). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS o fenilefrina. *p<0,05 vs WT por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DE LA DELECIÓN DE Nrf2 EN LA BIODISPONIBILIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO

Uno de los principales mecanismos por los que el estrés oxidativo contribuye a la disfunción endotelial es mediante la reducción de la biodisponibilidad de NO (Hernanz et al., 2014). Puesto que los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que la delección de Nrf2 afecta a los niveles de estrés oxidativo, analizamos si también modifica la biodisponibilidad de NO; para ello se incubaron segmentos aórticos de ratones WT y Nrf2^{-/-} con el inhibidor de NOS L-NAME y se analizó el efecto obtenido sobre la contracción vascular. La incubación con L-NAME (0,1 mM) desplazó hacia la izquierda la curva concentración-respuesta a fenilefrina (**Figura 59A**), siendo este desplazamiento menor en segmentos de animales Nrf2^{-/-} que en los de animales WT control, como se deduce del análisis de las diferencias del área bajo la curva concentración-respuesta en presencia y ausencia de L-NAME (**Figura 59C**). Este reducido efecto de L-NAME en los animales deficientes en Nrf2 indica una menor participación del NO en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina, sugiriendo, a su vez, una menor biodisponibilidad de NO.

En animales WT, el efecto de la incubación con L-NAME fue menor tras la infusión de Ang II con respecto a los animales control; sin embargo, en aorta de ratones deficientes en Nrf2 infundidos con Ang II, se observa una tendencia a aumentar los niveles de NO con respecto a sus controles, como lo demuestra el ligero incremento en el efecto inducido por L-NAME (**Figura 59B, C**).

Estos resultados sugieren que el mecanismo que se encuentra detrás del deterioro en las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio en ratones Nrf2^{-/-} sería una reducción en la biodisponibilidad de NO inducida por el incremento del estrés oxidativo; por su parte, el efecto protector observado en este genotipo tras la infusión de Ang II se debería a la reducción del estrés oxidativo, que incrementaría los niveles de NO.

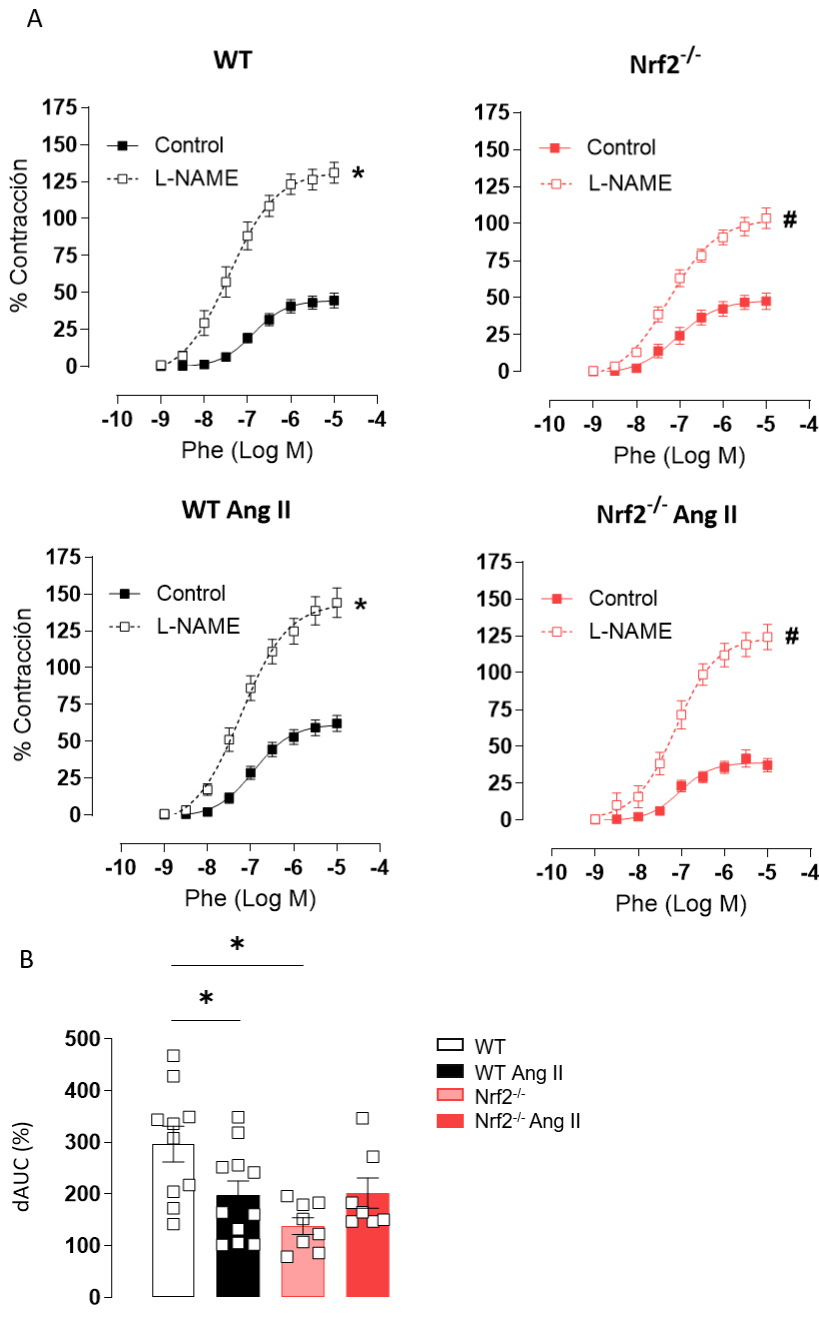


Figura 59. La delección de *Nrf2* reduce la participación de NO en las respuestas contráctiles inducidas por Phe en aorta. (A) Efecto de N(ω)-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 0,1 mM) sobre las curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe) en segmentos aórticos de ratones WT y *Nrf2*^{-/-} infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) (n = 7-11). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS. (B) Diferencias de área bajo la curva concentración-respuesta a fenilefrina (dAUC) (media \pm ES) en presencia y ausencia de L-NAME, en los distintos grupos experimentales, representadas como porcentaje del AUC de la situación control. (A, B) *p<0,05 vs WT, #p<0,05 vs *Nrf2*^{-/-} por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni; (C) *p<0,05 vs WT por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que los animales deficientes en *Nrf2* infundidos con Ang II podrían estar desarrollando mecanismos compensatorios que los protegen frente a gran parte de las alteraciones cardiovasculares que tienen lugar en la hipertensión.

CAPÍTULO 3. EFECTO DE ITH13001 SOBRE LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES EN HIPERTENSIÓN

El nuevo compuesto ITH13001 presenta actividad antioxidante, al ser un derivado de la melatonina, e inductora de Nrf2, mediante la liberación de Nrf2 de su represor Keap1, lo que le hace postularse como posible tratamiento para enfermedades en cuya patogénesis interviene el de estrés oxidativo (León et al., 2016). En el presente capítulo evaluamos el efecto de este compuesto en las distintas alteraciones cardiovasculares asociadas a la hipertensión, en el modelo de infusión con Ang II.

1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

En primer lugar, analizamos el efecto de ITH13001 sobre la presión arterial. La infusión de Ang II incrementó la presión arterial sistólica de los ratones de forma significativa con respecto al grupo control; este efecto se redujo con el tratamiento con ITH13001 (1 mg/Kg/día), lo que sugiere el efecto antihipertensivo de este compuesto. El tratamiento con este compuesto no modificó la presión arterial sistólica en animales control (*Figura 60*).

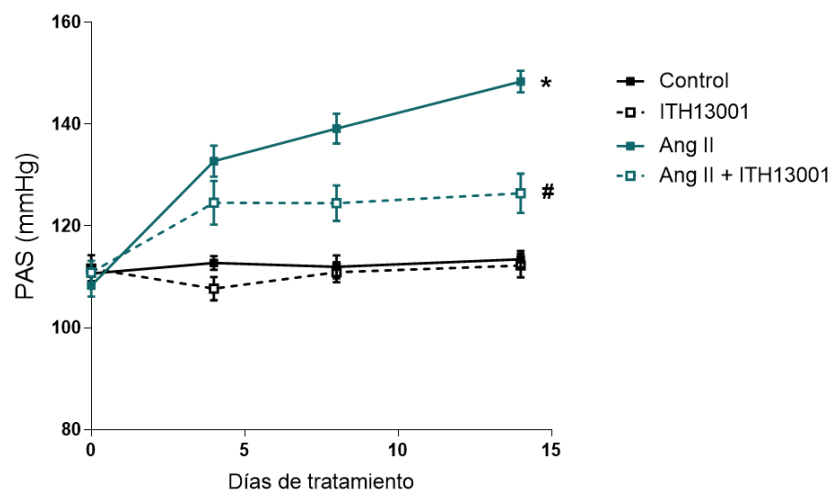


Figura 60. ITH13001 previene parcialmente el desarrollo de hipertensión inducido por Ang II. Presión arterial sistólica (PAS) en ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 19-25). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICO

Como se ha visto anteriormente, la hipertensión está asociada a una incrementada producción de ROS, por lo que estudiamos el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre el estrés oxidativo plasmático. Los niveles plasmáticos de MDA en ratones con hipertensión inducida por Ang II fue mayor que en los ratones control; esta diferencia se abolió con el tratamiento de los ratones hipertensos con ITH13001. Por su parte, el tratamiento con ITH13001 de los ratones control no mostró ningún efecto sobre este parámetro (*Figura 61*).

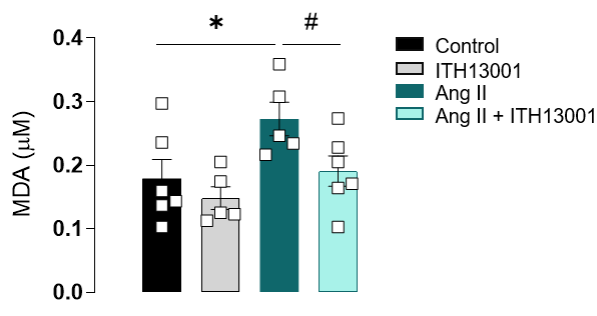


Figura 61. ITH13001 reduce el estrés oxidativo plasmático inducido por Ang II. Niveles de malondialdehído (MDA) en el plasma de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 5-6). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LAS ALTERACIONES CARDÍACAS EN HIPERTENSIÓN

En primer lugar, analizamos el efecto que el tratamiento con el compuesto ITH13001 tenía sobre las alteraciones cardíacas observadas en el modelo de infusión con Ang II.

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA HIPERTROFIA CARDÍACA

Como se ha comentado anteriormente, la hipertrofia cardíaca es una de las principales alteraciones que se producen en la patología hipertensiva (Santos and Shah, 2014). La infusión con Ang II indujo hipertrofia del ventrículo izquierdo, medida por la relación entre su peso y la longitud de la tibia, previniéndose su desarrollo con el tratamiento con ITH13001. Por su parte, el tratamiento de los animales control con este compuesto no modificó dicho parámetro (**Figura 62A**).

Además, evaluamos el tamaño de los cardiomiocitos de estos animales; la infusión de Ang II incrementó el área de estas células, efecto que se previno tras el tratamiento con ITH13001. Del mismo modo que en el caso de la relación peso del ventrículo/longitud de la tibia, el tratamiento de los animales control no modificó este parámetro (**Figura 62B**).

Estos resultados, por lo tanto, muestran la capacidad de ITH13001 de prevenir la hipertrofia cardíaca inducida por Ang II como consecuencia de la prevención del incremento del tamaño de los cardiomiocitos.

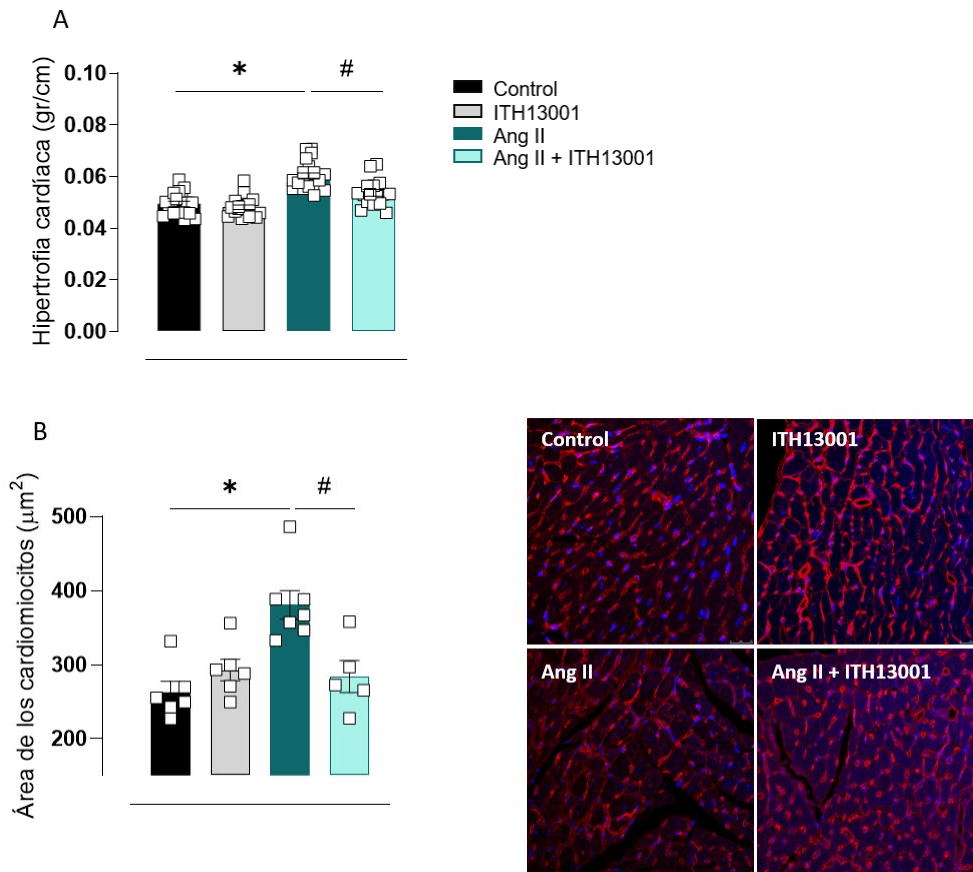


Figura 62. El tratamiento con ITH13001 previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca inducida por Ang II por reducción del área de los cardiomiocitos. (A) Medida de hipertrofia del ventrículo izquierdo (n = 19-23) y (B) cuantificación e imágenes representativas de la tinción *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) para la medida del área de los cardiomiocitos (n = 6-7) (objetivo x63, zoom x1; tamaño de la imagen: 246,03 x 246,03 µm) de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA FIBROSIS CARDÍACA

Para evaluar el efecto de ITH13001 sobre la fibrosis cardíaca, analizamos los niveles de ARNm de *Colágeno I* y *Bnp* como marcadores de este parámetro. La infusión con Ang II indujo un incremento en los niveles cardíacos de ARNm tanto de *Colágeno I* como de *Bnp*, indicativos de la presencia de fibrosis cardíaca; dicha fibrosis se previno con el tratamiento con ITH13001, sugiriendo que, además de prevenir la hipertrofia cardíaca, este compuesto posee propiedades antifibróticas. En los animales control, el tratamiento con ITH13001 no modificó los niveles de estos marcadores (**Figura 63**).

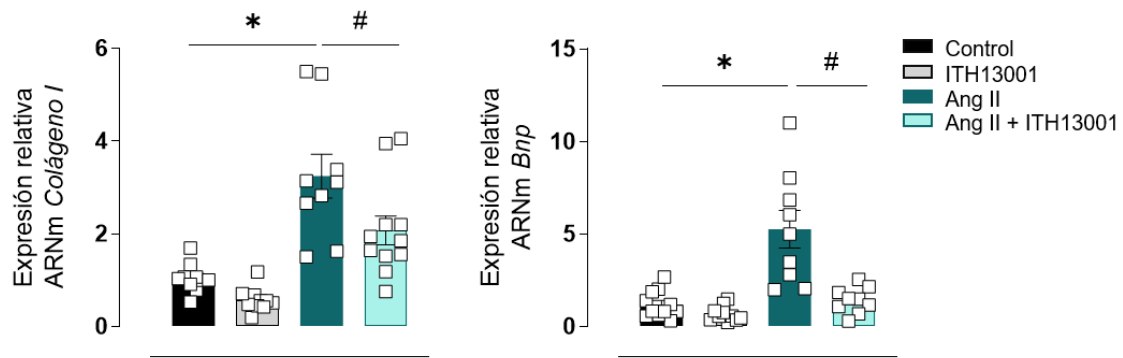


Figura 63. El tratamiento con ITH13001 previene la fibrosis cardíaca inducida por Ang II. Expresión relativa de los niveles de ARNm de *Colágeno tipo I* y *Bnp* en ventrículo izquierdo de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 9-10). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO CARDÍACO

En primer lugar, analizamos los niveles de ARNm de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa *Nox1* y *Nox2* (*Cybb*) en ventrículo izquierdo de estos animales, observándose un incremento muy significativo en los niveles de *Nox1* en ratones infundidos con Ang II, que se previno con el tratamiento con ITH13001 (**Figura 64A**). Los niveles cardíacos de ARNm de *Nox2* fueron similares en animales hipertensos y normotensos, independiente del tratamiento o no con ITH13001 (**Figura 64B**). El tratamiento con ITH13001 de los ratones control no afectó a la expresión de ninguno de estos genes (**Figura 64**).

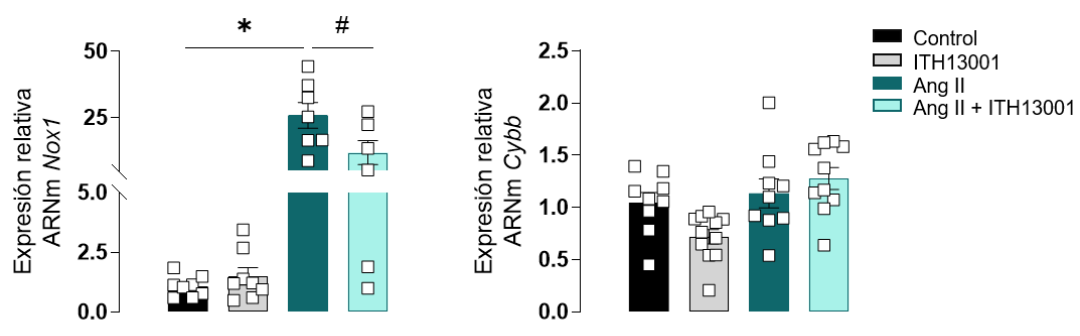


Figura 64. ITH13001 reduce el incremento de la expresión cardíaca de *Nox1* inducido por Ang II. Expresión relativa de los niveles de ARNm de *Nox1* y *Nox2* (*Cybb*) en ventrículo izquierdo de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 8-11). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Posteriormente, evaluamos la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa y los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en el ventrículo izquierdo de estos ratones. En cuanto a la actividad NAD(P)H oxidasa, observamos un incremento en los ratones infundidos con Ang II, que se previno tras el tratamiento con ITH13001. En los animales control, el tratamiento con ITH13001 no mostró efecto (**Figura 65A**).

El análisis de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ se llevó a cabo mediante la medida de la intensidad de fluorescencia de la sonda DHE en los núcleos de los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo de estos animales. Estas medidas mostraron unos mayores niveles de fluorescencia y, por lo tanto, de $O_2^{\cdot-}$ en ratones infundidos con Ang II, previniéndose este incremento con el tratamiento con ITH13001. En este caso, el tratamiento de los ratones control tampoco afectó a este parámetro (*Figura 65B*).

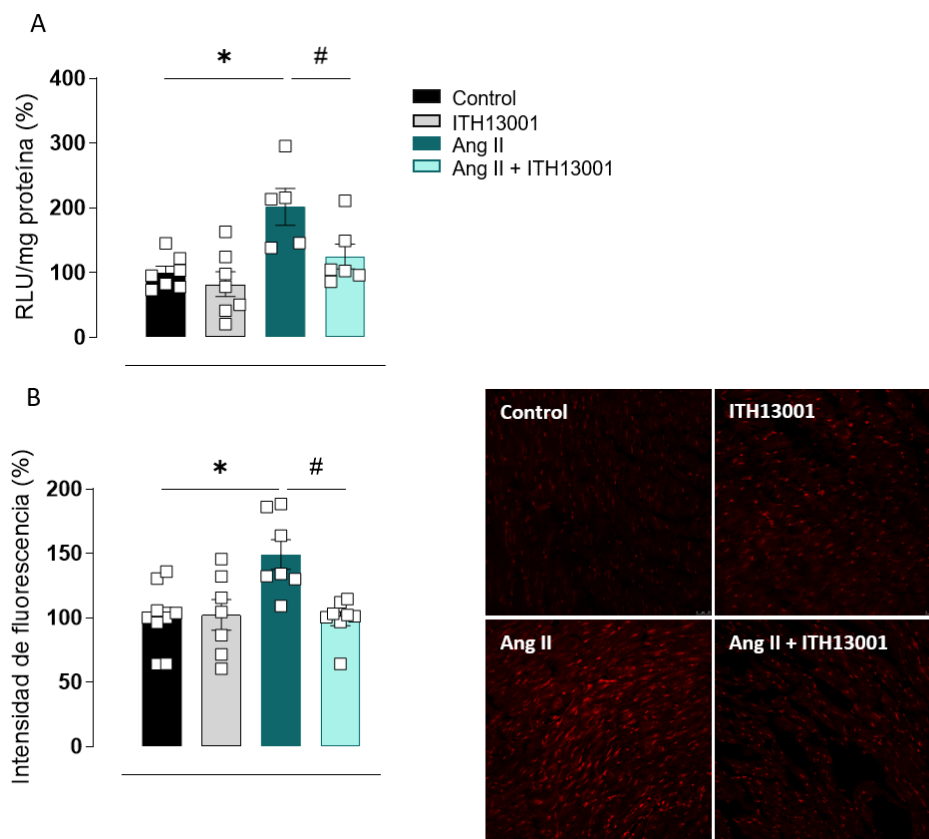


Figura 65. ITH13001 reduce el estrés oxidativo cardíaco de ratones infundidos con Ang II. (A) Actividad de NAD(P)H oxidasa y (B) cuantificación y fotografías representativas (objetivo x40, zoom x1; tamaño de la imagen: 387,5 x 387,5 μm) de la producción de aniones superóxido en ventrículo izquierdo de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 5-9). Los resultados se expresan como el valor medio (%) \pm ES respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Los resultados obtenidos en las medidas de expresión génica de Nox1, la actividad NAD(P)H oxidasa y los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en ventrículo izquierdo de ratones infundidos con Ang II, junto con los ya mencionados efectos sobre los niveles plasmáticos de MDA, sugieren efectos beneficiosos del tratamiento con ITH13001 reduciendo el estrés oxidativo inducido por Ang II.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA INFLAMACIÓN CARDÍACA

Ya se ha indicado que la patología hipertensiva también se asocia a un estado inflamatorio; por ello, también estudiamos el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre distintos marcadores inflamatorios a nivel cardíaco.

Ang II incrementó los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias *IL-1 β* , *IL-6* y *Ccl-2*, del marcador de células T *Cd3*, y de la enzima proinflamatoria COX-2 (*Ptgs2*) en ventrículo izquierdo (**Figura 66A**); además, la expresión proteica del inflammasoma NLRP3, de la enzima proinflamatoria iNOS, la proteína adaptadora de TLR4 MyD88, importante vía que regula la actividad de numerosos genes proinflamatorios, y de p65, subunidad del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B, fue también mayor en muestras cardíacas de ratones hipertensos (**Figura 66B, C**). El tratamiento con ITH13001 no afectó a los niveles de estos marcadores inflamatorios en los ratones control, pero previno su incremento en los ratones hipertensos (**Figura 66A-C**).

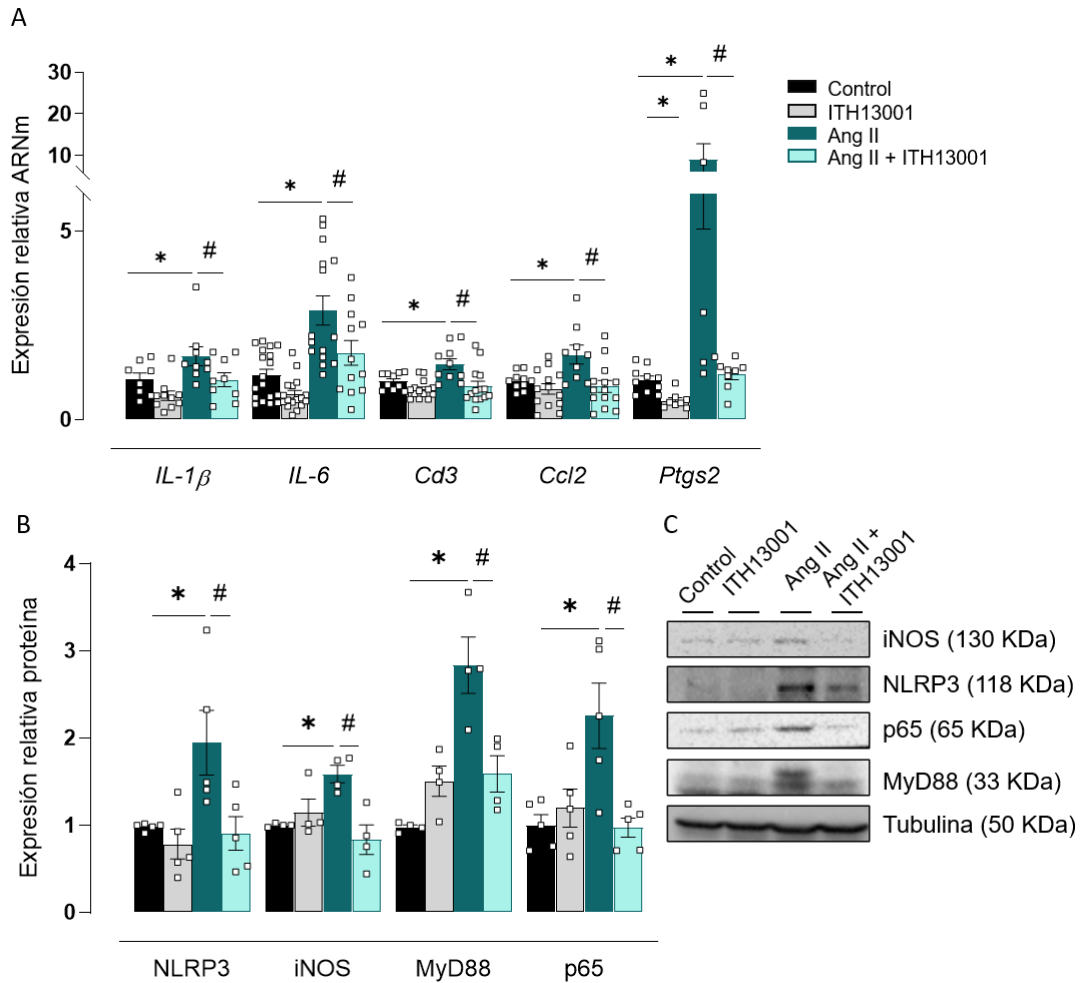


Figura 66. ITH13001 reduce la inflamación cardíaca inducida por Ang II. (A) Niveles de ARNm de los marcadores inflamatorios *IL-1 β* , *IL-6*, *Cd3*, *Ccl2* y COX-2 (*Ptgs2*) en ventrículo izquierdo de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 6-16). (B) Expresión de las proteínas inflamatorias NLRP3, iNOS, MyD88 y p65 en ventrículo izquierdo de los mismos grupos de ratones (n = 4-5). Se muestran blots representativos de estas proteínas. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Estos resultados sugieren un efecto antiinflamatorio a nivel cardíaco, que, junto con el efecto antioxidante de ITH13001, puede contribuir a la cardioprotección que induce dicho compuesto.

4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LAS ALTERACIONES VASCULARES EN HIPERTENSIÓN

Una vez analizado el efecto de ITH13001 sobre las alteraciones cardíacas, estudiamos su efecto sobre las alteraciones estructurales, mecánicas y funcionales vasculares asociadas al desarrollo de hipertensión.

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE EL REMODELADO VASCULAR

Como hemos visto previamente, además de causar remodelado a nivel cardíaco, la hipertensión también afecta a la estructura vascular, por lo que analizamos el efecto de ITH13001 en la estructura de vasos de conductancia como la aorta. La infusión con Ang II incrementó el espesor de la capa media vascular, así como la relación media/luz (*Figura 67A, B*). Estos parámetros fueron similares en los ratones hipertensos tratados con ITH13001, no observándose una mejora en el remodelado vascular (*Figura 67*). En ratones control, el tratamiento con ITH13001 tampoco modificó la estructura vascular (*Figura 67*).

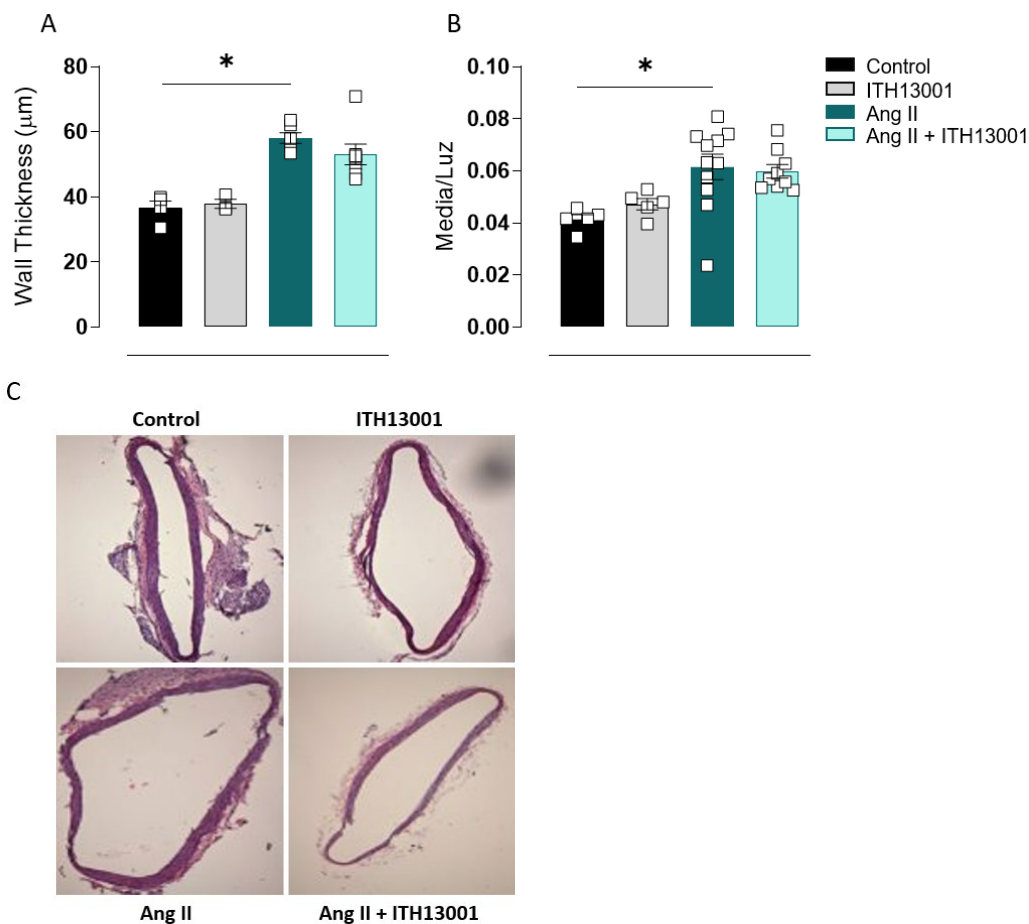


Figura 67. El tratamiento con ITH13001 no modifica el remodelado aórtico inducido por Ang II. (A) Espesor de la pared (*wall thickness*), (B) relación media/luz y (C) imágenes representativas de tinción hematoxilina-eosina (tamaño de la imagen: 1402,88 x 1052,16 μm) de aorta de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) ($n = 5-10$). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs Control por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Además de analizar el efecto producido en aorta, estudiamos el efecto del tratamiento con ITH13001 en el remodelado de arterias mesentéricas de resistencia. Los vasos procedentes de ratones infundidos con Ang II mostraron menores diámetros interno y externo comparados con los ratones control; el tratamiento de estos ratones con ITH13001 previno parcialmente la reducción de ambos diámetros. El tratamiento con ITH13001 de los ratones control no modificó estos parámetros (*Figura 68A*).

Además del cambio observado en los diámetros vasculares, en arterias de ratones infundidos con Ang II se incrementaron tanto el espesor de la pared como la relación media/luz. En este caso, el tratamiento con ITH13001 en ratones hipertensos no modificó dichos parámetros; sin embargo, en ratones control ITH13001 incrementó el espesor de la pared vascular, sin afectar la relación media/luz (*Figura 68B*).

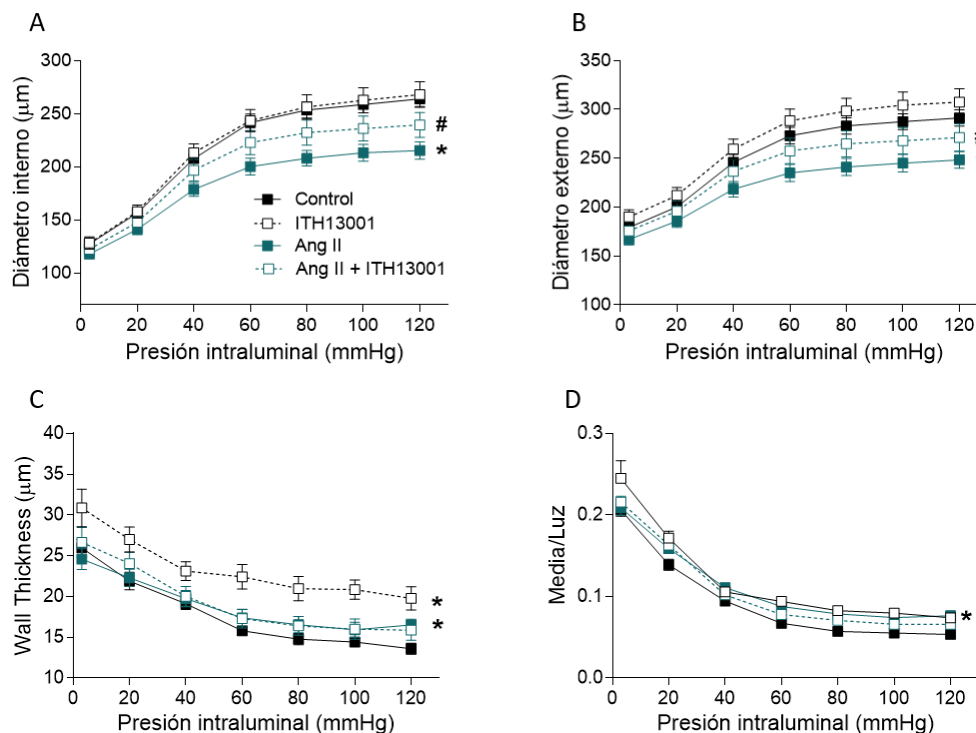


Figura 68. El tratamiento con ITH13001 previene parcialmente la reducción de calibre de arterias mesentéricas de resistencia inducida por Ang II. Diámetro interno (A), externo (B), espesor de la pared (*wall thickness*, C) y relación media/luz (D) de arterias mesentéricas de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n=9-11). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

A continuación, analizamos el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre el espesor de las capas de la pared y el número de células en las mismas. La infusión de Ang II incrementó el espesor de la capa media vascular sin afectar a la capa adventicia; el tratamiento con ITH13001 en ratones hipertensos no modificó el espesor de ninguna de las capas (*Figura 69A*). En el caso de los ratones control, el tratamiento con ITH13001 incrementó el espesor de la capa adventicia, sin afectar el de la capa media (*Figura 69B*).

En cuanto al número de células en las distintas capas de la pared vascular, Ang II redujo el número de células musculares lisas y endoteliales sin afectar a las células de la adventicia. En los

ratones hipertensos, el tratamiento con ITH13001 previno la reducción en el número de células endoteliales, sin afectar a las células musculares (*Figura 69B*). En los ratones control, el tratamiento con ITH13001, de acuerdo con lo observado en el espesor de la adventicia, incrementó el número de células en dicha capa, sin afectar el número de células musculares y endoteliales (*Figura 69B*).

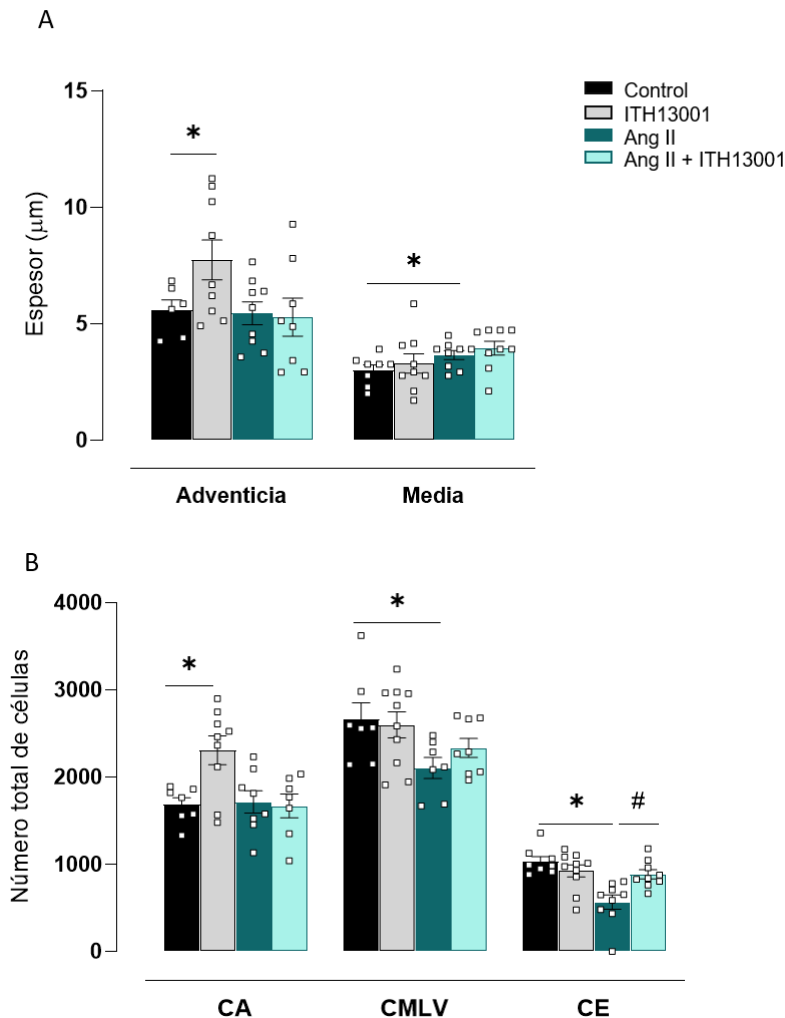


Figura 69. El tratamiento con ITH13001 previene la reducción del número de células endoteliales de arterias mesentéricas de resistencia inducida por Ang II. (A) Espesor de las capas adventicia y media y (B) número total de células adventiciales (CA), musculares lisas (CMLV) y endoteliales (CE) de arterias mesentéricas de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n=6-9). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA RIGIDEZ VASCULAR

Evaluamos el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre la rigidez vascular en arterias mesentéricas de resistencia. En primer lugar, analizamos los valores de la relación entre el estrés circunferencial y la tensión, observando un aumento de la rigidez en las arterias de ratones infundidos con Ang II, como se demuestra por el desplazamiento hacia la izquierda de la curva estrés/tensión y el mayor valor de β observado (*Figura 70A*). Además, la distensibilidad

incremental, fue menor en arterias mesentéricas de resistencia de ratones infundidos con Ang II (**Figura 70B**). El tratamiento con ITH13001 de ratones hipertensos previno las alteraciones observadas en ambos parámetros, mientras que en ratones control no produjo ningún cambio (**Figura 70A, B**).

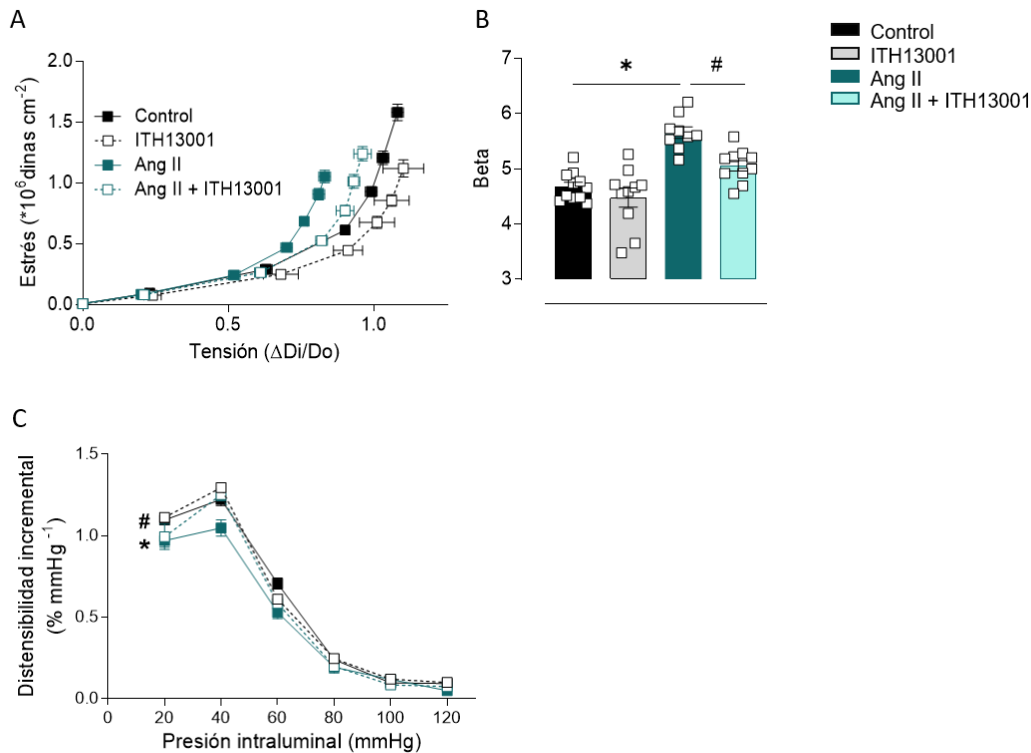


Figura 70. ITH13001 mejora la rigidez vascular inducida por Ang II en arterias mesentéricas. (A) Relación estrés-tensión, (B) cálculo del módulo elástico tangencial o incremental (β) y (C) distensibilidad incremental de arterias mesentéricas de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) ($n=9$). Do, diámetro interno a 3 mmHg; Di, diámetro interno observado para una presión intravascular dada. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p<0,05$ vs Control, # $p<0,05$ vs Ang II por ANOVA de una vía (B) o de dos vías (C) seguido de test de Bonferroni.

A continuación, evaluamos el área y el número de las fenestras de la lámina elástica interna vascular. La infusión de Ang II no afectó al área de las fenestras, pero si redujo su número (**Figura 71A, B**); el tratamiento con ITH13001 incrementó el número de fenestras, sin afectar al área de las mismas (**Figura 71B**). En cuanto a los ratones control, el tratamiento con ITH13001 no alteró ninguno de estos parámetros (**Figura 71A, B**).

En resumen, los resultados observados con el tratamiento con ITH13001 de ratones hipertensos, tanto sobre los parámetros mecánicos como sobre el número de fenestras de la lámina elástica interna de arterias mesentéricas de resistencia, muestran una mejora de la rigidez inducida por Ang II en este lecho vascular.

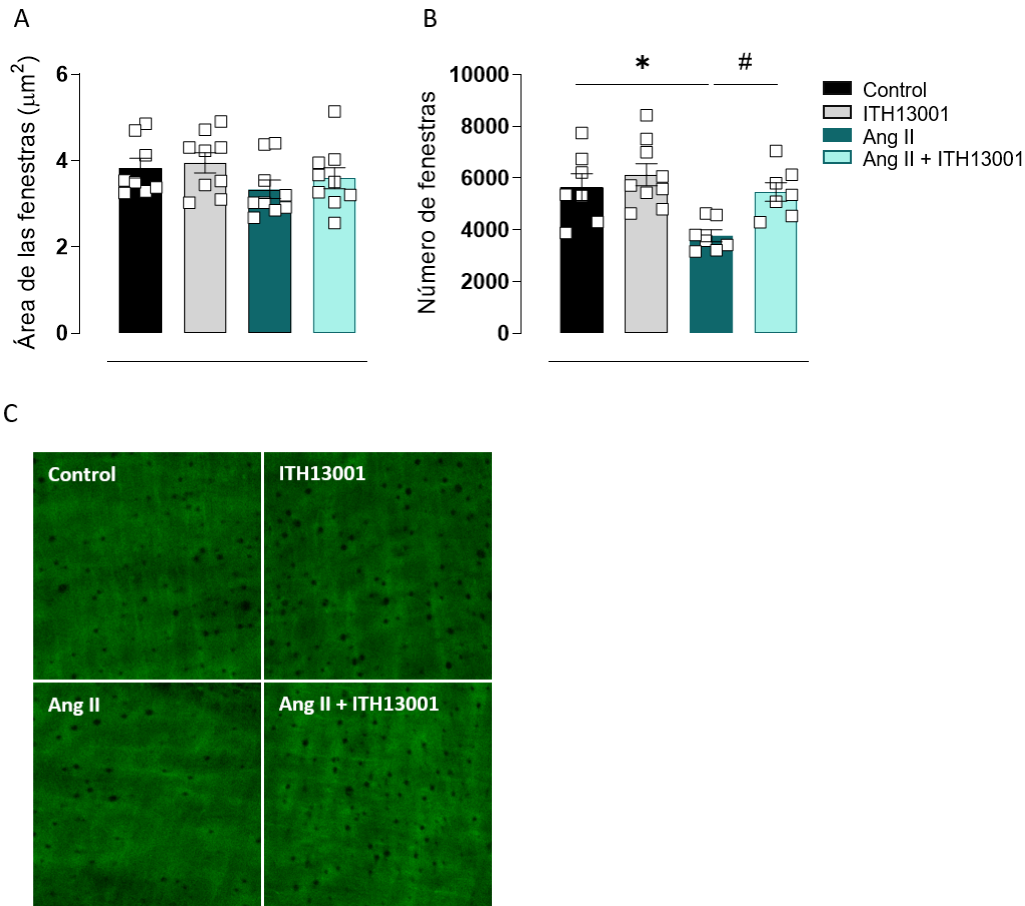


Figura 71. ITH13001 revierte la reducción en el número de fenestras de la lámina elástica interna inducida por Ang II en arterias mesentéricas. Cuantificación del área (A) y el número (B) de fenestras de la lámina elástica interna, y (C) imágenes representativas de la lámina elástica interna (objetivo x40, zoom x4; tamaño de la imagen: 93,75 x 93,75 µm) de arterias mesentéricas de resistencia de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n= 9). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

Como ya se ha comentado, otras alteraciones asociadas al desarrollo de hipertensión arterial son las que afectan a la función vascular. En primer lugar, evaluamos dicha función en aorta, donde observamos que la contracción inducida por fenilefrina fue mayor en segmentos de ratones infundidos con Ang II que en los de ratones control; esta contracción fue reducida por el tratamiento con ITH13001 (**Figura 72A**). En este lecho vascular, tras la infusión con Ang II también se observó una reducción en las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina, siendo estas mejoradas por el tratamiento con ITH13001 (**Figura 72B**). Las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio inducidas por DEA-NO no se modificaron por la infusión de Ang II y tampoco fueron afectadas por el tratamiento con ITH13001 (**Figura 72C**). En cuanto a los ratones control tratados con ITH13001, se observó una ligera reducción en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina (**Figura 72A**), no afectando este tratamiento a las respuestas vasodilatadoras, tanto dependientes como independientes de endotelio (**Figura 72B, C**). Por otro lado, las respuestas vasoconstrictoras a una solución de alto

potasio tampoco se modificaron en ninguno de los grupos experimentales (resultados no mostrados).

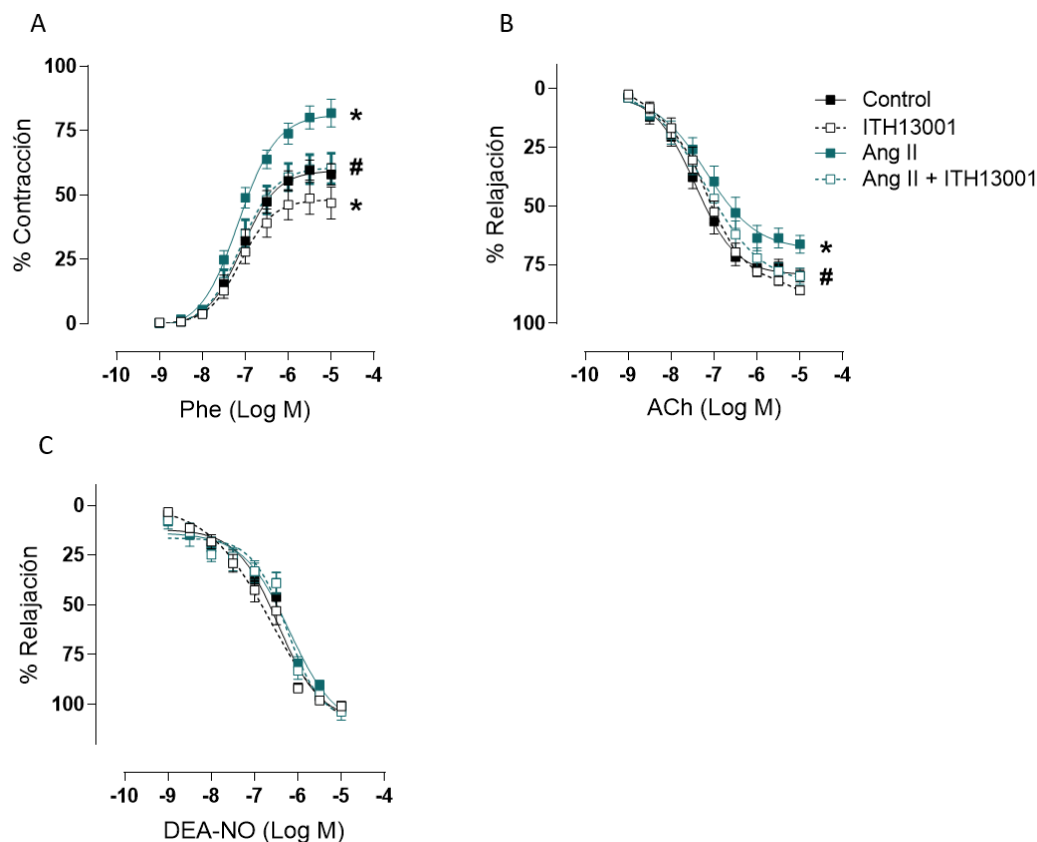


Figura 72. ITH13001 mejora la disfunción endotelial inducida por Ang II en aorta. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe, A), acetilcolina (ACh, B) y NONOato de dietilamina (DEA-NO, C) en aortas de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n= 9-17). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS (A) o Phe (B, C). * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

En arterias mesentéricas de resistencia de ratones infundidos con Ang II, la contracción inducida por fenilefrina no mostró cambios significativos respecto a arterias de ratones control (**Figura 73A**); sin embargo, si se observó una reducción en la vasodilatación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina en estas arterias (**Figura 73B**). El tratamiento con ITH13001 mejoró la reducida vasodilatación dependiente de endotelio (**Figura 73B**), sin afectar a las respuestas contráctiles (**Figura 74A**). En cuanto a la relajación independiente de endotelio inducida por el donador de NO, DEA-NO, esta fue similar en los distintos grupos experimentales (**Figura 73C**). El tratamiento con ITH13001 de los ratones control no afectó ninguna de estas respuestas (**Figura 73A-C**).

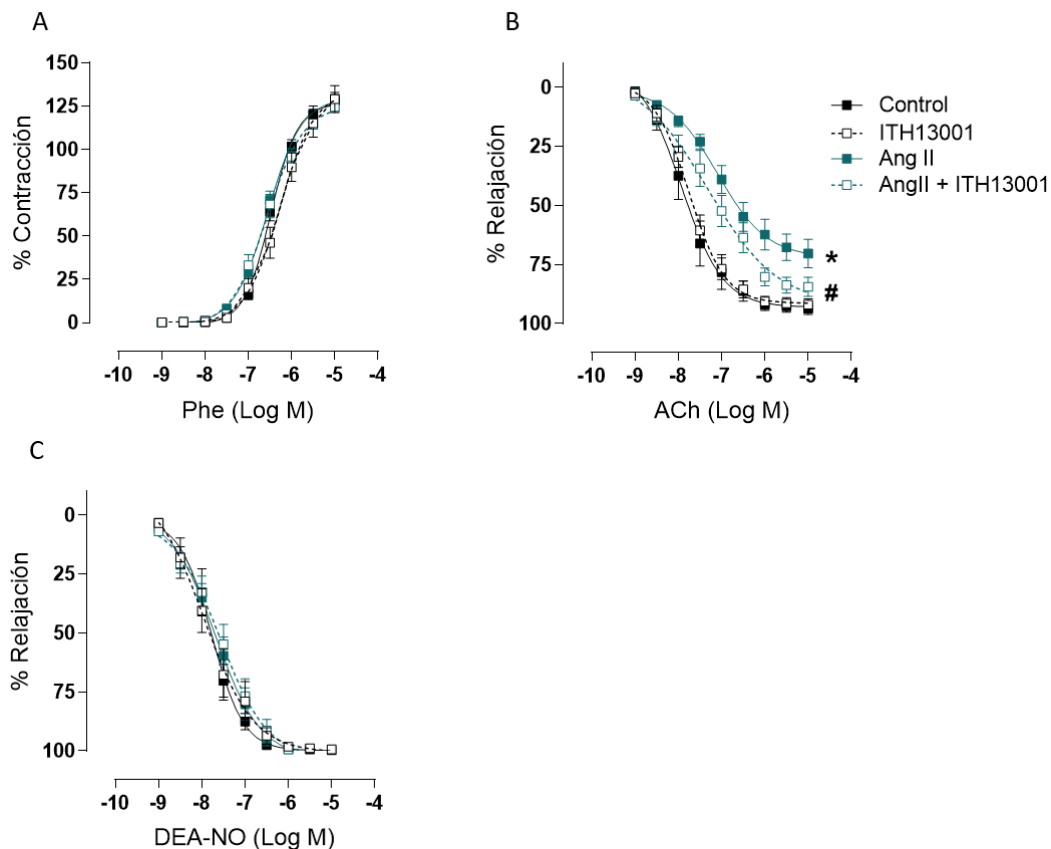


Figura 73. ITH13001 mejora la disfunción endotelial inducida por Ang II en arterias mesentéricas de resistencia. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe, A), acetilcolina (ACh, B) y NONOato de dietilamina (DEA-NO, C) en arterias mesentéricas de resistencia de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n= 6-14). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS (A) o Phe (B, C). * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DE ITH13001 *IN VITRO* SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

Con el fin de estudiar en mayor profundidad los efectos vasculares de ITH13001, y dada la mejora observada en la relajación dependiente de endotelio en arterias procedentes de ratones hipertensos tratados con este compuesto, realizamos diferentes experimentos *in vitro* para evaluar los efectos directos de ITH13001 a nivel vascular.

En primer lugar, analizamos el efecto inducido por ITH13001 en segmentos aórticos precontraídos con fenilefrina; como se observa en la **Figura 74**, ITH13001 no indujo ninguna respuesta vasodilatadora.

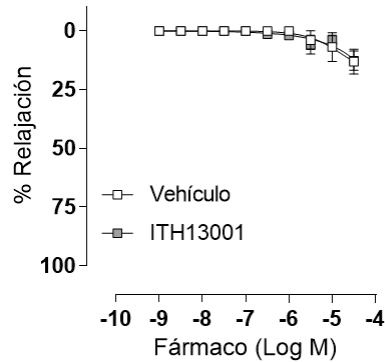


Figura 74. ITH13001 *in vitro* no presenta efectos vasodilatadores. Curvas concentración-respuesta a ITH13001 y su vehículo (dimetilsulfóxido) en segmentos aórticos de ratones control precontraídos con fenilefrina (n = 6-7). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a fenilefrina.

Además, evaluamos el efecto de la incubación durante 1 hora con ITH13001 (30 μ M) sobre la contracción inducida por fenilefrina y sobre la vasodilatación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina en segmentos aórticos de ratones control. Tras dicha incubación no se observó modificación de ninguna de estas respuestas (**Figura 75**).

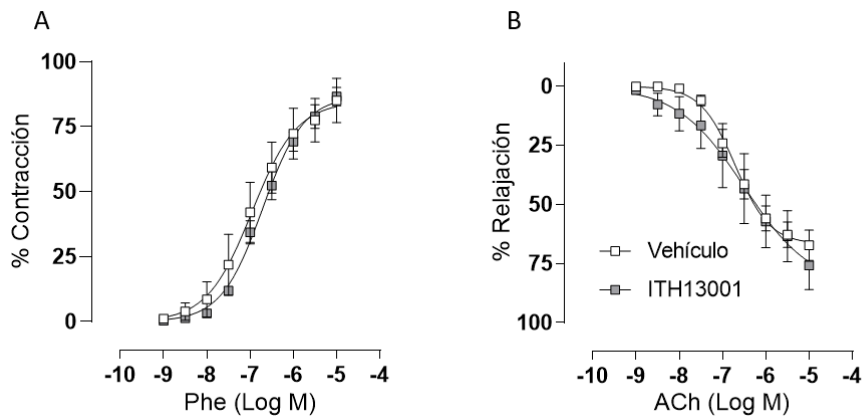


Figura 75. La incubación *in vitro* de segmentos aórticos con ITH13001 durante 1 hora no afecta a la función vascular. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe, A) y acetilcolina (ACh, B) en segmentos aórticos de ratones control tras 1 hora de incubación con ITH13001 (30 μ M) o vehículo (dimetilsulfóxido, 1,41 M) (n = 4-5). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS (A) o a Phe (B).

Por último, analizamos si la incubación *ex vivo* durante 24 horas con ITH13001 modifica el efecto de Ang II sobre las respuestas vasculares a fenilefrina y acetilcolina. Estos experimentos mostraron que Ang II (0,1 μ M) incrementa la contracción a fenilefrina y reduce la vasodilatación inducida por acetilcolina; los efectos inducidos por Ang II no se modificaron tras la incubación con 30 μ M de ITH13001 (**Figura 76**).

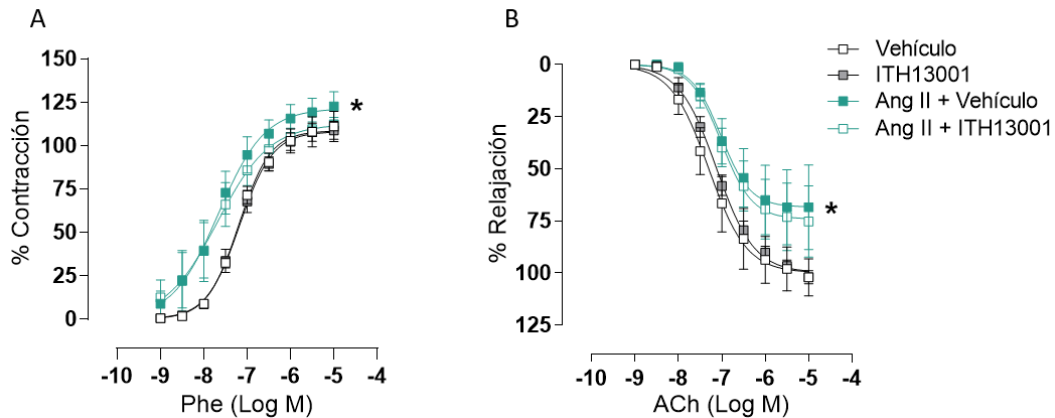


Figura 76. La incubación *ex vivo* de segmentos aórticos con ITH13001 durante 24 horas no afecta a la función vascular. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe, A) y acetilcolina (ACh, B) en segmentos aórticos de ratones control tras 24 horas de incubación con ITH13001 (30 μM) o vehículo (dimetilsulfóxido, DMSO, 1,41 M) en presencia o ausencia de Ang II (0,1 μM) (n = 5). Los resultados (media ± ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS (A) o Phe (B). *p<0,05 vs vehículo por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

En vista de los resultados obtenidos hasta el momento, analizamos la implicación del estrés oxidativo en la disfunción endotelial observada en animales hipertensos, y el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre dicho papel. Para ello, utilizamos diferentes compuestos antioxidantes, como el inhibidor de Nox1 ML-171, el barredor de O₂⁻ Tirón y el antioxidante dirigido a mitocondrias Mito-TEMPO.

ML-171 (0,5 μM), Tirón (1 mM) y Mito-TEMPO (0,5 μM) no modificaron la relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina en aorta de ratones control, independientemente o no del tratamiento con ITH13001 (**Figura 77A, B**); sin embargo, los tres compuestos mejoraron dicha respuesta en aorta de ratones infundidos con Ang II (**Figura 77C**). El tratamiento con ITH13001 de los ratones infundidos con Ang II abolió el efecto de los tres antioxidantes (**Figura 77D**), lo que confirma el efecto antioxidante de ITH13001.

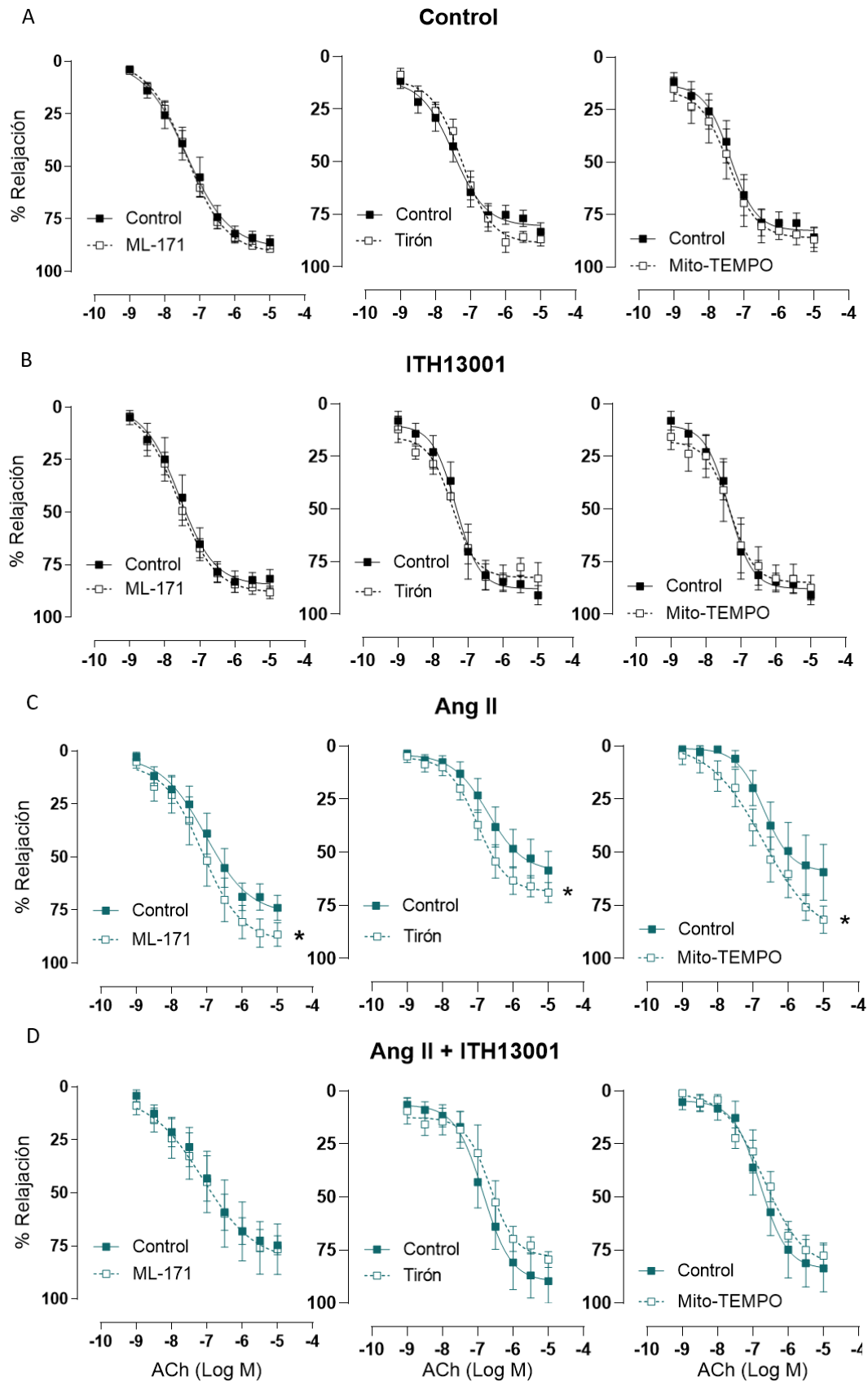


Figura 77. ITH13001 reduce la participación del estrés oxidativo en la disfunción endotelial inducida por Ang II. Efecto de ML-171 (0,5 μ M), tirón (1 mM) y Mito-TEMPO (0,5 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en segmentos aórticos de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44

mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 4-7). (A) Arterias de ratones control, (B) arterias de ratones control tratados con ITH13001, (C) arterias de ratones infundidos con Ang II y (D) arterias de ratones infundidos con Ang II y tratados con ITH13001. Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a fenilefrina. * $p < 0,05$ vs Control por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el estrés oxidativo, al reducir la biodisponibilidad de NO, contribuye a la disfunción endotelial observada en hipertensión. Para determinar si la reducción del estrés oxidativo que produce ITH13001 restaura los niveles de NO, analizamos la producción de NO utilizando la sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) y un kit colorimétrico. En primer lugar, comprobamos una menor producción de NO en aorta de ratones hipertensos que en ratones control, que se previno tras el tratamiento de estos ratones con ITH13001. El tratamiento con ITH13001 de los ratones control afectó dicha producción (*Figuras 78A, B*).

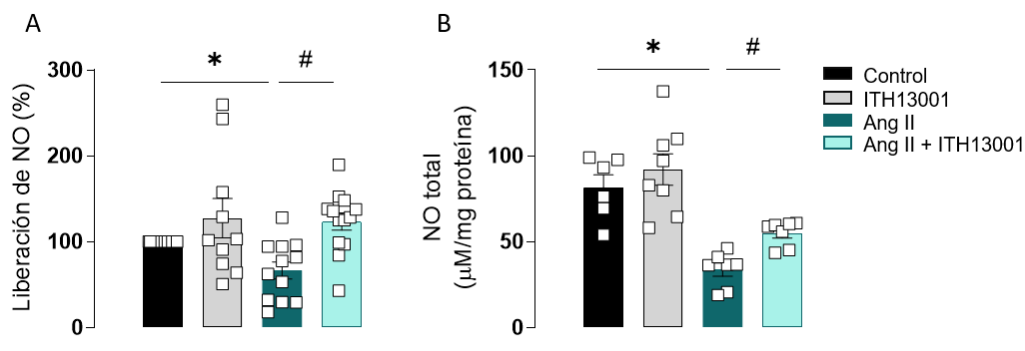


Figura 78. ITH13001 incrementa los niveles de NO en aortas de ratones infundidos con Ang II. Cuantificación de la liberación de NO mediante el uso de la sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) (A) y un kit colorimétrico (B) en aorta de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 8-19). Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES. * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

La incubación con el inhibidor de NOS L-NAME (0,1 mM) desplazó hacia la izquierda la curva concentración-respuesta a fenilefrina, siendo este desplazamiento menor en segmentos de animales hipertensos, como muestra el análisis de la diferencia del área bajo la curva concentración-respuesta a fenilefrina en presencia y ausencia de L-NAME (*Figura 79*); de acuerdo con los resultados anteriores, en los que el tratamiento de animales hipertensos con ITH13001 aumentó la producción de NO, el efecto de L-NAME fue mayor en los ratones infundidos con Ang II tratados con ITH13001 (*Figura 79*). En cuanto al tratamiento con ITH13001 de los ratones control, no se observaron diferencias en el efecto de L-NAME (*Figura 79*).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con ITH13001, probablemente como consecuencia de la reducción del estrés oxidativo, aumenta la biodisponibilidad de NO, lo que podría explicar la mejora en la función endotelial observada.

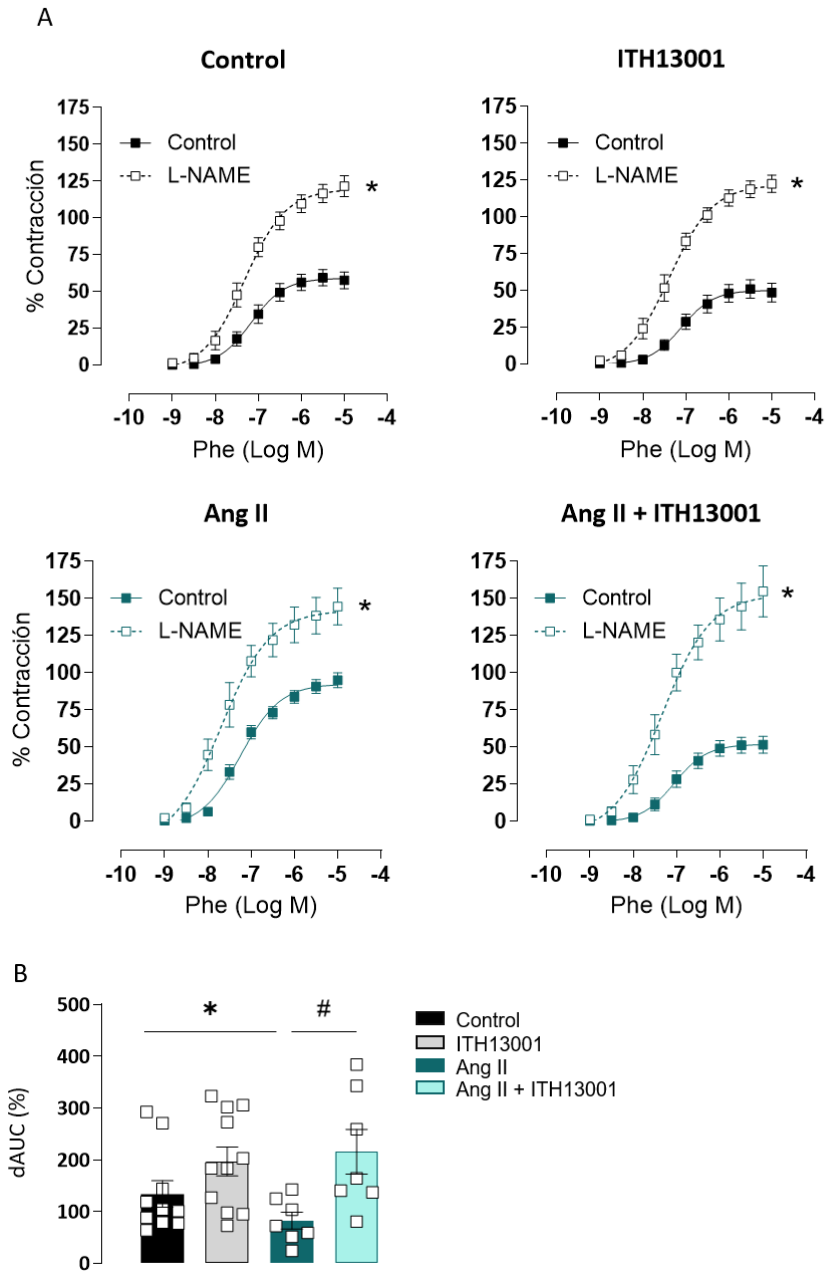


Figura 79. ITH13001 incrementa la participación de NO en las respuestas contráctiles inducidas por Phe en aorta de ratones infundidos con Ang II. (A) Efecto de N(ω)-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 0,1 mM) en las curvas concentración-respuesta a fenilefrina (Phe) en segmentos aórticos de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) ($n = 7-11$). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. (B) Diferencias de área bajo la curva concentración-respuesta a fenilefrina (dAUC) (media \pm ES) en presencia y ausencia de L-NAME, en los distintos grupos experimentales, representadas como porcentaje del AUC de situación control. (A) * $p < 0,05$ vs Control por ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni; (B) * $p < 0,05$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE LOS PARÁMETROS INFLAMATORIOS VASCULARES

Igual que habíamos hecho a nivel cardiaco, analizamos el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre los parámetros inflamatorios a nivel vascular. Encontramos niveles incrementados de ARNm de las citoquinas proinflamatorias *Tnfα*, *IL-6* y *Ccl-2*, así como de *Cd3* y *COX-2* en segmentos aórticos de ratones infundidos con Ang II (**Figura 80A**); asimismo, también la expresión proteica de NLRP3, iNOS y MyD88 fue mayor en aorta de ratones hipertensos (**Figura 80B, C**). Los niveles de todos estos marcadores proinflamatorios fueron menores en segmentos aórticos de ratones hipertensos tratados con ITH13001; el tratamiento de los ratones control con este fármaco no modificó estos parámetros (**Figura 80A-C**).

Estos resultados sugieren que el compuesto ITH13001 posee propiedades antiinflamatorias a nivel vascular, que también podrían contribuir a la mejora de la disfunción endotelial observada.

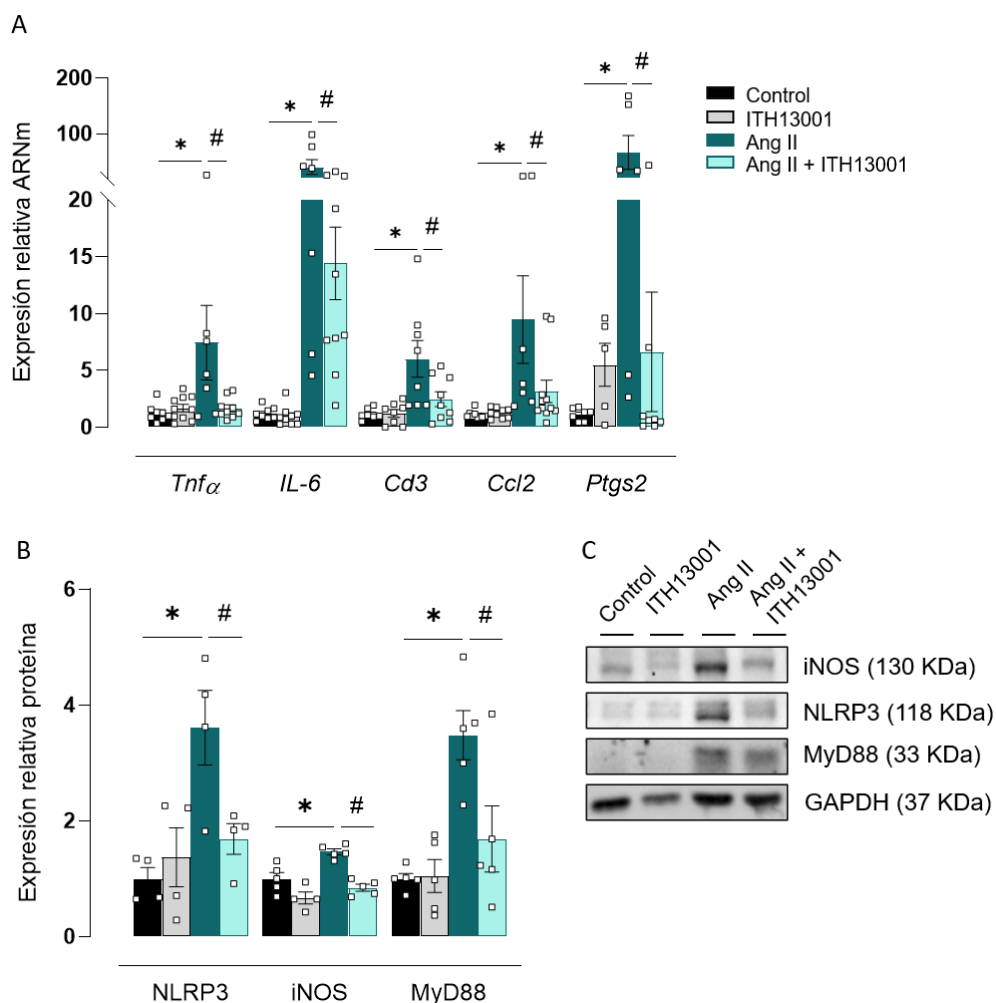


Figura 80. ITH13001 reduce la inflamación vascular inducida por Ang II. (A) Niveles de ARNm de los marcadores inflamatorios *Tnfα*, *IL-6*, *Cd3*, *Ccl2* y *COX-2* (*Ptgs2*) en aorta de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 6-16). (B) Expresión de las proteínas inflamatorias NLRP3, iNOS y MyD88 en aorta de los mismos grupos de ratones (n = 4-5). Se muestran blots representativos de estas proteínas. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ITH13001 SOBRE EL FENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS

Como se ha comentado anteriormente, el sistema inmune juega un papel importante en la hipertensión, con producción de citoquinas y quimiocinas que promueven el daño en los órganos diana de esta patología (Norlander et al., 2018). Entre las células inmunes, los monocitos y los macrófagos han demostrado tener un papel importante en el desarrollo de la hipertensión y las alteraciones asociadas (De Ciuceis et al., 2005; Ko et al., 2007). Por ello, en macrófagos peritoneales procedentes de los animales de nuestro modelo, evaluamos el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre la expresión de marcadores de su fenotipo proinflamatorio M1, la citoquina *IL-1 β* , y de su fenotipo antiinflamatorio M2, el receptor de los complejos de haptoglobina-hemoglobina *Cd163*, la enzima *Arg1*, implicada en la inhibición de la iNOS, y la citoquina antiinflamatoria *IL-10*.

Los niveles de ARNm de *IL-1 β* estaban incrementados en macrófagos peritoneales procedentes de ratones infundidos con Ang II. El tratamiento con ITH13001 previno este incremento, no afectando a los niveles de este marcador inflamatorio en los ratones control (**Figura 81A**).

En cuanto a los marcadores antiinflamatorios, la infusión de Ang II redujo la expresión de *Cd163*, *Arg1* e *IL-10* en estas células. Por su parte, el tratamiento con ITH13001 incrementó los niveles de ARNm de todos ellos en animales hipertensos, aumentando, además, la expresión de *Arg1* e *IL-10* en macrófagos peritoneales procedentes de animales control (**Figura 81B**).

Estos resultados apoyan el efecto antiinflamatorio observado para ITH13001 a nivel cardíaco y vascular, favoreciendo la polarización de los macrófagos hacia su fenotipo M2, antiinflamatorio.

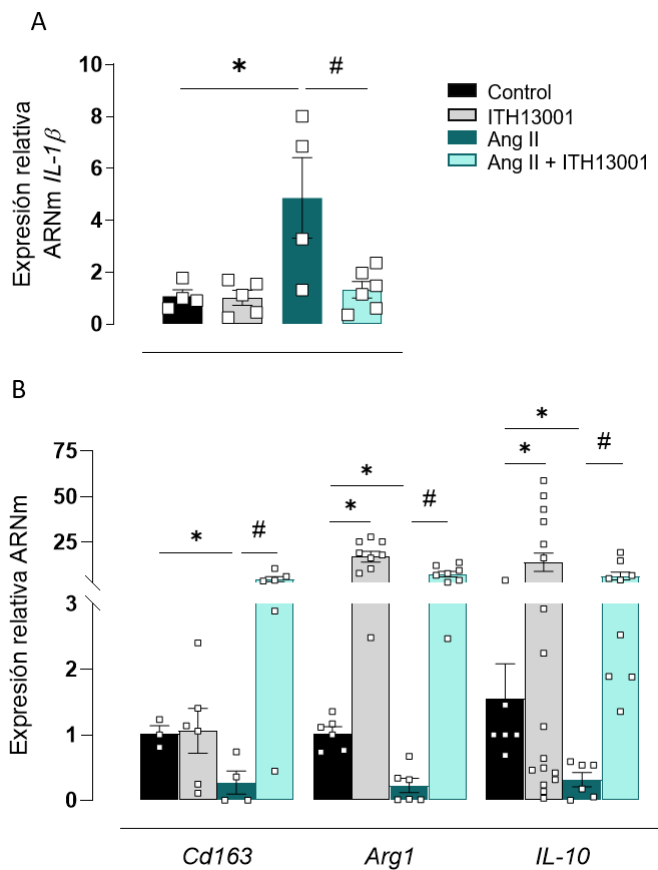


Figura 81. ITH13001 reduce la expresión de marcadores de fenotipo proinflamatorio M1 e incrementa la reducida expresión de marcadores antiinflamatorios M2 inducidas por Ang II en macrófagos peritoneales. (A) Niveles de ARNm del marcador inflamatorio *IL-1β* y (B) de los marcadores antiinflamatorios *Cd163*, *Arg1* y *IL-10* en macrófagos peritoneales procedentes de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días) (n = 3-9). Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. *p<0,05 vs Control, #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

6. EFECTO DE ITH13001 EN LA ACTIVACIÓN DE Nrf2

Se ha descrito que ITH13001 actúa como inductor de Nrf2 en su caracterización *in vitro* utilizando la línea de células tumorales AREc32, las cuales expresan una luciferasa testigo dependiente de Nrf2 (León et al., 2016). Para comprobar este efecto a nivel cardiovascular, en primer lugar, llevamos a cabo experimentos en MOVAS, una línea celular establecida de CMLV. La incubación durante 24 h con ITH13001 (10 μM) incrementó la expresión de Nrf2 en la fracción nuclear de CMLV (**Figura 82**).

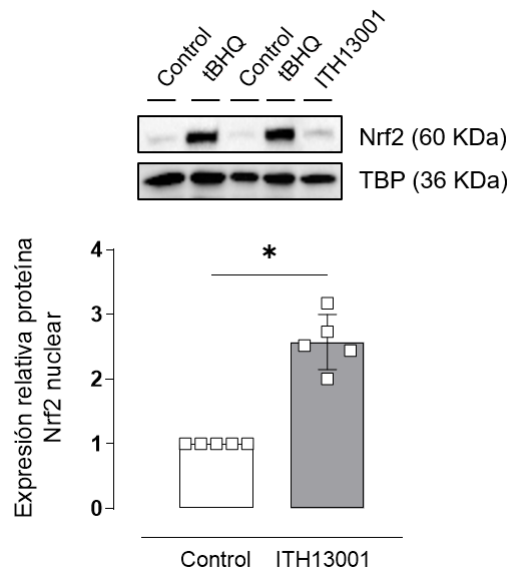


Figura 82. ITH13001 activa Nrf2 en células de músculo liso vascular. Expresión de Nrf2 en extractos nucleares (n = 5) de CMLV estimuladas durante 24 horas con ITH13001 (10 μ M); se utilizó tert-butil-hidroquinona (tBHQ, 20 μ M, 24 horas) como control positivo. Sobre el histograma de expresión proteica se muestra un blot representativo. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control. *p<0,05 vs Control t de Student pareada.

Una vez comprobada la capacidad de ITH13001 para inducir Nrf2, analizamos su efecto sobre una de las enzimas cuya expresión se regula por este factor de transcripción, como es la hemoxigenasa-1. De acuerdo con los resultados anteriores, ITH13001 incrementó la expresión de HO-1, tanto a nivel de ARNm como de proteína en lisados celulares de CMLV (Figura 83).

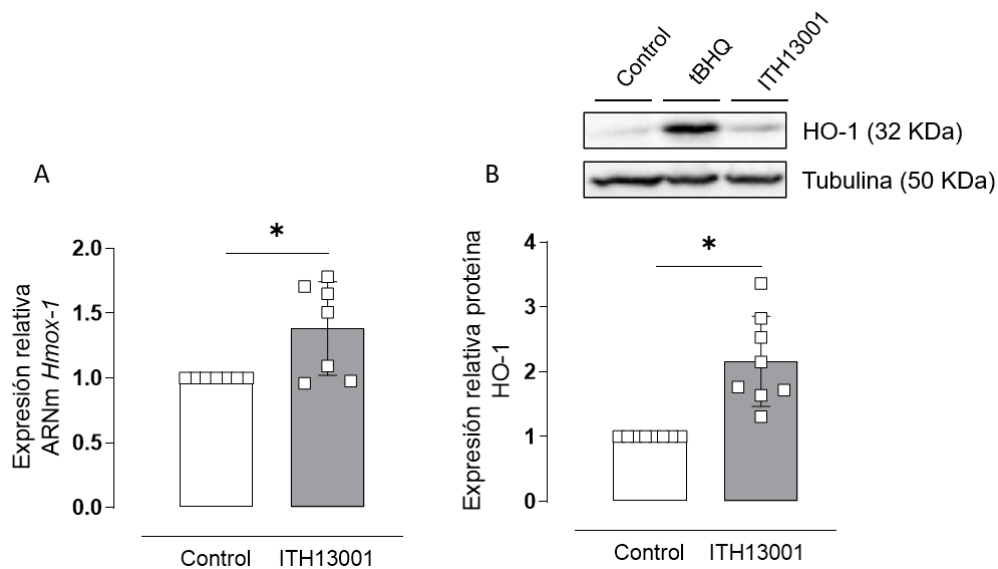


Figura 83. ITH13001 incrementa la expresión de HO-1 en células de músculo liso vascular. (A) Niveles de ARNm de *Hmox-1* (n = 7) y (B) expresión proteica de HO-1 (n = 8) en lisados de CMLV estimuladas durante 24 horas con ITH13001 (10 μ M); se utilizó tert-butil-hidroquinona (tBHQ, 20 μ M, 24 horas) como control positivo. Sobre el histograma de expresión proteica se muestra un blot representativo. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control. *p<0,05 vs Control t de Student pareada.

Finalmente, analizamos el efecto del tratamiento de los ratones hipertensos con ITH13001 sobre Nrf2 y sus genes diana, NQO1 y HO-1, tanto en ventrículo izquierdo como en aorta. En primer lugar, observamos que la expresión de estos genes fue similar en ratones control y en ratones infundidos con Ang II, tanto a nivel cardíaco (**Figura 84A**) como a nivel vascular (**Figura 84B**). El tratamiento *in vivo* de ratones infundidos con Ang II con ITH13001 redujo los niveles cardíacos de ARNm de *Nqo1*, pero no de *Nrf2* ni de *Hmox-1* (**Figura 84A**), mientras que en aorta no modificó los niveles de ARNm de ninguno de estos tres genes (**Figura 84B**). En los ratones control, el tratamiento con ITH13001 no modificó la expresión de estos genes ni en ventrículo izquierdo ni en aorta (**Figura 84A, B**).

Estos resultados sugieren que, aunque ITH13001 es capaz de activar Nrf2, los efectos vasculares y cardíacos observados tras el tratamiento de ratones hipertensos con este compuesto se deben a un mecanismo independiente de la activación de Nrf2.

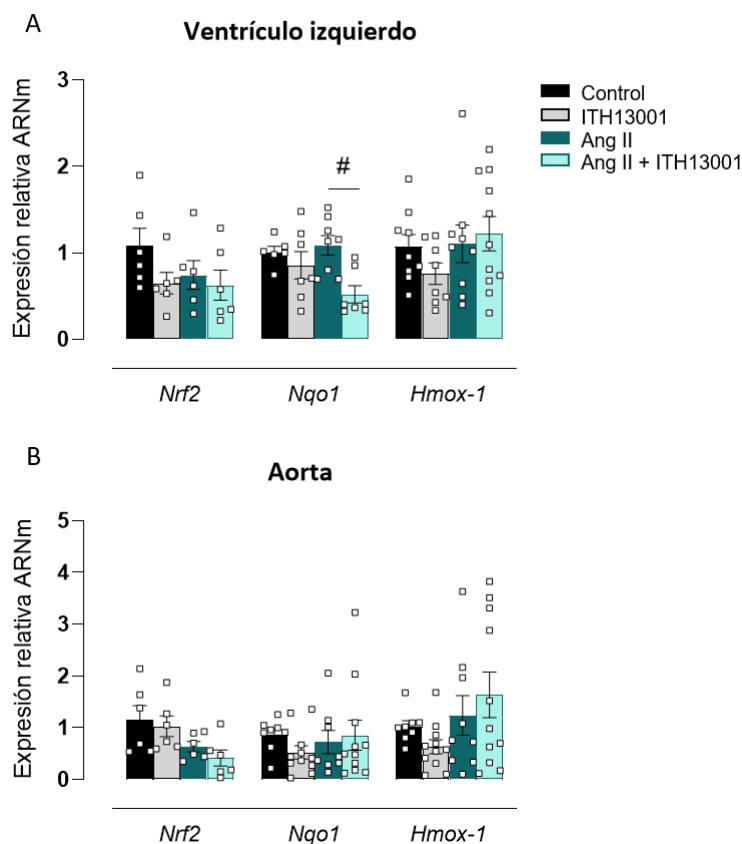


Figura 84. El efecto cardiovascular de ITH13001 es independiente de la activación cardiovascular de Nrf2. Niveles de ARNm de *Nqo1* y *Hmox-1* en ventrículo izquierdo (n = 6-10) (A) y aorta (n = 8-11) (B) de ratones C57BL/6J infundidos o no con Ang II (1,44 mg/Kg/día, 14 días) y tratados o no con ITH13001 (1 mg/Kg/día, 14 días). Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en animales control. #p<0,05 vs Ang II por ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que ITH13001 puede ser un buen candidato como tratamiento frente a la hipertensión por sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias independientes de la activación de Nrf2.

DISCUSIÓN

La hipertensión es una enfermedad multifactorial resultante de la interacción de factores genéticos, fisiológicos y ambientales, que constituye el factor de riesgo cardiovascular más importante. Esta enfermedad se asocia con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y supone un trastorno grave que incrementa de manera significativa el riesgo de sufrir otras enfermedades, como cardiopatías, encefalopatías, nefropatías e, incluso, deterioro cognitivo y demencia (Dinh et al., 2014; Williams et al., 2018; Kumar et al., 2020; OMS, 2021).

Esta patología se caracteriza por un incremento de la resistencia vascular periférica asociado con alteraciones estructurales, mecánicas y funcionales de la pared vascular, entre las que encontramos el remodelado y el incremento de la rigidez vascular, el aumento de las respuestas vasoconstrictoras y la disfunción endotelial (Rizzoni et al., 2003; Mulvany, 2012; Touyz and Montezano, 2015). Asimismo, en la hipertensión se producen alteraciones cardíacas, como la hipertrofia del ventrículo izquierdo, asociada a fibrosis cardíaca e hipertrofia de los cardiomiocitos, entre otras cosas (Susic and Frohlich, 2000).

En la fisiopatología de la hipertensión juegan un papel importante los procesos inflamatorios, con la presencia de niveles elevados de distintos marcadores proinflamatorios, como COX-2, IL-6, IL-1 β o TNF α , lo que hace que en los últimos años se considere una enfermedad inflamatoria crónica (Álvarez et al., 2007; Dinh et al., 2014); de la mano de esta inflamación, se produce un incremento del estrés oxidativo, asociado a una reducción de la biodisponibilidad de NO, que facilita el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares que acompañan a esta patología (Savoia and Volpe, 2011; Dinh et al., 2014; Hernanz et al., 2014; Norlander et al., 2018; Caillon et al., 2019).

CAPÍTULO 1. PAPEL DE LOS CANALES K_v1.3 EN LAS ALTERACIONES VASCULARES EN HIPERTENSIÓN

Como se ha mencionado, la inflamación juega un importante papel en la fisiopatología de la hipertensión, produciéndose una activación de células del sistema inmune (Norlander et al., 2018). Los canales K_v1.3 se han considerado una diana terapéutica como inmunomoduladores en enfermedades autoinmunes, observándose, tras su inhibición, una reducción en los niveles de citoquinas proinflamatorias y en la infiltración de macrófagos y células T en modelos de enfermedades inflamatorias como la psoriasis (Qiu et al., 2002; Lam and Wulff, 2011; Koch Hansen et al., 2014).

Por otro lado, las alteraciones estructurales y mecánicas de la pared vascular también contribuyen de manera significativa a la patología hipertensiva, incrementando la resistencia vascular y contribuyendo a la aumentada presión arterial. Dentro de estas alteraciones estructurales, juega un importante papel el remodelado vascular, que puede ser de varios tipos, pudiendo existir incremento en la proliferación de las CMLV. Los canales K_v1.3 están implicados en la proliferación de diferentes tipos celulares, entre ellos las CMLV (Cidad et al., 2010; Pérez-García et al., 2018; Bobi et al., 2020). En estas células, cuando se encuentran en su fenotipo contráctil, predomina la expresión de otros canales K_v, como los canales K_v1.5; sin embargo, en su fenotipo proliferativo, se ha observado un incremento en la expresión de K_v1.3 (Cidad et al., 2012). En este sentido, se han asociado los canales K_v1.3 con la adaptación vascular y los cambios en el fenotipo de las células contráctiles (Cheong et al., 2011), habiéndose sugerido que el aumento en la expresión de estos canales y/o la alteración de la relación K_v1.3/K_v1.5 contribuye

significativamente a la proliferación de las CMLV en varias condiciones patológicas, como la hiperplasia de la neointima y las lesiones endoluminales (Cidad et al., 2010; Cheong et al., 2011; Pérez-García et al., 2018).

En el primer capítulo de esta Tesis doctoral evaluamos el papel de los canales $K_v1.3$ en las alteraciones vasculares que tienen lugar en la hipertensión; también evaluamos la contribución de estos canales en la polarización de los macrófagos, al existir evidencias de su implicación en el cambio fenotípico de dichas células inmunes hacia un fenotipo proinflamatorio (Vicente et al., 2006; Villalonga et al., 2010; Moreno et al., 2013). Para llevar a cabo estos experimentos, usamos el compuesto derivado de la toxina de escorpión *Heterometrus spinnifer* (HsTX1) HsTX[R14A] y el derivado de la toxina procedente del veneno de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* [EWSS]ShK, los cuales actúan como bloqueadores selectivos de los canales $K_v1.3$ (Chang et al., 2015; Rashid et al., 2015; Tanner et al., 2017), y analizamos su efecto en el modelo de hipertensión por infusión con Ang II durante 14 días (Briones et al., 2009; Hernanz et al., 2015; Avendaño et al., 2018).

A nivel vascular, como se ha comentado, se ha asociado una incrementada expresión de los canales $K_v1.3$ y/o una alterada proporción $K_v1.3/K_v1.5$ con la proliferación de las CMLV en algunas patologías, habiéndose propuesto la relación $K_v1.3/K_v1.5$ como un marcador del fenotipo proliferativo de estas células (Cidad et al., 2010; Cheong et al., 2011; Pérez-García et al., 2018). Además, se ha observado una expresión de $K_v1.3$ que fue mayor en arterias de ratas SHR que en sus controles normotensos (Cox et al., 2001), sin observarse cambios en la expresión de los canales $K_v1.5$ (Cox, 2002). Por ello, quisimos evaluar la expresión vascular de los canales $K_v1.3$ y su proporción con respecto a los canales $K_v1.5$ en aortas procedentes de los ratones de nuestro modelo de hipertensión. Confirmando los datos obtenidos en otros modelos de hipertensión, tras el tratamiento con Ang II observamos un incremento en la expresión vascular de $K_v1.3$; dicho incremento se previno al bloquear estos canales con HsTX[R14A]. En cuanto al canal $K_v1.5$, su expresión mostró una tendencia a incrementar en los ratones infundidos con Ang II; en este caso, el tratamiento con HsTX[R14A] no modificó su expresión. En base a estos resultados, no se modificó la proporción $K_v1.3/K_v1.5$.

A la vista de estos resultados, y dado el mencionado papel propuesto para $K_v1.3$ en la proliferación de las CMLV (Pérez-García et al., 2018), evaluamos el efecto del bloqueo de los canales $K_v1.3$ sobre las alteraciones estructurales y mecánicas inducidas por Ang II. En cuanto al remodelado vascular, Ang II provocó un incremento en el espesor de la pared, tanto de vasos de conductancia como de resistencia, además de una reducción del diámetro interno vascular y un aumento de la relación media/luz en arterias mesentéricas de resistencia, confirmando las alteraciones estructurales características de la hipertensión; tras el tratamiento de los ratones infundidos con Ang II con los dos bloqueadores del canal $K_v1.3$ HsTX[R14A] o [EWSS]ShK no observamos cambios en el remodelado vascular. Además, el bloqueo de $K_v1.3$ tampoco previno la aumentada rigidez vascular desarrollada en arterias de resistencia de los ratones infundidos con Ang II. Estos resultados descartan la participación del canal $K_v1.3$ en las alteraciones de la estructura y la mecánica vascular asociadas al desarrollo de hipertensión.

Por otra parte, en estudios electrofisiológicos llevados a cabo en CMLV (resultados no mostrados), no se observaron alteraciones en las corrientes $K_v1.3$ en las CMLV tras la infusión de Ang II o con el bloqueo del canal. En línea con estos resultados, un estudio previo había mostrado una expresión similar de los canales $K_v1.3$ en CMLV de un modelo de ratón espontáneamente hipertenso, en comparación con sus homólogos normotensos (Cidad et al.,

2014). Esto, junto con el hecho de que nuestro modelo experimental no está asociado a un mayor número de CMLV (Briones et al., 2009; Hernanz et al., 2015; resultados de esta tesis), en comparación con los modelos proliferativos de hiperplasia de la neoíntima en los que se había estudiado la expresión del canal (Cheong et al., 2011; Ciudad et al., 2014), podría explicar la falta de efecto del tratamiento con el bloqueador de $K_v1.3$ sobre las alteraciones estructurales en el modelo de hipertensión inducida por Ang II. Dado el papel del remodelado y la rigidez vascular en la hipertensión, el hecho de que el tratamiento con el inhibidor de $K_v1.3$ no afectase a estos parámetros ayudaría a explicar que dicho tratamiento fuera ineficaz para prevenir el desarrollo de hipertensión.

Como se ha mencionado a lo largo de este manuscrito, la principal alteración de la función vascular asociada a la hipertensión arterial es la disfunción endotelial; por ello, analizamos el papel de $K_v1.3$ en las respuestas vasodilatadoras de los ratones de este modelo experimental. Como cabía esperar, Ang II produjo un deterioro en las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio, tanto en aorta como en arterias mesentéricas de resistencia; el tratamiento con HsTX[R14A] o con [EWSS]ShK previno la disfunción endotelial inducida por Ang II. Esto supone el descubrimiento de un inesperado papel de estos canales en la función vascular, ya que el resultado previsible habría sido una reducción de la vasodilatación, dado que la inhibición de los canales de K^+ provoca despolarización de la membrana y una posterior vasoconstricción (Nelson and Quayle, 1995; Cogolludo and Perez-Vizcaino, 2010; Jackson, 2018). Sin embargo, no se observaron alteraciones en la contracción inducida por potasio y en las relajaciones independientes de endotelio inducidas por DEA-NO en ratones infundidos con Ang II y tratados con ambos bloqueadores. Estos resultados, junto con los obtenidos en los mencionados estudios electrofisiológicos en CMLV, descartan la participación de $K_v1.3$ presentes en las CMLV en la disfunción endotelial inducida por Ang II, sugiriendo, por tanto, la existencia de mecanismos adicionales implicados en este proceso.

Una vez descartada la participación de los canales $K_v1.3$ musculares en las alteraciones funcionales observadas tras la infusión con Ang II, determinamos la expresión de los canales $K_v1.3$ a nivel endotelial; para ello, utilizamos células endoteliales microvasculares humanas expuestas a Ang II. No se observaron diferencias en la expresión de estos canales tras 6 o 24 horas de exposición, descartando así el papel de los canales $K_v1.3$ de las células endoteliales en la disfunción endotelial inducida por Ang II.

Puesto que los canales $K_v1.3$ que tienen un papel en la función vascular no son los presentes ni en las CMLV ni en las células endoteliales, evaluamos su expresión en la capa externa vascular; para ello, analizamos el PVAT que se encontraba rodeando la aorta de los ratones de nuestro modelo, el cual está en contacto con la adventicia; en este tejido observamos un incremento en la expresión de $K_v1.3$ con la infusión de Ang II, lo que sugería que los canales presentes en este tejido podrían ser los causantes de los cambios observados hasta ahora.

El PVAT, además de adipocitos, contiene células inmunes, habiéndose descrito que Ang II estimula la infiltración de macrófagos en él (Mikolajczyk et al., 2016). Diversos autores han demostrado la existencia de un papel causal de los monocitos y los macrófagos en el desarrollo de la hipertensión, el remodelado vascular y la disfunción endotelial; es el caso de lo observado tanto en un modelo de ratones deficientes en el factor estimulante de colonias de macrófagos, que los hace deficientes en estas células (De Ciuceis et al., 2005; Ko et al., 2007), como tras la eliminación selectiva de células monocíticas mieloides (Wenzel et al., 2011; Kossmann et al., 2014). Además, y de acuerdo con esto, Wenzel et al. (2011) demostraron que la infusión de Ang

II durante 7 días aumentaba la infiltración de células monocíticas mieloides, así como la expresión de diferentes genes proinflamatorios, como COX-2 o Nox2, en la pared vascular; otros estudios también mostraron un aumento de los marcadores de macrófagos M1 en el tejido vascular de ratones infundidos con Ang II durante 2 (Qian et al., 2014) y 4 semanas (Qi et al., 2019; Ye et al., 2019). Con el fin de determinar si la infusión de Ang II incrementaba la infiltración de macrófagos en la grasa perivascular en nuestro modelo experimental, determinamos los niveles de expresión génica de los marcadores de estas células MAC-3 (*Lamp2*) y F4/80 (*Adgre1*) en PVAT. Los niveles de estos dos marcadores fueron mayores en PVAT de ratones infundidos con Ang II, confirmando así la mayor infiltración de macrófagos en este tejido en animales hipertensos. Además, los niveles de ambos marcadores se redujeron tras el tratamiento con HsTX[R14A], mostrando la participación de los canales $K_v1.3$ en la infiltración de macrófagos en el PVAT inducida por Ang II.

Los canales de potasio juegan un papel crítico en el mantenimiento del gradiente electroquímico necesario para la entrada sostenida de Ca^{2+} implicada en la activación y los efectos funcionales de los macrófagos. En estas células, las corrientes de K^+ generadas se deben a la activación de los canales heterotetraméricos $K_v1.3/K_v1.5$ (Vicente et al., 2003; Villalonga et al., 2010; Moreno et al., 2013), y se ha descrito que el bloqueo de los canales $K_v1.3$ suprime la proliferación de los macrófagos inducida por los antígenos y la producción de citoquinas, al igual que ocurre en linfocitos T (Pérez-García et al., 2018); es por esto que los bloqueadores selectivos de $K_v1.3$ originan mejoría en diferentes patologías asociadas a procesos inflamatorios, como es el caso de la esclerosis múltiple, la diabetes autoinmune y las lesiones hepáticas agudas (Beeton et al., 2001b, 2001a, 2005; Rus et al., 2005; Chi et al., 2012; Wu et al., 2020) Por todo ello, medimos la expresión de los genes que codifican para estos canales en macrófagos peritoneales. En el caso de los ratones infundidos con Ang II, se observó un aumento en la expresión de los canales $K_v1.3$, aunque no en la expresión de $K_v1.5$, lo que origina una mayor relación $K_v1.3/K_v1.5$. Este resultado puede explicarse por la existencia de un aumento de la relación $K_v1.3/K_v1.5$ de los canales heterotetraméricos, como se ha descrito para la activación de los macrófagos con LPS, o de un aumento de los homotetrámeros $K_v1.3$ (Vicente et al., 2003; Moreno et al., 2013). Estos cambios en el patrón de expresión de los canales $K_v1.3$ y en la relación $K_v1.3/K_v1.5$ en los macrófagos procedentes de animales hipertensos se abolieron tras el tratamiento con HsTX[R14A].

El cambio de estequiometría en los canales $K_v1.3/K_v1.5$ encontrado en los macrófagos de ratones infundidos con Ang II sugiere un cambio de los macrófagos hacia un fenotipo M1, el cual se prevendría tras el tratamiento con HsTX[R14A]. Para comprobarlo, analizamos la expresión de marcadores de este fenotipo y observamos que los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infundidos con Ang II presentan un fenotipo similar al M1, con un incremento en los niveles de IL-1 β , IL-6 y COX-2, pero no de TNF α ni de la subunidad Nox2 de la NAD(P)H oxidasa, lo que apoya lo observado previamente por Wenzel et al. (2011) y Ye et al. (2019). El tratamiento con HsTX[R14A] disminuyó la expresión de algunos marcadores proinflamatorios como COX-2 e IL-1 β , sugiriendo una menor activación de los macrófagos tipo M1 tras el bloqueo de $K_v1.3$. Esto demuestra la importancia de los canales $K_v1.3$ como determinantes del cambio de fenotipo de los macrófagos en la hipertensión inducida por Ang II.

El cambio en el fenotipo de los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio inducido por los canales $K_v1.3$ podría tener consecuencias en la función vascular. Para determinar si los factores liberados por estos macrófagos están implicados en la disfunción endotelial observada en las

arterias de los ratones hipertensos, llevamos a cabo experimentos en segmentos aórticos de ratones C57BL/6J control incubados con el medio condicionado de macrófagos procedentes de los ratones de los distintos grupos de animales. La incubación de segmentos de aorta de ratones control con el medio condicionado de macrófagos procedentes de animales infundidos con Ang II provocó una disfunción endotelial, pero no modificó la relajación independiente de endotelio inducida por DEA-NO; tras la incubación con el medio de macrófagos procedentes de animales infundidos con Ang II y tratados con HsTX[R14A] no se observó esta disfunción endotelial. Estos resultados confirman el papel de los canales $K_v1.3$ presentes en los macrófagos en la disfunción endotelial inducida por Ang II.

Diversos mediadores inflamatorios, como la IL-1 β y los derivados de COX-2, están implicados en la disfunción endotelial asociada a la hipertensión (Jiménez-Altayó et al., 2006; Martínez-Revelles et al., 2013; Vallejo et al., 2014).. En el presente estudio coincubamos segmentos de aortas procedentes de ratones control con el medio condicionado de los macrófagos junto con el inhibidor selectivo de COX-2 celecoxib o con el antagonista del receptor de IL-1 β anakinra; en ambos casos, se abolió la disfunción endotelial inducida por el medio condicionado de los macrófagos procedentes de ratones infundidos con Ang II, indicando que, tanto productos derivados de COX-2 como la IL-1 β liberados por los macrófagos, están implicados en la disfunción endotelial inducida por ellos. De acuerdo con el papel de los canales $K_v1.3$ presentes en los macrófagos sugerido hasta ahora en la disfunción endotelial, los niveles de ARNm de $K_v1.3$ o $K_v1.5$ de los segmentos aórticos de ratones control incubados con el medio condicionado procedente de macrófagos de ratones infundidos con Ang II no cambiaron. Sin embargo, no podemos descartar un papel modulador de los canales $K_v1.3$ en otros mecanismos, como la generación de ROS inducida por Ang II o un aumento de la activación de la eNOS que contribuya a la mejora de la función endotelial inducida tras el bloqueo de los canales $K_v1.3$.

Los resultados obtenidos con el medio condicionado de los macrófagos están de acuerdo con el papel observado para los monocitos y macrófagos en el desarrollo de la hipertensión, y demuestran un efecto beneficioso del bloqueo del canal $K_v1.3$ en la prevención de la disfunción endotelial inducida por macrófagos en la hipertensión; sin embargo, como hemos visto anteriormente, el tratamiento con los bloqueadores $K_v1.3$ HsTX[R14A] o [EWSS]ShK no afectó a la presión arterial, en contraste con otros estudios que usaron diferentes enfoques para inhibir la presencia de macrófagos (De Ciuceis et al., 2005; Ko et al., 2007; Wenzel et al., 2011; Moore et al., 2015). Cabe destacar que HsTX[R14A], a la dosis utilizada, no produjo efectos ni en los macrófagos ni a nivel vascular en los ratones control. Una posible explicación de la falta de efecto sobre la presión arterial podría ser que, si bien encontramos una mejora de la disfunción endotelial, no se observaron cambios ni en el remodelado ni en la rigidez vascular, como hemos comentado anteriormente; aunque el efecto sobre la disfunción vascular es muy beneficioso, podría no ser suficiente para disminuir la presión arterial; además, no podemos descartar el papel de los canales $K_v1.3$ en otros órganos implicados en el control de la presión arterial. En cualquier caso, nuestros resultados demuestran que la mejora de la función endotelial, así como el efecto sobre la infiltración y el fenotipo de los macrófagos que se produce tras el bloqueo de los canales $K_v1.3$, no es una mera consecuencia de la modificación de la presión arterial.

Una limitación de este estudio es que se ha llevado a cabo en macrófagos peritoneales y no perivascuales, de modo que se necesitarían estudios adicionales para confirmar el aumento en la expresión de los canales $K_v1.3$ en este tipo celular; sin embargo, diversas evidencias encontradas ponen en valor los experimentos realizados en macrófagos peritoneales: 1) tras la

infusión de Ang II, la expresión de Kv1.3 aumenta de manera significativa en el tejido adiposo perivascular, 2) en los ratones hipertensos, hay un aumento de los marcadores de macrófagos en este tejido adiposo perivascular, el cual, como se ha descrito, es rico en macrófagos (Mikolajczyk et al., 2016), y 3) hay un aumento en la expresión de Kv1.3 en los macrófagos peritoneales tras la infusión de Ang II, que se restablece por el bloqueo del canal. Además, se ha descrito que los macrófagos peritoneales pueden migrar a los tejidos adyacentes durante la inflamación (Cassado et al., 2015); por otra parte, los macrófagos peritoneales han sido ampliamente utilizados como modelos de activación de otros tipos de macrófagos residentes en tejidos, especialmente los macrófagos vasculares, habiéndose usado como modelos para estudiar su comportamiento en patologías como la aterosclerosis o los aneurismas aórticos (Nakao et al., 2017).

En resumen, nuestros resultados demuestran que Ang II aumenta la expresión de los canales Kv1.3 en aorta, tejido adiposo perivascular y macrófagos. El aumento de la expresión de estos canales en los macrófagos peritoneales se asocia a la activación tipo M1 o proinflamatoria en respuesta a Ang II; por su parte, el bloqueo de Kv1.3 disminuye la infiltración de macrófagos y la producción de productos derivados de COX-2 y de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β , de los macrófagos, mejorando así la función endotelial, aunque sin afectar al remodelado vascular ni a la presión arterial. En conclusión, nuestro estudio identifica a los canales Kv1.3 como nuevos mediadores de la disfunción endotelial dependiente de los macrófagos en hipertensión, describiendo así un nuevo mecanismo inflamatorio implicado en las alteraciones vasculares en esta patología. Así, los bloqueadores de este canal podrían ser candidatos potenciales para el tratamiento, no solo de enfermedades autoinmunes, sino también de enfermedades cardiovasculares.

CAPÍTULO 2. PAPEL DE Nrf2 EN LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES EN HIPERTENSIÓN

El estrés oxidativo es uno de los principales causantes de las alteraciones que tienen lugar en la hipertensión, ya que un exceso de ROS participa en el desarrollo de procesos tales como inflamación, peroxidación lipídica, proliferación celular, apoptosis, migración o fibrosis, todos ellos con una importante contribución en las alteraciones de la función vascular y cardíaca, el remodelado cardiovascular, la disfunción renal, la activación de células inmunes y la excitación del sistema nervioso simpático en esta patología (Touyz et al., 2020). Existen diferentes mecanismos antioxidantes encargados de controlar los niveles de ROS, entre los que destaca Nrf2, un factor de transcripción sensible a estrés oxidativo, cuya activación da lugar a la expresión de proteínas y enzimas citoprotectoras que favorecen la supervivencia de las células bajo condiciones de estrés, como por ejemplo la inflamación, al estar implicadas en mecanismos de defensa antioxidante y antiinflamatoria (Chen et al., 2015; Pall and Levine, 2015; Hennig et al., 2018; Yamamoto et al., 2018). Aunque el papel de Nrf2 en el control de la presión arterial no está claro, su activación ha mostrado, en general, efectos beneficiosos sobre la función vascular, la inflamación y la presión arterial (Banday and Lokhandwala, 2013; Lopes et al., 2015; Tan et al., 2021); además, se ha observado que su inhibición produce un deterioro de la función renal y contribuye al desarrollo de hipertensión (Farooqui et al., 2021).

En este capítulo evaluamos el efecto de la delección de Nrf2 en el desarrollo de hipertensión y las alteraciones cardiovasculares asociadas en el modelo de hipertensión inducida por Ang II;

para ello utilizamos un ratón *knockout* Nrf2 (Nrf2^{-/-}) global. Estos ratones poseen un déficit en las respuestas mediadas por Nrf2 y se ha descrito que presentan una mayor susceptibilidad a la lesión oxidativa, así como a la diabetes, la artritis reumatoide o el cáncer (Chan et al., 2001; Khor et al., 2008; Aleksunes et al., 2010; Wruck et al., 2011; Cheung et al., 2014).

Como se ha mencionado, algunos investigadores han evaluado el papel de Nrf2 sobre la presión arterial utilizando diferentes activadores. Así, el tratamiento con bardoxolona, un derivado triterpénico que interactúa con residuos de cisteína específicos en la proteína inhibidora Keap1, permitiendo que Nrf2 se acumule, se transloque al núcleo e induzca la expresión de genes que responden a ARE (Dinkova-Kostova et al., 2005), normalizó la elevada presión arterial en un modelo de hipertensión en el que los ratones presentan deficiencia de los receptores renales de dopamina 2 (Cuevas et al., 2015); asimismo, la alimentación prolongada de ratas SHRSP con cebada fermentada, la cual aumenta la expresión hepática de Nrf2 y los niveles de antioxidantes, o con brotes de brócoli, el cual contiene el precursor del activador de Nrf2 sulforafano, atenuó la elevación de la presión arterial (Wu et al., 2004; Shirakawa et al., 2015); además, el tratamiento durante 4 meses con sulforafano también redujo la presión arterial en este modelo (Senanayake et al., 2012). Dado el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la hipertensión (Griendling et al., 2021), cabría esperar que la deficiencia de Nrf2 tuviera un efecto deletéreo sobre este parámetro; sin embargo, en nuestro modelo, la presión arterial de los ratones Nrf2^{-/-} control es ligeramente inferior a la de los WT; además, el desarrollo de hipertensión inducido por Ang II no se ve alterado por la delección de Nrf2, lo que descarta, aparentemente, un papel de este factor de transcripción en la regulación de la presión arterial en el modelo de hipertensión inducida por Ag II. Otros autores obtuvieron resultados similares en este y otros modelos de hipertensión; así, Li et al. (2011) observaron un aumento de la presión arterial inducida por Ang II que fue similar en ratones WT y ratones deficientes de Nrf2; igualmente, el aumento de la presión inducido por la constricción transversal de la aorta fue similar en ambos genotipos (Li et al., 2009). De forma similar, el uso de ML385, un inhibidor específico de Nrf2 que interactúa con la unión del complejo Maf-Nrf2 a ARE inhibiendo, de esta manera, la expresión de sus genes diana, no alteró la presión arterial *per se* (Farooqui et al., 2021), y Zoja et al. (2013) comprobaron que el análogo de bardoxolona dh404 no tenía efecto sobre la presión arterial en ratas Zucker gordas diabéticas.

Es conocido que la hipertensión produce cardiopatía hipertensiva resultante del remodelado cardíaco, siendo la hipertrofia del ventrículo izquierdo uno de los principales rasgos distintivos, que, además, se asocia con un mayor riesgo de padecer eventos cardiovasculares en pacientes con hipertensión (Susic and Frohlich, 2000; Santos and Shah, 2014). Esta hipertrofia afecta a todos los componentes del corazón, originando hipertrofia de los cardiomiocitos y fibrosis cardíaca, entre otras alteraciones (Susic and Frohlich, 2000). Estos procesos se han relacionado con el estrés oxidativo, el cual conduce a la activación de genes implicados en la proliferación de fibroblastos cardíacos y MMP, así como de factores de transcripción de vías de señalización de la hipertrofia (Tsutsui et al., 2011). De acuerdo con ello, la eliminación de Nrf2 en nuestro modelo podría tener un efecto deletéreo sobre estos parámetros cardíacos. Para medir la hipertrofia cardíaca, calculamos la relación entre el peso del ventrículo izquierdo y la longitud de la tibia de cada animal, además de utilizar la tinción de WGA para medir el área de los cardiomiocitos. La delección de Nrf2 no produjo alteraciones en la estructura cardíaca, de manera que estos animales no desarrollaron hipertrofia ni se observó aumento del área de sus cardiomiocitos con respecto a los animales WT; resultados similares han sido descritos por otros investigadores (Li et al., 2009, 2011; Chen et al., 2019). Por su parte, y como nuestro grupo había

descrito previamente en este modelo (Martínez-Revelles et al., 2013), la infusión de Ang II incrementó ambos parámetros en los ratones WT, indicativo del desarrollo de hipertrofia cardíaca; sin embargo, y de forma sorprendente, la ausencia de Nrf2 previno el desarrollo de estas alteraciones.

Además de la hipertrofia cardíaca, evaluamos los niveles de los marcadores de fibrosis Colágeno I y Bnp, habiéndose observado niveles incrementados de ambos marcadores en situaciones de hipertrofia cardíaca e hipertensión (Susic and Frohlich, 2000; Okamoto et al., 2019; Nwabuo and Vasan, 2020). Los ratones Nrf2^{-/-} no mostraron alteraciones en los niveles del ARNm de estos genes con respecto a los controles WT. En cuanto a los ratones WT infundidos con Ang II, estos mostraron incrementados niveles tanto de Colágeno I como de Bnp, confirmando la presencia de fibrosis cardíaca en este modelo de hipertensión; sin embargo, y al igual que habíamos observado en los parámetros de hipertrofia cardíaca, la delección de Nrf2 previno el desarrollo de fibrosis en los ratones infundidos con Ang II. Nuestros hallazgos van en contra de lo que cabría esperar y de lo observado en otros estudios, donde dicha delección incrementó aún más la hipertrofia cardíaca inducida por Ang II, el área de la sección transversal de los cardiomiocitos así como los niveles de Bnp y otros marcadores de fibrosis (Li et al., 2011; Chen et al., 2019). No obstante, aunque tanto en los estudios mencionados como en el nuestro se utilizan ratones deficientes en Nrf2, existen diferencias entre ellos que podrían explicar las diferencias observadas. Así, Chen et al. (2019) utilizan ratones Nrf2^{-/-} con fondo genético Balb/c, mientras que nuestro modelo se genera en ratones con fondo genético C57BL/6J; por otra parte, Li et al. (2011) usan ratones de 8 semanas de edad en el momento de la infusión de Ang II, mientras que nuestros animales tenían 14 semanas, pudiendo influir este parámetro en los resultados obtenidos y ayudar a explicar las diferencias encontradas.

Como se ha comentado, uno de los factores implicados en las alteraciones cardíacas observadas en hipertensión es el estrés oxidativo (Seddon et al., 2007; Tsutsui et al., 2011). De acuerdo con ello, la infusión con Ang II en animales WT incrementó los niveles de O₂^{•-} cardíacos, observándose, además, un incremento en los niveles del ARNm de las subunidades Nox2 y Nox4 de la NAD(P)H oxidasa. Resultados similares han sido descritos en otros estudios, donde la infusión de Ang II provocó un aumento de los niveles de ROS y/o de ambas subunidades de la NAD(P)H oxidasa, asociándose, además, la reducción del estrés oxidativo con la prevención de la hipertrofia cardíaca inducida por Ang II (Li et al., 2012; Yu et al., 2020; Lyu et al., 2021). Sin embargo, en ratones Nrf2^{-/-} la infusión con Ang II no aumentó los niveles de anión superóxido, ni se producen variaciones significativas en la expresión de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa. En este mismo sentido, Li et al. (2011) no observaron un aumento significativo de la formación de ROS inducida por Ang II tras la supresión de la actividad de Nrf2 en cardiomiocitos neonatales de rata, a pesar de que la formación de ROS inducida por Ang II (1 h de estimulación) fue inhibida por la activación de Nrf2. Aunque no es fácil explicarlo, proponemos que la delección global de Nrf2 tendría un papel protector previniendo el estrés oxidativo inducido por Ang II, probablemente mediante la activación otros sistemas antioxidantes que permitan compensar la ausencia de este factor de transcripción; este efecto sobre el estrés oxidativo cardíaco, a su vez, protegería frente al desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardíacas observadas en este modelo de hipertensión. Por otra parte, y a pesar del papel de Nrf2 como gen maestro del sistema de defensa antioxidante endógeno cardíaco (Li et al., 2009), su delección no alteró el estado oxidativo cardíaco en animales control, del mismo modo que ocurre en los experimentos de Chen et al. (2019); estos resultados están de acuerdo con la ya mencionada falta de efecto sobre la fibrosis y la hipertrofia cardíacas. En línea con los resultados obtenidos en corazón, cuando

tras la delección de Nrf2 evaluamos los niveles plasmáticos de malondialdehído, un biomarcador de estrés oxidativo resultante de la peroxidación lipídica, no se modificaron los niveles de este marcador ni se observó, tras la infusión de Ang II, el aumento que si se produce en ratones WT.

HO-1 es una de las enzimas que se producen como consecuencia de la activación de Nrf2 (Pall and Levine, 2015; Ahmed et al., 2017; Bellezza et al., 2018). Se trata de una enzima asociada a múltiples efectos beneficiosos, puesto que da lugar a compuestos con actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Durante, 2010). Diversos estudios han mostrado una relación entre Ang II y HO-1, de manera que la infusión de Ang II aumenta los niveles de HO-1 en órganos diana en hipertensión como son el riñón (Aizawa et al., 2000), el corazón (Ishizaka et al., 2000) y la aorta (Ishizaka et al., 1997). Por ello, evaluamos la expresión de HO-1 en ventrículo izquierdo de los animales de nuestro modelo y observamos que Ang II tiende a aumentar los niveles de esta enzima en animales WT. En animales con deficiencia en Nrf2, los niveles de HO-1 fueron similares a los de los animales WT control, de acuerdo con lo descrito por otros investigadores (Li et al., 2009, 2011); sin embargo, sorprendentemente, la infusión de Ang II en este genotipo produjo un incremento significativo en la expresión de HO-1. Es conocido que el promotor de HO-1 está sujeto a una compleja regulación génica por múltiples estímulos endógenos y exógenos, además de distintos factores de transcripción (Immenschuh and Ramadori, 2000; Wright et al., 2009; Martínez-Casales et al., 2021). Aunque el factor de transcripción Nrf2 ha demostrado ser el principal regulador de su expresión génica, también existe inducción independiente de Nrf2 (Paine et al., 2010; Wu et al., 2011; Piao et al., 2012). Así, Piao et al. (2012) observaron una elevada expresión de las enzimas de fase 2 HO-1 y GST en queratinocitos carentes de Nrf2, donde la ausencia de este gen daría lugar a una situación oxidativa más estresante que conduciría a la inducción de estas enzimas por otras vías como mecanismo protector, siendo esta una explicación admisible para explicar el incremento en la expresión de HO-1 que observamos en los ratones deficientes en Nrf2 infundidos con Ang II. Entre los factores de transcripción que regulan HO-1 de manera independiente de Nrf2 destacan miembros de la familia del factor de choque térmico (HSF), activados en condiciones de estrés, NF- κ B, un importante regulador de citoquinas y otros mediadores de la respuesta inmune e inflamatoria, y AP-1, factores todos ellos que controlan el destino celular regulando la producción de proteínas que median en el crecimiento o la muerte celular (Fürst et al., 2006; Alam and Cook, 2007; Zhang et al., 2021a). En nuestro modelo no hemos estudiado la expresión de estos factores; sin embargo, su estimulación en ausencia de Nrf2 podría ser la responsable del incremento en los niveles de ARNm de HO-1 observado en estos animales tras la infusión de Ang II. La aumentada expresión de IL-1 β encontrada, que se comenta a continuación, sugiere que en estas condiciones puede haber activación de NF- κ B.

Se ha descrito que Nrf2 presenta efectos antiinflamatorios limitando la actividad de NF- κ B (Chen and Maltagliati, 2018). Debido al importante papel de la inflamación en la patología hipertensiva (Martínez-Revelles et al., 2013; Touyz and Montezano, 2015), evaluamos los niveles de algunos marcadores inflamatorios en ventrículo izquierdo de los ratones de nuestro modelo experimental. En primer lugar, encontramos que, de acuerdo con su papel antiinflamatorio, la delección de Nrf2 incrementó la expresión de IL-6 y COX-2 con respecto a los ratones WT. Confirmando el estado inflamatorio que caracteriza la patología hipertensiva, la infusión de Ang II aumentó los niveles de IL-1 β , IL-6 y COX-2 en animales WT. En el caso de los animales Nrf2^{-/-}, se observó un incremento en la expresión génica de IL-1 β , IL-6 y Ccl-2 tras la infusión de Ang II, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por Chen et al. (2019).

A la vista de estos resultados, podemos hipotetizar que el efecto protector cardíaco observado tras la delección de Nrf2 en los ratones infundidos con Ang II podría estar mediado por un mecanismo compensatorio que produce reducción del estrés oxidativo, posiblemente mediante la acción de HO-1 y otros mecanismos antioxidantes. El estado inflamatorio observado en estos ratones, resultante de la ausencia de las acciones antiinflamatorias de Nrf2, apoya la hipótesis de que factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B estén activos y puedan mediar la inducción HO-1. Por otra parte, no podemos descartar que el proceso inflamatorio observado en estos ratones se deba a la existencia de estrés reductivo, resultante de una descompensación del estado redox como consecuencia de la activación de mecanismos antioxidantes compensatorios. En el estrés reductivo se produce un aumento anormal de equivalentes reductores que pueden agotar las ROS, destacando el incremento en las relaciones GSH/GSSG y/o NADH/NAD⁺; esta situación provoca una disminución del crecimiento celular, alteraciones en la función de diversas proteínas y reducción de la función mitocondrial y del metabolismo celular, contribuyendo todo ello al desarrollo de enfermedades estrechamente asociadas con condiciones inflamatorias (Pérez-Torres et al., 2017); así, se ha establecido una relación entre el estrés reductivo y el desarrollo de cardiomiopatía (Rajasekaran et al., 2007; Ma et al., 2020). En relación a ello, Erkens et al. (2015), usando ratones Nrf2^{-/-} de 5-6 meses de edad en sus experimentos, observaron elevados valores cardíacos en la relación GSH/GSSG, a pesar de que dichos animales mostraron niveles reducidos de GSH; esto podría ser indicativo del desarrollo de este estrés reductivo en animales de mayor edad con este genotipo.

Del mismo modo que el estrés oxidativo se ha asociado con el remodelado cardíaco, también tiene un papel en el remodelado vascular, habiéndose propuesto, en diferentes estudios, que las ROS están implicadas en los procesos que subyacen al remodelado vascular que ocurre en la patología hipertensiva (Touyz et al., 2003; García-Redondo et al., 2016; Griendling et al., 2021). Por ello, evaluamos la estructura vascular tanto en aorta, una arteria de conductancia, como en arterias mesentéricas de resistencia en nuestro modelo experimental. La delección de Nrf2 no alteró la estructura de la aorta; sin embargo, las arterias mesentéricas de resistencia de los ratones Nrf2^{-/-} mostraron un mayor calibre, con mayores diámetros interno y externo que las de ratones WT, asociado a un mayor número de CMLV. El aumento del diámetro interno reduce la resistencia vascular, lo que puede explicar que los ratones Nrf2^{-/-} tengan la presión arterial ligeramente más baja que los WT. Así, la delección de Nrf2 en animales control podría estar provocando un tipo de remodelado vascular hipertrófico, en el que se originan vasos de mayor tamaño, asociado a un aumento del número de células de la capa media, aunque sin alterar su espesor. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Levonen et al. (2007), quienes observaron que la transferencia génica de Nrf2 inducía un efecto inhibitorio del crecimiento de las CMLV, sin observar diferencias en la relación media/luz. Del mismo modo, otros autores han demostrado este efecto resultante de la inducción de Nrf2 inhibiendo la proliferación de las CMLV en diversas situaciones, como en presencia de Ang II (He et al., 2020), obesidad (Shawky et al., 2016), aterosclerosis o restenosis (Kwon et al., 2012; Yoo et al., 2013; Oh et al., 2014; Qiu et al., 2021), o favoreciendo su apoptosis (Ashino et al., 2016).

La infusión de Ang II mostró una tendencia a incrementar el espesor de la pared vascular y la relación media/luz de la aorta de ratones WT, lo que también se observó en arterias mesentéricas, donde estos aumentos alcanzaron significancia estadística. Así, en estos vasos de resistencia se incrementa el espesor de la capa media, sin modificar el número de CMLV. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo habían demostrado la existencia de remodelado vascular caracterizado por el aumento del espesor de la pared y de la relación media/luz en

vasos de ratones infundidos con Ang II (Briones et al., 2009; Hernanz et al., 2015; Olivencia et al., 2021). En el caso de los ratones deficientes en Nrf2, la infusión de Ang II mostró una tendencia a incrementar el espesor de la pared vascular en aorta, llegando a incrementar de forma significativa la relación media/luz. Sin embargo, en arterias mesentéricas de resistencia, tras la infusión de Ang II se redujeron los diámetros interno y externo, alcanzando unos valores similares a los de los ratones WT control, aunque el número de CMLV se mantuvo elevado; esto podría sugerir una reducción de los componentes de la MEC y/o del tamaño de las CMLV causada por la infusión de Ang II en este genotipo. Estos cambios en los diámetros no alteraron el espesor de la capa media ni de la pared, ni tampoco la relación media/luz, por lo que se previno el remodelado observado en ratones WT infundidos con Ang II. Algunos autores han estudiado el papel de Nrf2 sobre el remodelado vascular utilizando estrategias en las que se produce su activación, la cual muestra un efecto beneficioso previniendo esta alteración (Choi et al., 2015; Wang et al., 2018; He et al., 2020; Meeapat et al., 2021); sin embargo, hasta donde nosotros sabemos, es la primera vez que se analiza el efecto de la delección de Nrf2 sobre el remodelado vascular, no existiendo datos previos del tipo de remodelado observado en arterias mesentéricas de resistencia, tanto en animales de este genotipo control como infundidos con Ang II, por lo que nuestros hallazgos abren la posibilidad al estudio de los procesos donde Nrf2 podría estar implicado en la estructura vascular.

En arterias mesentéricas de resistencia también estudiamos parámetros mecánicos tales como la rigidez vascular y la distensibilidad incremental, analizando, además, el área y el número de fenestras de la lámina elástica interna vascular. En ratones Nrf2^{-/-} control, no se observaron alteraciones en ninguno de los parámetros mecánicos evaluados con respecto a los controles WT, descartando, aparentemente, la participación de la vía activada por este factor de transcripción en la mecánica vascular. Tal y como se ha descrito en diversos modelos de hipertensión, incluida la inducida por Ang II (Briones et al., 2003, 2009; Hernanz et al., 2015; Avendaño et al., 2018), las arterias de ratones WT tras la infusión de Ang II mostraron aumentada rigidez vascular y reducida distensibilidad incremental, lo que va asociado a una reducción en el número de fenestras de la lámina elástica interna, sin cambios en el área de las mismas; sin embargo, en ratones deficientes en Nrf2 la infusión de Ang II no incrementó la rigidez ni redujo la distensibilidad incremental en estos vasos, manteniendo sus propiedades elásticas; todo ello, a pesar de que el número de las fenestras en la lámina elástica interna se redujo del mismo modo que en el grupo WT, y de que su área era similar.

La lámina elástica interna vascular se compone de elastina, la cual confiere a la pared sus propiedades elásticas, y de colágeno, una proteína muy rígida que limita la distensión de los vasos y proporciona resistencia a la pared vascular (Wagenseil and Mecham, 2009). Se ha descrito que el aumento de los niveles de colágeno está asociado con la rigidez observada en arterias de resistencia de ratones hipertensos (Clerc et al., 1999; Intengan and Schiffrin, 2001; Briones et al., 2006; Stakos et al., 2010), incluido el modelo de infusión con Ang II (Briones et al., 2009; Hernanz et al., 2015). En el presente estudio no evaluamos los niveles de colágeno en vasos de resistencia, aunque, a la vista de los resultados obtenidos, podríamos esperar que la delección de Nrf2 previniera el incremento de la deposición de colágeno de la MEC inducido por Ang II. Esto ayudaría a explicar por qué la delección de Nrf2 previene el incremento de la rigidez vascular y la reducción en la distensibilidad incremental inducida por Ang II, a pesar de no modificarse el número de fenestras de la capa elástica interna; también podría explicar el menor espesor de la pared y de la relación media/luz de las arterias mesentéricas de resistencia de los ratones Nrf2^{-/-} infundidos con Ang II con respecto a los WT, a pesar de contener un mayor

número de CMLV. Soportando esta hipótesis, los datos de estructura cardíaca mostraban un aumento en los niveles de colágeno I en los ratones WT tras la infusión de Ang II, mientras que no se incrementaban dichos niveles en ratones Nrf2^{-/-}. Además, estudios previos habían demostrado la relación entre Nrf2 y los niveles de colágeno; así, Zhong et al. (2021) evaluaron el efecto de la activación de Nrf2 con tBHQ y 4-Octil itaconato en la degradación de células del núcleo pulposo, utilizando LPS como inductor de dicha degradación. En este estudio, LPS redujo los niveles de colágeno II, que se incrementaron con la activación de Nrf2.

Además del efecto sobre las alteraciones vasculares estructurales y mecánicas, el estrés oxidativo también juega un importante papel en las alteraciones funcionales asociadas a la hipertensión, participando en el desarrollo de disfunción endotelial, con incremento de las respuestas contráctiles y reducción de la vasodilatación dependiente de endotelio (Hernanz et al., 2014; Konukoglu and Uzun, 2017; Meeapat et al., 2021). Por lo tanto, es lógico pensar que la alteración del balance oxidativo tras la eliminación de Nrf2 tenga algún efecto sobre la función vascular. Por ello, evaluamos el efecto de la delección de Nrf2 en las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras, tanto en arterias mesentéricas de resistencia como en aorta.

Las arterias mesentéricas de resistencia de ratones Nrf2^{-/-} presentaron respuestas vasoconstrictoras que fueron similares a las de los ratones WT; tampoco se observaron diferencias en las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio, de forma similar a lo descrito en arteriolas mesentéricas de resistencia por Wang et al. (2018); de acuerdo con ello, la delección de Nrf2 no alteró el número de células endoteliales en estos vasos. Por lo tanto, nuestros resultados descartan la participación de este factor de transcripción y de la vía por él activada en la función vascular de este tipo de vasos en condiciones basales. Tal y como nuestro grupo y otros han descrito (De Ciuceis et al., 2005; González-Amor et al., 2021; Olivencia et al., 2021), la infusión de Ang II redujo la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina en arterias de resistencia de ratones WT, confirmando la característica disfunción endotelial descrita en hipertensión; esta disfunción se asocia, entre otros mecanismos, a una reducción del número de células endoteliales, como nosotros hemos observado. En el caso de los ratones Nrf2^{-/-}, Ang II también produjo disfunción endotelial, de forma similar a lo observado en ratones WT; además, también en este genotipo el tratamiento con Ang II redujo el número de células endoteliales, lo cual contribuiría a explicar dicha disfunción endotelial. Resultados similares fueron observados por Priestley et al. (2016) en un modelo de ratas deficientes en Nrf2 a las que se administraba dieta con bajo o alto contenido en sal, no observando diferencias en la dilatación de arterias cerebrales en respuesta a ACh en los grupos con dieta baja en sal, y viéndose estas respuestas reducidas en los grupos con alto contenido en sal en ambos genotipos. Dado el importante papel de las arterias de resistencia en el control de la presión arterial (Patton and Thibodeau, 2013), los resultados de función vascular obtenidos en este tipo de vasos podrían ayudar a explicar que el desarrollo de hipertensión tras la infusión con Ang II fuese similar en ambos genotipos.

En el caso de los vasos de conductancia, la aorta de animales control deficientes en Nrf2 no mostró alteraciones en la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina; sin embargo, presentó una reducida vasodilatación inducida por acetilcolina, indicando la existencia de disfunción endotelial, la cual puede deberse a la eliminación de los sistemas antioxidantes activados por Nrf2. La infusión de Ang II en animales WT produjo un incremento de la contracción inducida por fenilefrina, además de una reducción de la relajación dependiente de endotelio, ambas alteraciones características de esta patología que nuestro grupo había

observado previamente en este modelo (Martínez-Revelles et al., 2013; Hernanz et al., 2015). Sorprendentemente, y en contra de lo que esperábamos encontrar, en la aorta de los animales deficientes en Nrf2 se previnieron las alteraciones funcionales causadas por la infusión de Ang II, con una menor respuesta vasoconstrictora y una mayor vasodilatación dependiente de endotelio. Cabe destacar que no se observaron alteraciones en la contracción inducida por potasio ni en las relajaciones independientes de endotelio inducidas por DEA-NO en ninguno de los grupos experimentales, lo cual demuestra que los mecanismos implicados en estos efectos se localizarían a nivel endotelial y no muscular.

Dado el mencionado papel del estrés oxidativo en las alteraciones funcionales vasculares en hipertensión y el papel de Nrf2 como defensa antioxidante (Chen et al., 2015; Pall and Levine, 2015; Satta et al., 2017), evaluamos la participación del estrés oxidativo en la función vascular en estos animales. Para ello, llevamos a cabo experimentos en los que incubamos segmentos aórticos procedentes de los ratones de nuestro modelo con dos antioxidantes, el inhibidor de NOX1 ML-171 y el antioxidante dirigido a mitocondrias Mito-TEMPO. Como era de esperar, ninguno de los dos antioxidantes afectó a la contracción inducida por Phe ni a la relajación inducida por ACh en animales WT; en cuanto a los ratones control Nrf2^{-/-}, ninguno de los antioxidantes alteró las respuestas vasoconstrictoras, sin embargo, observamos que la incubación con ML-171 mejoró la relajación dependiente de endotelio en aortas procedentes de estos animales que, como habíamos visto, se encontraba deteriorada; Mito-TEMPO también mostró una tendencia a mejorarla, apuntando estos resultados al estrés oxidativo, posiblemente incrementado tras la eliminación de la vía Nrf2/ARE, como causante de dicha disfunción endotelial. Para confirmar esta hipótesis medimos los niveles de O₂⁻ en aorta, observándose, efectivamente, un incremento en estos niveles en arterias procedentes de ratones deficientes en Nrf2. Diversos estudios han mostrado que la activación o la transferencia de Nrf2 conduce a una reducción del estrés oxidativo (Wu et al., 2004; Levonen et al., 2007; Lopes et al., 2015; Bayo Jimenez et al., 2021), habiéndose observado en estas condiciones efectos beneficiosos sobre las células endoteliales vasculares y, por tanto, sobre la función endotelial (Zhang et al., 2021b, 2021c). Por otro lado, la disfunción de Nrf2 ha mostrado tener un efecto perjudicial en las respuestas vasculares como consecuencia de un incremento del estrés oxidativo; así, se han observado mayores niveles de estrés oxidativo en el envejecimiento como consecuencia de la desregulación de este factor de transcripción, lo cual provoca un mayor deterioro de las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio (Ungvari et al., 2011). De acuerdo con ello, la activación de Nrf2 en ratas envejecidas previene la disfunción endotelial observada en estos animales mediante una reducción del estrés oxidativo (Angulo et al., 2019).

En los ratones infundidos con Ang II, la incubación con ambos antioxidantes ML-171 y Mito-TEMPO redujo las respuestas contráctiles incrementadas y mejoró la reducida vasodilatación dependiente de endotelio en animales WT, lo que confirma el papel del estrés oxidativo en dichas alteraciones en este modelo de hipertensión. Sin embargo, en el caso de los ratones deficientes en Nrf2, ninguno de los antioxidantes modificó las respuestas vasculares, lo que sugiere que la reducción del estrés oxidativo tras la delección de Nrf2 podría estar implicada en la prevención del desarrollo de alteraciones en la función vascular en estos animales. De hecho, en los ratones Nrf2^{-/-} la infusión de Ang II no solo no incrementó la producción vascular de O₂⁻, sino que incluso se observó una reducción de la misma.

El NO es un factor liberado desde el endotelio que difunde hasta las CMLV, dando lugar a la relajación del músculo al reducir los niveles de Ca²⁺ (Lüscher and Tanner, 1993; Deanfield et al.,

2007; Rang et al., 2008). En nuestros experimentos, el inhibidor de la NOS L-NAME abolió completamente la vasodilatación inducida por ACh en todos los grupos experimentales (resultados no mostrados), lo que indica que esta respuesta está mediada principalmente por NO. El estrés oxidativo contribuye al desarrollo de disfunción endotelial y uno de los principales mecanismos que explican este efecto es la reducción de la biodisponibilidad de NO a través de la acción del O_2^- para formar $ONOO^-$ (Paravicini and Touyz, 2008; Viridis et al., 2011; Montezano et al., 2015). Sin embargo, la reducción en la biodisponibilidad del NO por el estrés oxidativo no solo afectará a las respuestas vasodilatadoras, sino que también alterará las respuestas contráctiles, las cuales se verán incrementadas al reducir un factor vasodilatador y aumentar los niveles de Ca^{2+} ; por ello, evaluamos las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina en segmentos aórticos de ratones de nuestro modelo experimental incubándolas con L-NAME. Estos experimentos mostraron un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a fenilefrina, desplazamiento que fue menor en segmentos aórticos de animales $Nrf2^{-/-}$ con respecto a los WT; el menor valor de la diferencia del área bajo la curva concentración-respuesta a fenilefrina en presencia y ausencia de L-NAME representa una menor participación del NO en la respuesta contráctil y, por tanto, sugiere una menor biodisponibilidad de NO. Estos resultados son coherentes con el hecho de que la eliminación de Nrf2, al reducir la actividad de mecanismos antioxidantes, incrementa la producción de ROS, que, a su vez, reducen los niveles de NO.

En aorta de ratones WT hipertensos observamos que L-NAME produce un menor desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a acetilcolina que en segmentos de ratones control, lo que sugiere una menor biodisponibilidad de NO, tal y como se ha descrito en este (Martínez-Revelles et al., 2013; Hernanz et al., 2015) y otros modelos de hipertensión (Fiorim et al., 2020; Simões et al., 2020). Por su parte, los ratones $Nrf2^{-/-}$ infundidos con Ang II mostraron una tendencia a incrementar esta biodisponibilidad de NO. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los experimentos de estrés oxidativo, cuyo incremento en animales WT infundidos con Ang II puede ser responsable, al menos en parte, de la reducción de la biodisponibilidad de NO; sin embargo, en animales deficientes en Nrf2 infundidos con Ang II, como muestran los niveles de fluorescencia del DHE y los experimentos de función vascular con ambos antioxidantes, se previene el incremento del estrés oxidativo, originando ese pequeño incremento en la biodisponibilidad de NO. En relación con estos datos, Erkens et al. (2015; 2018) describieron un incremento compensatorio en la expresión de eNOS a nivel vascular en animales $Nrf2^{-/-}$ de 5-6 meses de edad que restituía la función vascular; aunque no hemos estudiado la expresión de eNOS, en los animales deficientes en Nrf2 infundidos con Ang su expresión podría estar incrementada, lo que junto con la reducción del estrés oxidativo, contribuiría a la prevención de la disfunción endotelial.

Finalmente, y del mismo modo que habíamos llevado a cabo en ventrículo izquierdo, evaluamos los niveles de HO-1 en aorta. En nuestro caso, las aortas de los animales $Nrf2^{-/-}$ presentaron niveles reducidos de HO-1, lo que es coherente al ser esta enzima una de las dianas principales de Nrf2 (Pall and Levine, 2015; Ahmed et al., 2017; Bellezza et al., 2018) y que puede explicar el aumento de estrés oxidativo observado en estos vasos. Como se ha mencionado anteriormente, existe una relación entre Ang II y HO-1, habiéndose observado un incremento en la expresión de esta enzima tanto en endotelio como en la capa adventicia de aorta tras la infusión de Ang II (Ishizaka et al., 1997). En nuestro modelo experimental, la infusión de Ang II mostró una tendencia a incrementar los niveles de esta enzima en aorta de animales WT, incremento que fue significativo en animales deficientes en Nrf2, de forma similar a lo que ocurría en ventrículo

izquierdo. Como hemos comentado anteriormente, la expresión de HO-1 puede inducirse por otros factores, como AP-1 o NF- κ B, independientemente de Nrf2 (Fürst et al., 2006; Alam and Cook, 2007; Zhang et al., 2021a), pudiendo estar estos factores detrás del incremento en su expresión vascular observado en los animales Nrf2^{-/-}. Además de los efectos antioxidantes y antiinflamatorios asociados a HO-1, uno de los derivados de su acción enzimática, CO, posee efectos vasodilatadores (Durante, 2010), por lo que el incremento de este metabolito como consecuencia del aumento en la expresión de HO-1 que se observa en aorta tras la delección de Nrf2, podría participar en la prevención del desarrollo de disfunción endotelial. Por otra parte, otro de los productos derivados de HO-1 es la bilirrubina, que tiene efectos antioxidantes (Jansen et al., 2010; Martínez-Casales et al., 2021), de manera que su incremento podría contribuir a la reducción del estrés oxidativo en este tejido, y, de esa manera, prevenir de la disfunción endotelial inducida por Ang II.

En resumen, la delección de Nrf2 no modifica los niveles basales cardíacos de ROS pero estaría incrementando mediadores inflamatorios, no siendo este incremento suficiente para alterar la estructura del ventrículo izquierdo; a nivel vascular, la ausencia de este factor de transcripción incrementa el estrés oxidativo, reduciendo los niveles de NO y conduciendo al desarrollo de disfunción endotelial en aorta; además, aumenta el calibre en vasos de resistencia, lo cual iría acompañado de un aumento en el número de CMLV, pudiendo tener Nrf2 un papel en el remodelado de este lecho vascular.

Por su parte, tras la infusión de Ang II, en ausencia de Nrf2, se produce la activación de otros sistemas antioxidantes, como HO-1, con el fin de compensar la ausencia de este gen; esto estaría reduciendo el estrés oxidativo y previniendo algunas de las alteraciones causadas por la infusión de Ang II, tales como el desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardíacas o la disfunción endotelial en aorta. En arterias mesentéricas de resistencia, estos animales mantienen la disfunción endotelial observada en los animales WT infundidos con Ang II, aunque se previene el aumento del espesor de la pared y de la rigidez vasculares.

Con todo ello y lo observado por otros grupos de investigación, aunque a falta de nuevos experimentos que nos permitan confirmarla, la hipótesis que proponemos es que los beneficios observados en los animales deficientes en Nrf2 infundidos con Ang II podrían ser el resultado de un estado antioxidante compensatorio en el que se induce la expresión de HO-1 mediante AP-1 y NF- κ B, que se activarían como consecuencia de una situación inflamatoria resultante de la ausencia de Nrf2 y la infusión de Ang II; esta situación antioxidante podría estar llevando al desarrollo de estrés reductivo al reducir las ROS, el cual dará lugar a cambios redox y una mayor inflamación que, a su vez, también inducirían AP-1 y NF- κ B, promovándose la inducción de HO-1 y dando lugar a un circuito de retroalimentación que incrementaría aún más el estrés reductivo.

CAPÍTULO 3. EFECTO DE ITH13001 SOBRE LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES EN HIPERTENSIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, la hipertensión constituye un importante factor de riesgo cardiovascular con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. A pesar de que existen una gran variedad de abordajes terapéuticos para su tratamiento, únicamente el 30-35% de los pacientes tratados que padecen esta enfermedad siguen sin tenerla controlada

(Menéndez et al., 2016; Williams et al., 2018), haciéndose necesario continuar desarrollando fármacos que permitan controlar esta patología y reducir el daño causado en sus órganos diana.

En este capítulo evaluamos como posible tratamiento para la hipertensión el nuevo compuesto ITH13001, desarrollado como inductor de Nrf2 que, además, presenta propiedades antioxidantes independientes de dicha inducción y ha mostrado actividad antiinflamatoria en modelos de esclerosis múltiple (Michalska et al., 2017). Debido al carácter electrófilo de los inductores de Nrf2, ITH13001 podría presentar efectos hepatotóxicos; sin embargo, este compuesto se ha diseñado para evitar esta toxicidad y mejorar su perfil de seguridad, no habiendo mostrado en los estudios realizados toxicidad a nivel hepático ni tampoco a nivel neuronal (León et al., 2016).

Como ya se ha comentado, el estrés oxidativo tiene un importante papel en el desarrollo de las alteraciones que se producen en la patología hipertensiva, por lo que el uso de compuestos antioxidantes como tratamiento antihipertensivo ha generado un gran interés, habiéndose observado en estudios epidemiológicos que los individuos con una mayor ingesta de antioxidantes presentan un menor riesgo cardiovascular (Moran et al., 1993; Nawrot et al., 2006). Diversos compuestos antioxidantes, como la vitamina C, la vitamina E, el alopurinol, polifenoles o combinaciones de antioxidantes, que han sido probados como tratamiento antihipertensivo complementario, han mostrado efectos beneficiosos mejorando la función vascular (Kojšová et al., 2006; González et al., 2014; Siti et al., 2015). Así, estos compuestos han demostrado ser efectivos, principalmente en modelos experimentales de hipertensión preclínicos y en estudios clínicos pequeños; sin embargo, como se ha expuesto anteriormente, los resultados obtenidos al utilizar estos tratamientos en ensayos controlados a gran escala y a largo plazo han sido inconsistentes, no observándose mejora de la presión arterial u otros efectos beneficiosos en enfermedades cardiovasculares (González et al., 2014). Por otra parte, y como se ha visto anteriormente, se ha evaluado el efecto sobre la hipertensión y las alteraciones asociadas a ella de diferentes compuestos descritos como activadores de Nrf2, observándose, generalmente, efectos beneficiosos sobre la presión arterial tras la activación de este factor de transcripción con compuestos como bardoxolona (Cuevas et al., 2015), o sustancias naturales como cebada fermentada, brotes de brócoli o sulforafano (Wu et al., 2004; Senanayake et al., 2012; Shirakawa et al., 2015); sin embargo, hasta donde sabemos, los ensayos clínicos llevados a cabo con estos compuestos siguen siendo limitados, no existiendo pruebas de un fármaco inductor de Nrf2 totalmente eficaz para el tratamiento de la hipertensión (Tanase et al., 2022). Cabe destacar que muchos compuestos conocidos como antioxidantes ejercen su función mediante la inducción de Nrf2; tal es el caso de la vitamina E (Bozaykut et al., 2014), flavonoides como la diosmetina (Meeapat et al., 2021), polifenoles como el resveratrol (Javkhedkar et al., 2015), o el alopurinol (Luo et al., 2020), entre otros, por lo que en muchos casos al referirse a compuestos antioxidantes también se estaría refiriendo a inductores de Nrf2.

ITH13001 es un compuesto derivado de la melatonina y del ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrílico (León et al., 2016). La melatonina es la principal hormona liberada por la glándula pineal, cuya producción y secreción se regula por los ritmos circadianos, con su pico de secreción durante la noche y niveles más bajos durante el día, por lo que es ampliamente utilizada como suplemento endógeno frente a trastornos del sueño (Tan et al., 2015; Xie et al., 2017; Chitimus et al., 2020). Además de la glándula pineal, esta hormona se sintetiza en el corazón, el hígado, la placenta, la piel, el riñón o el intestino, entre otros tejidos, de manera que constituye un importante regulador de los procesos fisiológicos y del equilibrio homeostático del organismo

(Chitimus et al., 2020). Esta hormona posee, entre otros, efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos, ejerciendo una acción protectora en numerosos estudios en las áreas de neurología, cáncer o cardiología (Opie and Lecour, 2016). Por su parte, el ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrílico es un compuesto con actividad inductora de Nrf2 mediante la liberación de Nrf2 de su proteína represora Keap1, permitiendo así su traslocación al núcleo y los efectos antioxidantes y antiinflamatorios que ello conlleva (León et al., 2016). El compuesto ITH13001, resultante de la combinación de ambas moléculas, presenta ventajas claras con respecto a ellas al exhibir las actividades biológicas con el efecto terapéutico de sus precursores, de manera que actúa como inductor de Nrf2, efecto que no presenta la melatonina, y como antioxidante, con capacidad secuestradora de radicales, efecto que no posee el ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrílico. ITH13001, además, ha demostrado mejorar estos dos efectos con respecto a la combinación de sus precursores, de manera que supone una mejora significativa sobre ellos (León et al., 2016). Así, además de actuar como agonista de los receptores de melatonina MT1 y MT2, es un potente antioxidante, con mayor capacidad secuestradora de radicales libres que la melatonina (León et al., 2016). Dado el papel que tienen el estrés oxidativo y la inflamación en el desarrollo de la hipertensión, la combinación de la inducción de Nrf2 con las propiedades antioxidantes y los efectos antiinflamatorios presentes en ITH13001, resulta de gran interés la posibilidad de que este compuesto presente efectos beneficiosos en esta patología y las alteraciones cardiovasculares que con ella se asocian.

A la hora de evaluar el compuesto ITH13001 en hipertensión, en primer lugar, analizamos su efecto sobre la presión arterial, para lo que usamos el modelo *in vivo* de hipertensión inducida por la infusión de Ang II durante 14 días. El tratamiento con ITH13001 previno parcialmente el incremento en la presión arterial inducido por Ang II, sin afectar a la presión arterial de ratones control, lo que demuestra el efecto antihipertensivo de este compuesto. Como se ha comentado, es conocido el efecto beneficioso de otros activadores de Nrf2 sobre la presión arterial (Wu et al., 2004; Senanayake et al., 2012; Cuevas et al., 2015; Shirakawa et al., 2015). Por su parte, el precursor de ITH13001 melatonina también ha mostrado efectos antihipertensivos previamente, tanto en hipertensión experimental como clínica, estando este efecto mediado por su capacidad secuestradora de ROS, así como por la activación y sobreexpresión de enzimas antioxidantes; además, esta molécula también ejercería su papel sobre la presión arterial por sus efectos a nivel de SNC (Simko et al., 2009; Pechanova et al., 2014). Una vez confirmado el efecto antihipertensivo de ITH13001, analizamos sus efectos sobre las alteraciones causadas por la hipertensión en algunos de sus órganos diana, como son el corazón y los vasos sanguíneos, tanto de conductancia como de resistencia.

Como se ha mencionado anteriormente, la hipertrofia del ventrículo izquierdo supone una de las principales alteraciones asociadas a la cardiopatía hipertensiva, en la cual tienen lugar hipertrofia de los cardiomiocitos y fibrosis cardíaca (Susic and Frohlich, 2000). Como ya habíamos descrito en el capítulo anterior, tras la infusión de Ang II se observó hipertrofia del ventrículo izquierdo junto con un incremento en el área de los cardiomiocitos; además, estos ratones presentaron fibrosis cardíaca, con un aumento en los niveles de colágeno I y Bnp como marcadores de este parámetro, indicativo del desarrollo de esta cardiopatía hipertensiva. El tratamiento con ITH13001 mejoró el remodelado cardíaco, previniendo el desarrollo de hipertrofia del ventrículo izquierdo inducida por la infusión de Ang II, debido a que se prevenía el incremento del área de los cardiomiocitos; asimismo, este compuesto evitaba la aparición de fibrosis cardíaca, mostrando estos animales niveles más bajos tanto de colágeno tipo I como de Bnp.

A nivel vascular, evaluamos el remodelado tanto en aorta como en arterias mesentéricas de resistencia. En aorta, la infusión de Ang II dio lugar a remodelado con incremento en el espesor de la pared y en la relación media/luz, como ya habíamos observado en otros trabajos de nuestro laboratorio (Hernanz et al., 2015); sin embargo, en este tipo vascular el tratamiento con ITH13001 no modificó ninguno de estos parámetros. En el caso de las arterias mesentéricas de resistencia, Ang II provocó una reducción de los diámetros interno y externo, disminuyendo el calibre de estos vasos, además de aumentar el espesor de la pared y la relación media/luz, indicando la presencia de remodelado vascular eutrófico hacia adentro; además, se observó una reducción en el número de CMLV y de células endoteliales, como ya habíamos descrito previamente en este modelo de hipertensión (Briones et al., 2009; Hernanz et al., 2015). El tratamiento de estos ratones con ITH13001 no afectó a la relación media/luz ni al espesor de pared vascular; sin embargo, previno parcialmente la reducción del calibre arterial, pudiendo así mejorar la resistencia periférica y con ello, la presión arterial. Además, el tratamiento con ITH13001 evitó la reducción del número de células endoteliales inducida por Ang II, lo que ocasiona una mejora de la función endotelial, como se comentará más adelante. Cabe destacar el efecto observado en arterias mesentéricas de resistencia de animales control tratados con ITH13001, donde aumentó el número de células adventiciales, lo cual incrementó el grosor de esta capa y, por tanto, de la pared vascular; sin embargo, no conocemos la naturaleza del tipo o tipos celulares que se ven incrementados en esta capa tras el tratamiento, pudiendo tratarse de fibroblastos o células inmunes (Stenmark et al., 2013), ni las consecuencias que puede tener este efecto.

Además de producir alteraciones estructurales vasculares, la infusión de Ang II aumentó la rigidez de las arterias mesentéricas de resistencia y redujo la distensibilidad incremental; este hecho se asoció con una reducción en el número de fenestras de la lámina elástica interna vascular, tal y como nuestro grupo había descrito (Briones et al., 2003, 2009; Hernanz et al., 2015; Avendaño et al., 2018). El tratamiento con ITH13001 mejoró estos parámetros, evitando el desarrollo de rigidez vascular y la disminución de la distensibilidad incremental, probablemente como consecuencia de la prevención de la reducción en el número de fenestras. Esto reduce el incremento de la resistencia periférica observada en hipertensión y podría explicar, al menos en parte, el efecto antihipertensivo de ITH13001 en ratones infundidos con Ang II. En el caso de los animales control, el tratamiento con ITH13001 no alteró los parámetros mecánicos en este lecho vascular, lo que descartaría que el incremento en el número de células adventiciales en arterias mesentéricas de resistencia de estos animales tenga un efecto sobre estos parámetros.

En general podemos decir, por tanto, que, si bien el tratamiento con ITH13001 tiene efectos beneficiosos sobre el remodelado cardíaco en animales hipertensos, su papel sobre las alteraciones estructurales de la aorta asociadas al desarrollo de hipertensión no es tan notorio; sin embargo, los efectos observados en arterias mesentéricas de resistencia, como la prevención de la reducción del calibre vascular y de la pérdida de células endoteliales, así como del desarrollo de rigidez vascular inducidos por Ang II constituyen mecanismos de gran importancia en el control de la presión arterial (Rizzoni and Agabiti-Rosei, 2012). De acuerdo con estos resultados, otros compuestos antioxidantes y/o inductores de Nrf2 han mostrado efectos similares sobre el remodelado, tanto a nivel cardíaco como vascular; así, sulforafano, el análogo de bardoxolona dh404, resveratrol, la alicina o la N-acetilcisteína mejoran el remodelado y la fibrosis cardíacas, previniendo el incremento del área de los cardiomiocitos, así como de los niveles de colágeno en modelos animales de diferentes patologías cardiovasculares, como

hipertensión, constricción transversal de la aorta o aterosclerosis, entre otras (Lombardi et al., 2009; Li et al., 2012; Xing et al., 2012; Su et al., 2021; Fan et al., 2022); sin embargo, en ensayos clínicos realizados en pacientes con cardiopatía hipertrófica establecida, N-acetilcisteína no mostró efectos significativos sobre la hipertrofia y fibrosis cardíacas (Marian et al., 2018). A nivel vascular, compuestos como los polifenoles han mostrado un efecto beneficioso previniendo el remodelado (da Costa et al., 2012; Meeapat et al., 2021). En cuanto a la melatonina, también previene el desarrollo de fibrosis cardíaca, aunque no de hipertrofia, en ratas SHR (Simko et al., 2009, 2014); en vasos, este compuesto mejora el remodelado y las alteraciones estructurales, tanto en hipertensión como en otras situaciones, tales como el envejecimiento (Eşrefoğlu et al., 2011; Simko et al., 2014).

Como se ha discutido en capítulos previos de esta Tesis, la hipertensión produce también alteraciones en las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras, por lo que evaluamos el efecto de ITH13001 sobre ellas, tanto en vasos de conductancia como de resistencia de los ratones de nuestro modelo. En arterias mesentéricas de resistencia, la infusión de Ang II dio lugar al desarrollo de disfunción endotelial, sin observarse alteraciones en las respuestas contráctiles; el tratamiento con ITH13001, abolió la disfunción endotelial inducida por Ang II en este lecho vascular, lo cual podría relacionarse con la capacidad de este compuesto para prevenir la pérdida de células endoteliales. En el caso de la aorta, la infusión de Ang II indujo el incremento en las respuestas vasoconstrictoras y el desarrollo de disfunción endotelial, con reducción de la relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina, sin afectar a la relajación independiente de endotelio; estos resultados están en línea con lo descrito en hipertensión, tanto en humanos como en modelos experimentales (Perticone et al., 2001; De Batista et al., 2014; Konukoglu and Uzun, 2017; Meeapat et al., 2021); el tratamiento con ITH13001 de los ratones infundidos con Ang II, previno la reducción en las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina, así como el incremento las respuestas vasoconstrictoras. Con respecto a este último efecto, cabe destacar que el tratamiento con ITH13001 de animales control también provocó una reducción en las respuestas contráctiles con respecto a los controles no tratados. La contracción inducida por potasio y las relajaciones independientes de endotelio inducidas por DEA-NO no se vieron alteradas en ninguno de los grupos experimentales, descartándose, por tanto, un efecto del tratamiento con ITH13001 a nivel del músculo vascular. Como se ha comentado en otros capítulos, el endotelio tiene un papel importante, no solo mediando las respuestas vasodilatadoras, sino también afectando a la vasoconstricción, viéndose esta incrementada en situación de disfunción endotelial; los resultados obtenidos sugieren que el efecto vascular resultante del tratamiento con ITH13001 tiene lugar a nivel endotelial.

Otros antioxidantes y/o inductores de Nrf2 también han mostrado resultados favorables mejorando la disfunción endotelial en distintos modelos de hipertensión (Rocha et al., 2007; da Costa et al., 2012; González et al., 2014; Bielli et al., 2015; Siti et al., 2015; Meeapat et al., 2021). En este sentido, la vitamina C incrementa la síntesis y depósito de colágeno IV en la membrana basal de las células endoteliales estimulando la proliferación endotelial, inhibiendo la apoptosis, eliminando los radicales libres y preservando el NO derivado de estas células, lo que ayuda a regular el flujo sanguíneo (May and Harrison, 2013); por su parte, la vitamina E protege el endotelio de la inflamación (Ng et al., 2012), mostrando también la combinación de ambas vitaminas una mejora en los niveles de NO y la función endotelial (Heller et al., 2004; Plantinga et al., 2007). Otros compuestos como los polifenoles también han mostrado resultados beneficiosos; así, los derivados del aceite de oliva mejoran la función endotelial en pacientes

con disfunción endotelial aterosclerótica temprana y los polifenoles derivados de *Euterpe oleracea* Mart previenen la disfunción endotelial por sus efectos antioxidantes, la activación de eNOS y la inhibición de la activación de MMP-2 (Siti et al., 2015).

A la vista de los resultados obtenidos sobre la función vascular y dado el efecto vasodilatador observado para otros compuestos antioxidantes, entre ellos la melatonina (Kojšová et al., 2006; Perez-Vizcaino et al., 2006), evaluamos el efecto *in vitro* de ITH13001 en segmentos aórticos procedentes de ratones control mediante distintas aproximaciones, con el fin de determinar si los resultados que habíamos observado eran debidos a una acción ejercida por este compuesto directamente sobre el vaso. A este respecto, ITH13001 no ejerció un efecto vasodilatador *per se*, y tampoco modificó las respuestas vasculares inducidas por fenilefrina y acetilcolina. Ante la posibilidad de que esta ausencia de efecto pudiera deberse a un tiempo demasiado corto de incubación con ITH13001, llevamos a cabo una tercera aproximación, donde incrementamos el tiempo de incubación con ITH13001 desde 1 a 24 horas; además, añadimos una situación en la que incubamos algunos de los segmentos con Ang II. En estos experimentos observamos que la incubación *ex vivo* de segmentos aórticos con ITH13001 durante 24 horas tampoco alteró las respuestas vasculares. En los segmentos aórticos procedentes de ratones control incubados con Ang II durante 24 horas se observan las alteraciones funcionales vasculares características de la hipertensión, con respuestas vasoconstrictoras a fenilefrina incrementadas y disfunción endotelial, de forma similar a lo que nuestro grupo había descrito (Martínez-Revelles et al., 2013); la incubación con ITH13001 no modificó ninguna de estas respuestas. Estos resultados sugieren que los efectos de mejora de la función vascular observados en el modelo animal de infusión de Ang II durante 14 días no se deben a un efecto directo del compuesto sobre la función vascular, sino que podrían implicar mecanismos más complejos, relacionados con su actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Dada la importante implicación de los procesos inflamatorios y oxidativos en la patología hipertensiva y los resultados descritos hasta ahora, analizamos si el efecto de ITH13001 sobre estos mecanismos contribuye a la mejora de las alteraciones cardiovasculares. Para estudiar el efecto del tratamiento con ITH13001 sobre el estrés oxidativo, comenzamos evaluando los niveles plasmáticos de malondialdehído. El incremento del estrés oxidativo plasmático observado tras la infusión con Ang II se previno con el tratamiento con ITH13001, del mismo modo que se había observado con otros compuestos antioxidantes/inductores de Nrf2 (Meephat et al., 2021). Además, estudiamos el efecto de este compuesto sobre parámetros de estrés oxidativo a nivel cardíaco. Así, medimos los niveles del ARNm de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa Nox1 y Nox2, la actividad de esta enzima y los niveles de $O_2^{\cdot-}$. Los resultados obtenidos muestran que la infusión de Ang II incrementa todos estos parámetros, lo que corrobora la presencia de estrés oxidativo cardíaco; el incremento en todos ellos se previno con el tratamiento con ITH13001. Estos resultados confirman las propiedades antioxidantes de ITH13001, y puede explicar los efectos beneficiosos observados sobre el remodelado y la hipertrofia cardíaca, donde el estrés oxidativo tiene un importante papel, como se ha descrito en capítulos anteriores (Touyz et al., 2003; Tsutsui et al., 2011; García-Redondo et al., 2016; Griendling et al., 2021).

La contribución del estrés oxidativo a la disfunción endotelial observada en aorta de ratones infundidos con Ang II fue confirmada utilizando tres compuestos antioxidantes, el inhibidor de Nox1 ML-171, el barredor de $O_2^{\cdot-}$ Tirón y el antioxidante dirigido a mitocondrias Mito-TEMPO; así, los tres compuestos mejoraron la relajación dependiente de endotelio inducida por

acetilcolina, sin afectar a la relajación en animales control. Sin embargo, en aorta procedente de ratones infundidos con Ang II y tratados con ITH13001, estos fármacos antioxidantes no modificaron la vasodilatación inducida por acetilcolina. Estos resultados sugieren que la mejora de la disfunción endotelial observada tras el tratamiento con ITH13001 se debe, al menos en parte, a la reducción del estrés oxidativo resultante de la actividad de Nox1 y de las mitocondrias, lo que apoya, además, los resultados obtenidos en ventrículo izquierdo. En cuanto a los animales control tratados con ITH13001, ninguno de estos compuestos alteró las respuestas vasodilatadoras.

Puesto que es conocido que uno de los mecanismos por los que el estrés oxidativo contribuye a la disfunción endotelial en hipertensión es la reducción en la biodisponibilidad de NO (Deanfield et al., 2007; Konukoglu and Uzun, 2017), comprobamos si la reducción del estrés oxidativo causada por ITH13001 era capaz de restaurar los niveles de NO a nivel vascular. Para ello, evaluamos la producción de NO en aorta utilizando, por un lado, la sonda fluorescente 4, 5-diaminofluoresceína (DAF-2) y, por otro lado, un kit colorimétrico para la detección de nitritos, producto final de la autooxidación del NO en solución acuosa, y cuya concentración es proporcional a la cantidad de NO. Los resultados de estas dos medidas confirmaron una reducción en los niveles de NO aórtico tras la infusión de Ang II, que se restablecieron tras el tratamiento de los ratones con ITH13001. Además, evaluamos la participación del NO en las respuestas contráctiles a fenilefrina en este lecho vascular. El menor desplazamiento de la curva concentración-respuesta a fenilefrina en presencia de L-NAME y la menor diferencia del área bajo la curva en presencia y ausencia de L-NAME que se observa en aortas de ratones infundidos con Ang II indican una reducción de la participación del NO en las respuestas contráctiles, lo que confirma la menor biodisponibilidad de NO, como ha sido descrito por investigadores de nuestro grupo, y otros, en la patología hipertensiva (Martínez-Revelles et al., 2013; Hernanz et al., 2015). Por su parte, el tratamiento de estos animales con ITH13001 aumentó la biodisponibilidad de NO, incrementando su participación en la contracción, confirmando así, los resultados obtenidos en los anteriores experimentos de medida de NO. Cabe destacar que el tratamiento con ITH13001 mostró una tendencia a incrementar la biodisponibilidad de NO en los animales control, lo que podría explicar la reducción de la contracción inducida por fenilefrina en aorta de estos animales.

Como se ha comentado anteriormente, otros compuestos con actividad antioxidante y/o inductora de Nrf2 previenen del desarrollo de disfunción endotelial, en muchos casos mediante la reducción del estrés oxidativo, que está acompañada de unos mayores niveles de NO (Heller et al., 2004; Kojšová et al., 2006; Plantinga et al., 2007; Ungvari et al., 2010; Siti et al., 2015). Así, algunos flavonoides inducen la activación de eNOS, incrementando los niveles de NO, al aumentar los niveles de Ca^{2+} en las células endoteliales; además, la eliminación de ROS protege al NO, aumentando su vida media y su actividad biológica (Perez-Vizcaino et al., 2006); otros compuestos antioxidantes, como la N-acetilcisteína, también han mostrado este efecto activando e incrementando los niveles proteicos de eNOS, además de reducir los niveles de ROS, aumentando, por tanto, los niveles de NO (Kojšová et al., 2006). En el caso del precursor de ITH13001 melatonina, también se ha observado una mayor actividad de la NOS en corazón y riñón y los niveles de NO; sin embargo, la melatonina no es capaz de inducir la expresión proteica de eNOS y, del mismo modo que la N-acetilcisteína, tampoco la de iNOS; en ese caso, su efecto en la prevención del desarrollo de hipertensión se debe a una mayor reducción de ROS, probablemente, junto con los efectos directos sobre la actividad de NOS (Kojšová et al., 2006).

Estudios previos han demostrado que ITH13001, además de efectos antioxidantes, posee efectos antiinflamatorios (Michalska et al., 2017), del mismo modo que otros compuestos antioxidantes y/o inductores de Nrf2, entre ellos la melatonina (Perez-Vizcaino and Duarte, 2010; Ng et al., 2012; Bai et al., 2017; Chitimus et al., 2020; Niu et al., 2022). Dentro del proceso inflamatorio que ocurre en la patología hipertensiva, además de la liberación de citoquinas por parte de las células inmunes infiltrada en los tejidos (Savoia and Schiffrin, 2007; Norlander et al., 2018), tiene lugar la activación del inflamasoma, un complejo proteico inductor de respuestas inflamatorias con un importante papel en la inmunidad (Garstkiewicz et al., 2017). En este trabajo tiene especial relevancia el inflamasoma NLRP3, puesto que se ha relacionado con la hipertensión, además de otras enfermedades cardiovasculares, siendo un potencial biomarcador y diana terapéutica en estados tempranos de la patología hipertensiva (De Miguel et al., 2015); además, se ha descrito un bloqueo de su activación con compuestos activadores de Nrf2 (Garstkiewicz et al., 2017; Hennig et al., 2018). La activación de NLRP3 conduce al procesamiento de la pro-IL-1 β , liberándose IL-1 β (Garstkiewicz et al., 2017), la cual, a su vez, puede activar la forma inducible de la NO sintasa, iNOS, otra enzima proinflamatoria que juega un importante papel en la hipertensión (Konukoglu and Uzun, 2017). Otro mecanismo inflamatorio que participa en la hipertensión es TLR4 (Hernanz et al., 2015), el cual, además de expresarse en células inmunes, se expresa en las células del sistema cardiovascular (Bomfim et al., 2012; De Batista et al., 2014). La respuesta inflamatoria inducida por TLR4 se produce, principalmente, utilizando MyD88 como proteína adaptadora, lo que conduce finalmente a una activación de NF- κ B (Biancardi et al., 2017). Por todo ello, pensamos que sería de gran interés evaluar el efecto de ITH13001 sobre parámetros inflamatorios en los ratones infundidos con Ang II. Los niveles cardíacos y vasculares de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, Mcp-1 y TNF α , del marcador de células T Cd3 y de la enzima proinflamatoria COX-2, así como la expresión proteica del inflamasoma NLRP3, iNOS, MyD88 y la subunidad de NF- κ B p65 fueron mayores en ratones infundidos con Ang II. Confirmamos el efecto antiinflamatorio del tratamiento con ITH13001, con una reducción en los niveles tanto génicos como proteicos de dichos marcadores en ambos tejidos.

Como se ha visto en capítulos anteriores de esta Tesis y ha sido descrito por otros investigadores, los macrófagos juegan un importante papel en el desarrollo de la hipertensión y las alteraciones asociadas a esta patología (De Ciuceis et al., 2005; Ko et al., 2007; Wenzel et al., 2011; Kossmann et al., 2014), existiendo una relación entre la infusión de Ang II, la polarización de estas células inmunes hacia su fenotipo M1 o proinflamatorio y su infiltración en el PVAT (Harwani, 2018; Olivencia et al., 2021). Esta infiltración de macrófagos M1 está implicada en las alteraciones cardiovasculares que tienen lugar en hipertensión, afectando a la producción de ROS y citoquinas inflamatorias, además de a los niveles de NO, de gran importancia en el desarrollo de disfunción endotelial (DeGeorge et al., 1997; Gomolak and Didion, 2014). Además, el ratio entre los dos principales fenotipos de los macrófagos, M1/M2, tiene un papel importante en la patología hipertensiva, habiéndose observado una reducción en los marcadores de macrófagos antiinflamatorios M2 en ratas hipertensas; la inducción de estos marcadores por compuestos como la hemina, se asocia con reducción de la presión arterial (Ndisang and Mishra, 2013). De acuerdo con ello, los macrófagos peritoneales procedentes de los animales infundidos con Ang II mostraron niveles incrementados del marcador M1 IL-1 β , al tiempo que presentaban niveles menores de los marcadores del fenotipo M2 Cd163, Arg1 e IL-10; el tratamiento con ITH13001 abolió tanto el aumento de IL-1 β como la reducción de los marcadores antiinflamatorios. Estos resultados sugieren que la prevención de la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 puede contribuir a los efectos antiinflamatorios de este compuesto, participando así en su

efecto sobre los parámetros inflamatorios en ventrículo y aorta, así como en las distintas alteraciones estructurales, mecánicas y funcionales.

Ya se ha comentado que en la síntesis del compuesto ITH13001 se buscaba combinar el efecto antioxidante de la melatonina con el efecto inductor de Nrf2 del ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrílico, sus precursores. Los resultados anteriores han demostrado el efecto antioxidante de este compuesto, por lo que quisimos evaluar si los efectos observados en nuestro modelo tenían lugar, además, de manera dependiente de la activación de Nrf2. En primer lugar, confirmamos que ITH13001 es un inductor de Nrf2 en CMLV. Así, la estimulación con ITH13001 durante 24 horas incrementó la expresión de Nrf2 en extractos nucleares de CMLV de la línea celular MOVAS. Este incremento en los niveles nucleares de Nrf2 sugiere que ITH13001 estaría llevando a la liberación de Nrf2 de su represor Keap1, como ha sido descrito por León et al. (2016), lo que permitiría su traslocación al núcleo, donde activaría sus genes diana. Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis en esta línea celular de la expresión, tanto génica como proteica, de una de sus enzimas diana, HO-1, cuyos niveles aumentaron tras la estimulación con ITH13001.

Una vez confirmada la actividad inductora de Nrf2 de ITH13001 en células vasculares, medimos la expresión de Nrf2 y de HO-1 y NQO1, otra de sus enzimas diana, en ventrículo izquierdo y aorta de los animales de nuestro modelo experimental. Como se ha visto ampliamente a lo largo de este trabajo, Ang II induce una situación inflamatoria y prooxidante, por lo que cabría esperar una inducción de Nrf2, como se había observado previamente en diversos tejidos en este y otros modelos de hipertensión (Li et al., 2011, 2012; Gómez-Guzmán et al., 2012; Brand et al., 2014); Sin embargo, en corazón y aorta de ratones infundidos con Ang II se observó una tendencia a la reducción de la expresión de Nrf2, sin que se modificaran los niveles de sus enzimas diana con respecto a los animales control, descartando la activación de esta vía, de forma similar a lo descrito en otros estudios a nivel cardíaco (Su et al., 2021) o en células renales, donde, de hecho, Ang II reduce la expresión de Nrf2 (Xiong et al., 2018); estos efectos podrían deberse a la activación de factores inhibidores o a un deterioro de la función de Nrf2 en la hipertensión, como ha sido descrito por Lopes et al. (2015). El tratamiento con ITH13001, sorprendentemente, no incrementó la expresión de Nrf2 ni de sus enzimas diana HO-1 y NQO1 a nivel cardíaco ni vascular. Estos resultados sugieren que, si bien este compuesto presenta actividad inductora de Nrf2, los efectos protectores observados con este tratamiento en este modelo de hipertensión podrían no ser debidos a dicha actividad, sino, más probablemente, a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias independientes de la activación de este factor de transcripción.

En resumen, en este capítulo hemos evaluado ITH13001, un nuevo compuesto derivado de melatonina, como posible tratamiento para la hipertensión en un modelo de hipertensión inducida por Ang II. Este compuesto previene parcialmente el desarrollo de hipertensión, con efectos beneficiosos tanto a nivel cardíaco como vascular. Así, hemos observado que reduce el desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardíacas inducidas por Ang II, además de la rigidez vascular. Por otro lado, ITH13001 también mejora la función endotelial vascular, incrementando la biodisponibilidad de NO y previniendo de la pérdida de células endoteliales. Estos efectos están asociados a una reducción del estrés oxidativo, tanto a nivel sistémico como cardíaco y vascular. Por otro lado, el tratamiento con ITH13001 previene la inflamación cardíaca y vascular inducida por Ang II. Nuestros estudios indican, además, que las mejoras cardiovasculares causadas por ITH13001 no estarían mediadas por su capacidad inductora de Nrf2, sino por sus efectos

antioxidantes y antiinflamatorios. En este estudio solo se han analizado los efectos de ITH13001 a nivel cardiaco y vascular, no pudiendo descartarse su efecto sobre otros órganos diana importantes en el desarrollo de hipertensión. En este sentido, se ha descrito que diversas citoquinas inflamatorias liberadas a nivel renal participan en la activación del SRA y en la regulación del transporte de sodio, incrementando la reabsorción de este ion, favoreciendo así el incremento de la presión arterial en hipertensión (Norlander and Madhur, 2017; Wenzel et al., 2019). Por tanto, la reducción de la inflamación renal por ITH13001 podría estar implicada en su efecto antihipertensivo.

Como se ha mencionado previamente, los estudios llevados a cabo con compuestos antioxidantes, muchos de ellos inductores de Nrf2, en modelos experimentales han mostrado resultados positivos, aunque en estudios clínicos y a largo plazo han mostrado resultados inconsistentes, barajándose la posibilidad de que estos compuestos tengan efectos distintos en las diferentes etapas de la enfermedad; así, por ejemplo, la suplementación con antioxidantes podría tener un papel beneficioso durante las primeras fases de la hipertensión, no teniendo efecto antihipertensivo en pacientes con un estado avanzado de la enfermedad (González et al., 2014). Aunque nuestro estudio se ha llevado a cabo en un modelo experimental con un tratamiento corto, de prevención de las alteraciones que tienen lugar en hipertensión y no como tratamiento de una patología establecida, los resultados positivos obtenidos tras el tratamiento con ITH13001 en todos los parámetros estudiados abren la posibilidad a la realización de otros estudios que permitan confirmar estos efectos a largo plazo y en otros modelos de hipertensión; la combinación de las propiedades antioxidantes con un claro efecto antiinflamatorio que presenta este compuesto puede ser un factor importante a la hora de elegirlo como tratamiento antihipertensivo, dado el papel clave de la inflamación en el desarrollo de las alteraciones que tienen lugar en esta patología. El uso de ITH13001, además, podría ayudar en el tratamiento de pacientes con hipertensión resistente que, por presentar otras patologías concomitantes, tengan que tomar antiinflamatorios, ya que el uso de los principales fármacos de este tipo, los antiinflamatorios no esteroideos, ha demostrado tener efectos perjudiciales incrementando la presión arterial y el riesgo cardiovascular (Zheng and Du, 2014), debiendo evitarse su uso en pacientes con hipertensión resistente y alto riesgo de enfermedad cardiovascular (Szeto et al., 2020). Así, ITH13001 no solo actuaría frente a la inflamación que se produce en la hipertensión, sino que, además, podría evitar a los pacientes tomar otros medicamentos que pudieran resultar perjudiciales a nivel cardiovascular. Del mismo modo, la melatonina, por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias ha llevado a resultados prometedores tanto en modelos animales como en pacientes de hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (Kojšová et al., 2006; Simko et al., 2009, 2014; Chitimus et al., 2020; Tobeiha et al., 2022), habiendo mostrado en la mayor parte de los estudios en pacientes únicamente efectos secundarios leves como mareo, dolor de cabeza, náuseas o somnolencia y habiéndose registrado pocas o ninguna reacción adversa tras su administración a largo plazo (Chitimus et al., 2020). Sin embargo, hasta ahora existen pocos datos de ensayos clínicos con este compuesto como tratamiento antihipertensivo, habiéndose observado, como única limitación hasta la fecha, un incremento en la presión arterial al combinar la melatonina con antihipertensivos bloqueadores de canales de calcio como nifedipino (Lusardi et al., 2000), por lo que, a la hora de administrar melatonina a pacientes hipertensos, habría que tener en cuenta el tratamiento que éstos reciben.

Como se ha mencionado, ITH13001 supone una mejora significativa con respecto a las propiedades de sus precursores, la melatonina y el ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrílico, en estudios *in vitro* (León et al., 2016). Sin embargo, a pesar de los resultados prometedores

obtenidos en este estudio, existen algunas limitaciones al mismo: 1) Aunque el tratamiento con ITH13001 mejoró el estrés oxidativo y la inflamación cardíaca y vascular en ratones infundidos con Ang II, la presión arterial siguió siendo significativamente mayor que la de los ratones control. Esto no es sorprendente, ya que la hipertensión es una enfermedad multifactorial donde otros órganos, a través de una plétora de mecanismos, también contribuyen significativamente al desarrollo y mantenimiento de la presión arterial alta a largo plazo; 2) se trata de un estudio relativamente corto en el que ITH13001 se ha administrado al mismo tiempo que Ang II, limitando su aplicación clínica; por ello, serían necesarios estudios en los que el compuesto se administrara como tratamiento de la patología ya establecida, con el fin de evaluar no solo los efectos preventivos del desarrollo de hipertensión y las alteraciones cardiovasculares asociadas, sino también sus efectos curativos del compuesto; 3) hemos observado algunos efectos del tratamiento con ITH13001 en animales control, con un incremento en el número de células y el grosor de la capa adventicia vascular y una reducción en las respuestas contráctiles; aunque estos efectos no parecen causar perjuicios en estos animales, se requiere de más experimentos para dilucidar las causas que llevan a ellos.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Papel de los canales Kv1.3 en la hipertensión

1. La hipertensión aumenta la expresión de Kv1.3 en aorta, PVAT y macrófagos peritoneales. Estos canales participan en la disfunción endotelial, pero no en el remodelado y la rigidez vascular característicos de la hipertensión, lo que podría explicar que tampoco estén implicados en el desarrollo de hipertensión.
2. Los canales Kv1.3 participan en la infiltración de macrófagos en la pared vascular y su polarización hacia un fenotipo proinflamatorio M1 en respuesta a Ang II, así como en la producción por estos de productos derivados de la COX-2 y de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β . Mediante este mecanismo, los canales Kv1.3 contribuyen a la disfunción endotelial en hipertensión.

En resumen, este estudio identifica los canales Kv1.3 como nuevos mediadores de la disfunción endotelial dependiente de macrófagos en la hipertensión. Los bloqueadores de Kv1.3 son candidatos potenciales para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Papel de Nrf2 en la hipertensión

3. En animales normotensos, la deleción de Nrf2 induce inflamación a nivel cardíaco, aunque no es suficiente para alterar la estructura del ventrículo izquierdo.
4. En aorta de animales normotensos, la reducción de la expresión de HO-1 como consecuencia de la deleción de Nrf2 puede estar implicada en el aumento del estrés oxidativo que, asociado a la reducida biodisponibilidad de NO, induce disfunción endotelial.
5. La deleción de Nrf2 no afecta al desarrollo de hipertensión inducido por Ang II.
6. En animales hipertensos, en ausencia de Nrf2 se activa un mecanismo compensatorio que, si bien no modifica la inflamación, aumenta la expresión de HO-1, la cual puede estar implicada en la reducción del estrés oxidativo. Este mecanismo previene el desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardíacas, así como la disfunción endotelial en aorta mediante el aumento de la biodisponibilidad de NO.
7. Aunque la deleción de Nrf2 previene el remodelado y la rigidez vascular en arterias de resistencia, no evita la pérdida de células endoteliales ni la disfunción endotelial inducidas por Ang II, lo que puede explicar que tampoco modifique el desarrollo de hipertensión.

En resumen, la deleción de Nrf2 no modifica el desarrollo de hipertensión ni la inflamación observada en esta patología; sin embargo, activa HO-1 como mecanismo compensatorio, que reduce el estrés oxidativo, previniendo así alteraciones cardiovasculares tales como la hipertrofia y la fibrosis cardíacas o la disfunción endotelial.

Efecto de ITH13001 en la hipertensión

8. El tratamiento con ITH13001 tiene efecto antihipertensivo, que se asocia a la prevención de la hipertrofia y fibrosis cardiaca, así como de la rigidez vascular y la disfunción endotelial inducidas por Ang II.
9. El tratamiento con ITH13001 posee efectos antioxidantes a nivel cardíaco y vascular en hipertensión. La reducción del estrés oxidativo, y el consecuente aumento en la biodisponibilidad de NO, contribuye a la mejora de la función endotelial.
10. El tratamiento con ITH13001 tiene efecto antiinflamatorio a nivel cardíaco y vascular en hipertensión. Además, este tratamiento evita la polarización de los macrófagos peritoneales hacia el fenotipo proinflamatorio M1, favoreciendo su polarización hacia el fenotipo antiinflamatorio M2.
11. Aunque ITH13001 activa Nrf2 en CMLV, este factor de transcripción no se encuentra activado ni a nivel cardíaco ni vascular en animales hipertensos tratados con este compuesto. Por tanto, los efectos cardiovasculares beneficiosos observados tras el tratamiento con ITH13001 se deben a su actividad antioxidante y antiinflamatoria, siendo independientes de la activación de Nrf2.

En resumen, debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, ITH13001 reduce la presión arterial y previene alteraciones cardiovasculares en hipertensión, tales como la hipertrofia y la fibrosis cardiaca, la rigidez vascular y la disfunción endotelial asociadas a esta patología. Por todo ello, este compuesto se postula como un buen candidato para el tratamiento de hipertensión.

CONCLUSIONS

Role of K_v1.3 channels in hypertension

1. Hypertension increases K_v1.3 expression in aorta, PVAT and peritoneal macrophages. These channels participate in endothelial dysfunction, but not in the vascular remodeling and stiffness characteristic of hypertension; this might explain why they do not contribute to the hypertension development.
2. K_v1.3 channels participate in the infiltration of macrophages into the vascular wall and their polarization towards a proinflammatory M1 phenotype in response to Ang II; additionally, they contribute to the production by these immune cells of COX-2-derived products and proinflammatory cytokines, such as IL-1 β . Through this mechanism, K_v1.3 channels play a role in endothelial dysfunction in hypertension.

In summary, this study identifies K_v1.3 channels as novel mediators of macrophage-dependent endothelial dysfunction in hypertension. K_v1.3 blockers are potential candidates for the treatment of cardiovascular diseases.

Role of Nrf2 in hypertension

3. In normotensive animals, deletion of Nrf2 induces cardiac inflammation, although it is insufficient to alter the left ventricle structure.
4. In aorta of normotensive animals, reduction of HO-1 as a consequence of Nrf2 deletion might be involved in the increased oxidative stress, which associated to reduction of NO bioavailability, leads to vascular endothelial dysfunction.
5. Nrf2 deletion does not affect the development of Ang II-induced hypertension.
6. In hypertensive animals, in the absence of Nrf2 a compensatory mechanism is induced. This mechanism, although does not modify inflammation, increases HO-1 expression, which may be involved in oxidative stress reduction. All of these prevent cardiac hypertrophy and fibrosis as well as aortic endothelial dysfunction, as a result of NO bioavailability increase.
7. In resistance arteries, although deletion of Nrf2 prevents vascular remodeling and stiffness, it does avoid neither endothelial cell loss nor Ang II-induced endothelial dysfunction. This might explain the lack of effect on hypertension development.

In summary, deletion of Nrf2 does not modify either hypertension development or the inflammation; however, it activates HO-1 as a compensatory mechanism, which reduces oxidative stress, thus preventing cardiovascular alterations, such as cardiac hypertrophy and fibrosis or endothelial dysfunction that occur in this pathology.

Effect of ITH13001 on hypertension

8. Treatment with ITH13001 has antihypertensive effect, which is associated to the prevention of cardiac hypertrophy and fibrosis, as well vascular stiffness and endothelial dysfunction induced by Ang II.
9. Treatment with ITH13001 has cardiac and vascular antioxidant in hypertension. Reduction of oxidative stress and the consequent increase in NO bioavailability contribute to improve endothelial function.
10. Treatment with ITH13001 has cardiac and vascular anti-inflammatory effects in hypertension. In addition, this treatment avoids the peritoneal macrophages polarization towards the proinflammatory M1 phenotype, favoring their polarization towards the anti-inflammatory M2 phenotype.
11. ITH13001, although activates Nrf2 in VSMC; however, this transcription factor is not activated in heart and vasculature of hypertensive animals treated with this compound. Therefore, the beneficial cardiovascular effects observed after ITH13001 treatment is due to its antioxidant and anti-inflammatory activities, being independent of Nrf2 activation.

In summary, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, ITH13001 reduces blood pressure and prevents the cardiovascular alterations that occur in hypertension, such as cardiac hypertrophy and fibrosis, vascular stiffness and endothelial dysfunction. For these, ITH13001 is postulated as a good candidate for hypertension treatment.

BIBLIOGRAFÍA

- Adeagbo, A. S., Zhang, X., Patel, D., Joshua, I. G., Wang, Y., Sun, X., et al. (2005). Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J. Hypertens.* 23, 1025–1036. doi:10.1097/01.hjh.0000166844.42227.5c.
- Agarwal, D., Haque, M., Sriramula, S., Mariappan, N., Pariaut, R., and Francis, J. (2009). Role of Proinflammatory Cytokines and Redox Homeostasis in Exercise-Induced Delayed Progression of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 54, 1393–1400. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.135459.
- Aguado, A., Rodríguez, C., Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., Zhenyukh, O., Orriols, M., et al. (2015). HuR mediates the synergistic effects of angiotensin II and IL-1 β on vascular COX-2 expression and cell migration. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3028–3042. doi:10.1111/bph.13103.
- Ahmad, A. (2013). The Role of the Endogenous Antioxidant Enzymes and Malondialdehyde in Essential Hypertension. *J. Clin. diagnostic Res.* 7, 987–990. doi:10.7860/JCDR/2013/5829.3091.
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., and Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- Aizawa, T., Ishizaka, N., Taguchi, J., Nagai, R., Mori, I., Tang, S.-S., et al. (2000). Heme Oxygenase-1 Is Upregulated in the Kidney of Angiotensin II-Induced Hypertensive Rats. *Hypertension* 35, 800–806. doi:10.1161/01.HYP.35.3.800.
- Alam, J., and Cook, J. L. (2007). How Many Transcription Factors Does It Take to Turn On the Heme Oxygenase-1 Gene? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36, 166–174. doi:10.1165/rcmb.2006-0340TR.
- Aleksunes, L. M., Reisman, S. A., Yeager, R. L., Goedken, M. J., and Klaassen, C. D. (2010). Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Deletion Impairs Glucose Tolerance and Exacerbates Hyperglycemia in Type 1 Diabetic Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 140–151. doi:10.1124/jpet.109.162271.
- Alvarez, Y., Briones, A. M., Balfagón, G., Alonso, M. J., and Salaices, M. (2005). Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J. Hypertens.* 23, 767–777. doi:10.1097/01.hjh.0000163145.12707.63.
- Álvarez, Y., Briones, A. M., Hernanz, R., Pérez-Girón, J. V., Alonso, M. J., and Salaices, M. (2008). Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 153, 926–935. doi:10.1038/sj.bjp.0707575.
- Álvarez, Y., Pérez-Girón, J. V., Hernanz, R., Briones, A. M., García-Redondo, A., Beltrán, A., et al. (2007). Losartan Reduces the Increased Participation of Cyclooxygenase-2-Derived Products in Vascular Responses of Hypertensive Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 381–388. doi:10.1124/jpet.106.115287.
- Aminzadeh, M. A., Reisman, S. A., Vaziri, N. D., Khazaeli, M., Yuan, J., and Meyer, C. J. (2014). The synthetic triterpenoid RTA dh404 (CDDO-dhTFEA) restores Nrf2 activity and attenuates oxidative stress, inflammation, and fibrosis in rats with chronic kidney disease. *Xenobiotica* 44, 570–578. doi:10.3109/00498254.2013.852705.
- Angulo, J., El Assar, M., Sevilleja-Ortiz, A., Fernández, A., Sánchez-Ferrer, A., Romero-Otero, J.,

- et al. (2019). Short-term pharmacological activation of Nrf2 ameliorates vascular dysfunction in aged rats and in pathological human vasculature. A potential target for therapeutic intervention. *Redox Biol.* 26, 101271. doi:10.1016/j.redox.2019.101271.
- Ashino, T., Yamamoto, M., and Numazawa, S. (2016). Nrf2/Keap1 system regulates vascular smooth muscle cell apoptosis for vascular homeostasis: role in neointimal formation after vascular injury. *Sci. Rep.* 6, 26291. doi:10.1038/srep26291.
- Avendaño, M. S., García-Redondo, A. B., Zalba, G., González-Amor, M., Aguado, A., Martínez-Revelles, S., et al. (2018). mPGES-1 (Microsomal Prostaglandin E Synthase-1) Mediates Vascular Dysfunction in Hypertension Through Oxidative Stress. *Hypertension* 72, 492–502. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10833.
- Avendaño, M. S., Martínez-Revelles, S., Aguado, A., Simões, M. R., González-Amor, M., Palacios, R., et al. (2016). Role of COX-2-derived PGE 2 on vascular stiffness and function in hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 173, 1541–1555. doi:10.1111/bph.13457.
- Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Müller, D. N., Luft, F. C., and Ganten, D. (2001). Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J. Mol. Med.* 79, 76–102. doi:10.1007/s001090100210.
- Bai, J., Yu, X.-J., Liu, K.-L., Wang, F.-F., Li, H.-B., Shi, X.-L., et al. (2017). Tert-butylhydroquinone attenuates oxidative stress and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus in high salt-induced hypertension. *Toxicol. Lett.* 281, 1–9. doi:10.1016/j.toxlet.2017.08.018.
- Bakker, E. N. T. P., van der Meulen, E. T., van den Berg, B. M., Everts, V., Spaan, J. A. E., and VanBavel, E. (2002). Inward Remodeling Follows Chronic Vasoconstriction in Isolated Resistance Arteries. *J. Vasc. Res.* 39, 12–20. doi:10.1159/000048989.
- Banday, A. A., and Lokhandwala, M. F. (2013). Transcription Factor Nrf2 Protects Renal Dopamine D1 Receptor Function During Oxidative Stress. *Hypertension* 62, 512–517. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01358.
- Bavishi, C., Bangalore, S., and Messerli, F. H. (2016). Renin Angiotensin Aldosterone System Inhibitors in Hypertension: Is There Evidence for Benefit Independent of Blood Pressure Reduction? *Prog. Cardiovasc. Dis.* 59, 253–261. doi:10.1016/j.pcad.2016.10.002.
- Bayo Jimenez, M. T., Frenis, K., Kröller-Schön, S., Kuntic, M., Stamm, P., Kvandová, M., et al. (2021). Noise-Induced Vascular Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation Are Improved by Pharmacological Modulation of the NRF2/HO-1 Axis. *Antioxidants* 10, 625. doi:10.3390/antiox10040625.
- Beeton, C., Barbaria, J., Giraud, P., Devaux, J., Benoliel, A.-M., Gola, M., et al. (2001a). Selective Blocking of Voltage-Gated K⁺ Channels Improves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Inhibits T Cell Activation. *J. Immunol.* 166, 936–944. doi:10.4049/jimmunol.166.2.936.
- Beeton, C., Pennington, M. W., Wulff, H., Singh, S., Nugent, D., Crossley, G., et al. (2005). Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases. *Mol. Pharmacol.* 67, 1369–1381. doi:10.1124/mol.104.008193.
- Beeton, C., Wulff, H., Barbaria, J., Clot-Faybesse, O., Pennington, M., Bernard, D., et al. (2001b). Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune

- encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13942–13947. doi:10.1073/pnas.241497298.
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., and Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 721–733. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.
- Beltrán, A. E., Briones, A. M., García-Redondo, A. B., Rodríguez, C., Miguel, M., Álvarez, Y., et al. (2009). p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.* 27, 142–154. doi:10.1097/HJH.0b013e328317a730.
- Bhatt, S. R., Lokhandwala, M. F., and Banday, A. A. (2014). Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. *Clin. Exp. Hypertens.* 36, 367–373. doi:10.3109/10641963.2014.943402.
- Biancardi, V. C., Bomfim, G. F., Reis, W. L., Al-Gassimi, S., and Nunes, K. P. (2017). The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmacol. Res.* 120, 88–96. doi:10.1016/j.phrs.2017.03.017.
- Bielli, A., Scioli, M. G., Mazzaglia, D., Doldo, E., and Orlandi, A. (2015). Antioxidants and vascular health. *Life Sci.* 143, 209–216. doi:10.1016/j.lfs.2015.11.012.
- Bobí, J., Garabito, M., Solanes, Nú., Ciudad, P., Ramos-Pérez, V., Ponce, A., et al. (2020). Kv1.3 blockade inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells in vitro and intimal hyperplasia in vivo. *Transl. Res.* 224, 40–54. doi:10.1016/j.trsl.2020.06.002.
- Böhm, F., Settergren, M., and Pernow, J. (2007). Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis* 190, 408–415. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.018.
- Boisseau, M. R. (2005). Roles of mechanical blood forces in vascular diseases. A clinical overview. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 33, 201–207. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16215286>.
- Bomfim, G. F., Cau, S. B. A., Bruno, A. S., Fedoce, A. G., and Carneiro, F. S. (2019). Hypertension: a new treatment for an old disease? Targeting the immune system. *Br. J. Pharmacol.* 176, 2028–2048. doi:10.1111/bph.14436.
- Bomfim, G. F., Santos, R. A. Dos, Oliveira, M. A., Giachini, F. R., Akamine, E. H., Tostes, R. C., et al. (2012). Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 122, 535–543. doi:10.1042/CS20110523.
- Boron, W., and Boulpaep, E. (2021). *Boron y Boulpaep. Manual de fisiología médica*. 1st ed. , eds. W. Boron and E. Boulpaep Elsevier.
- Boutouyrie, P., Chowienczyk, P., Humphrey, J. D., and Mitchell, G. F. (2021). Arterial Stiffness and Cardiovascular Risk in Hypertension. *Circ. Res.* 128, 864–886. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318061.
- Bozaykut, P., Karademir, B., Yazgan, B., Sozen, E., Siow, R. C. M., Mann, G. E., et al. (2014). Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor γ and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia-induced atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 70, 174–181. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.017.

- Brand, S., Amann, K., Mandel, P., Zimnol, A., and Schupp, N. (2014). Oxidative DNA damage in kidneys and heart of hypertensive mice is prevented by blocking angiotensin II and aldosterone receptors. *PLoS One* 9, 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0115715.
- Briones, A., Aras-Lopez, R., Alonso, M., and Salaices, M. (2014). Small Artery Remodeling in Obesity and Insulin Resistance. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 427–437. doi:10.2174/1570161112666140423221319.
- Briones, A. M., Alonso, M. J., Marín, J., Balfagón, G., and Salaices, M. (2000). Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *Br. J. Pharmacol.* 131, 185–194. doi:10.1038/sj.bjp.0703552.
- Briones, A. M., Arribas, S. M., and Salaices, M. (2010). Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19, 187–194. doi:10.1097/MNH.0b013e328335eec9.
- Briones, A. M., González, J. M., Somoza, B., Giraldo, J., Daly, C. J., Vila, E., et al. (2003). Role of Elastin in Spontaneously Hypertensive Rat Small Mesenteric Artery Remodelling. *J. Physiol.* 552, 185–195. doi:10.1113/jphysiol.2003.046904.
- Briones, A. M., Rodríguez-Criado, N., Hernanz, R., García-Redondo, A. B., Rodrigues-Díez, R. R., Alonso, M. J., et al. (2009). Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension* 54, 142–149. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.133710.
- Briones, A. M., Salaices, M., and Vila, E. (2007). Mechanisms Underlying Hypertrophic Remodeling and Increased Stiffness of Mesenteric Resistance Arteries From Aged Rats. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 696–706. doi:10.1093/gerona/62.7.696.
- Briones, A. M., Xavier, F. E., Arribas, S. M., González, M. C., Rossoni, L. V., Alonso, M. J., et al. (2006). Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 291, 193–201. doi:10.1152/ajpheart.00802.2005.
- Brown, B. A., Williams, H., and George, S. J. (2017). Evidence for the Involvement of Matrix-Degrading Metalloproteinases (MMPs) in Atherosclerosis. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 147, 197–237. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.01.004.
- Brown, M. J., Williams, B., Morant, S. V., Webb, D. J., Caulfield, M. J., Cruickshank, J. K., et al. (2016). Effect of amiloride, or amiloride plus hydrochlorothiazide, versus hydrochlorothiazide on glucose tolerance and blood pressure (PATHWAY-3): a parallel-group, double-blind randomised phase 4 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 4, 136–147. doi:10.1016/S2213-8587(15)00377-0.
- Buelna-Chontal, M., and Zazueta, C. (2013). Redox activation of Nrf2 & NF-κB: A double end sword? *Cell. Signal.*, 2548–2557. doi:10.1016/j.cellsig.2013.08.007.
- Buendia, I., Navarro, E., Michalska, P., Gameiro, I., Egea, J., Abril, S., et al. (2015). New melatonin–cinnamate hybrids as multi-target drugs for neurodegenerative diseases: Nrf2-induction, antioxidant effect and neuroprotection. *Future Med. Chem.* 7, 1961–1969. doi:10.4155/fmc.15.99.
- Buñag, R. D. (1973). Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J. Appl. Physiol.* 34, 279–282. doi:10.1152/jappl.1973.34.2.279.

- Burnstock, G. (2009). Autonomic Neurotransmission: 60 Years Since Sir Henry Dale. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 1–30. doi:10.1146/annurev.pharmtox.052808.102215.
- Cadenas, S. (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic. Biol. Med.* 117, 76–89. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024.
- Caillon, A., Paradis, P., and Schiffrin, E. L. (2019). Role of immune cells in hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 176, 1818–1828. doi:10.1111/bph.14427.
- Cao, X., Peterson, J. R., Wang, G., Anrather, J., Young, C. N., Guraju, M. R., et al. (2012). Angiotensin II-Dependent Hypertension Requires Cyclooxygenase 1-Derived Prostaglandin E 2 and EP 1 Receptor Signaling in the Subfornical Organ of the Brain. *Hypertension* 59, 869–876. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.182071.
- Capone, C., Faraco, G., Anrather, J., Zhou, P., and Iadecola, C. (2010). Cyclooxygenase 1-Derived Prostaglandin E 2 and EP1 Receptors Are Required for the Cerebrovascular Dysfunction Induced by Angiotensin II. *Hypertension* 55, 911–917. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145813.
- Carrizzo, A., Puca, A., Damato, A., Marino, M., Franco, E., Pompeo, F., et al. (2013). Resveratrol Improves Vascular Function in Patients With Hypertension and Dyslipidemia by Modulating NO Metabolism. *Hypertension* 62, 359–366. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.01009.
- Cassado, A. dos A., D'Império Lima, M. R., and Bortoluci, K. R. (2015). Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front. Immunol.* 6, 225. doi:10.3389/fimmu.2015.00225.
- Chan, K., Han, X.-D., and Kan, Y. W. (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4611–4616. doi:10.1073/pnas.081082098.
- Chan, V., Fenning, A., Iyer, A., Hoey, A., and Brown, L. (2011). Resveratrol Improves Cardiovascular Function in DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 429–436. doi:10.2174/138920111794480552.
- Chandy, K. G., Cahalan, M., Pennington, M., Norton, R. S., Wulff, H., and Gutman, G. A. (2001). Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicol.* 39, 1269–1276. doi:10.1016/S0041-0101(01)00120-9.
- Chandy, K. G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G. A., and Cahalan, M. D. (2004). K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 280–289. doi:10.1016/j.tips.2004.03.010.
- Chang, S. C., Huq, R., Chhabra, S., Beeton, C., Pennington, M. W., Smith, B. J., et al. (2015). N-terminally extended analogues of the K⁺ channel toxin from *Stichodactyla helianthus* as potent and selective blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *FEBS J.* 282, 2247–2259. doi:10.1111/febs.13294.
- Chen, B., Lu, Y., Chen, Y., and Cheng, J. (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J. Endocrinol.* 225, R83–R99. doi:10.1530/JOE-14-0662.
- Chen, D., Li, Z., Bao, P., Chen, M., Zhang, M., Yan, F., et al. (2019). Nrf2 deficiency aggravates Angiotensin II-induced cardiac injury by increasing hypertrophy and enhancing IL-6/STAT3-dependent inflammation. *BBA - Mol. Basis Dis.* 1865, 1253–1264.

doi:10.1016/j.bbadis.2019.01.020.

- Chen, Q. M., and Maltagliati, A. J. (2018). Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiol. Genomics* 50, 77–97. doi:10.1152/physiolgenomics.00041.2017.
- Cheong, A., Li, J., Sukumar, P., Kumar, B., Zeng, F., Riches, K., et al. (2011). Potent suppression of vascular smooth muscle cell migration and human neointimal hyperplasia by Kv1.3 channel blockers. *Cardiovasc. Res.* 89, 282–289. doi:10.1093/cvr/cvq305.
- Cheung, K. L., Lee, J. H., Khor, T. O., Wu, T.-Y., Li, G. X., Chan, J., et al. (2014). Nrf2 knockout enhances intestinal tumorigenesis in Apc min/+ mice due to attenuation of anti-oxidative stress pathway while potentiates inflammation. *Mol. Carcinog.* 53, 77–84. doi:10.1002/mc.21950.
- Chi, V., Pennington, M. W., Norton, R. S., Tarcha, E. J., Londono, L. M., Sims-Fahey, B., et al. (2012). Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicol.* 59, 529–546. doi:10.1016/j.toxicol.2011.07.016.
- Chiloeches, A., Paterson, H. F., Marais, R., Clerk, A., Marshall, C. J., and Sugden, P. H. (1999). Regulation of Ras-GTP Loading and Ras-Raf Association in Neonatal Rat Ventricular Myocytes by G Protein-coupled Receptor Agonists and Phorbol Ester. *J. Biol. Chem.* 274, 19762–19770. doi:10.1074/jbc.274.28.19762.
- Chitimus, D. M., Popescu, M. R., Voiculescu, S. E., Panaitescu, A. M., Pavel, B., Zagrean, L., et al. (2020). Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules* 10, 1211. doi:10.3390/biom10091211.
- Cho, K.-J., Seo, J.-M., and Kim, J.-H. (2011). Bioactive lipoxigenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Mol. Cells* 32, 1–5. doi:10.1007/s10059-011-1021-7.
- Choi, S. H., Park, S., Oh, C. J., Leem, J., Park, K.-G., and Lee, I.-K. (2015). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by gemigliptin prevents abnormal vascular remodeling via NF-E2-related factor 2 activation. *Vascul. Pharmacol.* 73, 11–19. doi:10.1016/j.vph.2015.07.005.
- Cidad, P., Jiménez-Pérez, L., García-Arribas, D., Miguel-Velado, E., Tajada, S., Ruiz-McDavitt, C., et al. (2012). Kv1.3 Channels Can Modulate Cell Proliferation During Phenotypic Switch by an Ion-Flux Independent Mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1299–1307. doi:10.1161/ATVBAHA.111.242727.
- Cidad, P., Miguel-Velado, E., Ruiz-McDavitt, C., Alonso, E., Jiménez-Pérez, L., Asuaje, A., et al. (2015). Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 467, 1711–1722. doi:10.1007/s00424-014-1607-y.
- Cidad, P., Moreno-Domínguez, A., Novensá, L., Roqué, M., Barquín, L., Heras, M., et al. (2010). Characterization of Ion Channels Involved in the Proliferative Response of Femoral Artery Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1203–1211. doi:10.1161/ATVBAHA.110.205187.
- Cidad, P., Novensà, L., Garabito, M., Batlle, M., Dantas, A. P., Heras, M., et al. (2014). K⁺ Channels Expression in Hypertension After Arterial Injury, and Effect of Selective Kv1.3 Blockade with PAP-1 on Intimal Hyperplasia Formation. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 28, 501–511. doi:10.1007/s10557-014-6554-5.

- Clément-Chomienne, O., Ishii, K., Walsh, M. P., and Cole, W. C. (1999). Identification, cloning and expression of rabbit vascular smooth muscle Kv1.5 and comparison with native delayed rectifier K⁺ current. *J. Physiol.* 515, 653–667. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.653ab.x.
- Clerc, P. C., Renaud, J. F., Blacher, J., Legrand, M., Samuel, J. L., Levy, B. I., et al. (1999). Collagen I and III and Mechanical Properties of Conduit Arteries in Rats with Genetic Hypertension. *J. Vasc. Res.* 36, 139–146. doi:10.1159/000025637.
- Cogolludo, A., Moreno, L., Lodi, F., Frazziano, G., Cobeño, L., Tamargo, J., et al. (2006). Serotonin Inhibits Voltage-Gated K⁺ Currents in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 98, 931–938. doi:10.1161/01.RES.0000216858.04599.e1.
- Cogolludo, A., and Perez-Vizcaino, F. (2010). 5-HT receptors and K(V) channel internalization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 661, 391–401. doi:10.1007/978-1-60761-500-2_25.
- Consortio ÍTACA (2013). Proyecto ÍTACA. Canales cardiacos de potasio. Available at: <http://www.itaca.edu.es/canales-potasio.htm>.
- Corrao, G., Zambon, A., Parodi, A., Poluzzi, E., Baldi, I., Merlino, L., et al. (2008). Discontinuation of and changes in drug therapy for hypertension among newly-treated patients: a population-based study in Italy. *J. Hypertens.* 26, 819–824. doi:10.1097/HJH.0b013e3282f4edd7.
- Cox, R. H. (2002). Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. *Vascul. Pharmacol.* 38, 13–23. doi:10.1016/S1537-1891(02)00122-2.
- Cox, R. H., Folander, K., and Swanson, R. (2001). Differential Expression of Voltage-Gated K⁺ Channel Genes in Arteries From Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats. *Hypertension* 37, 1315–1322. doi:10.1161/01.HYP.37.5.1315.
- Cuevas, S., Yang, Y., Konkalmatt, P., Asico, L. D., Feranil, J., Jones, J., et al. (2015). Role of Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2 in the Oxidative Stress–Dependent Hypertension Associated With the Depletion of DJ-1. *Hypertension* 65, 1251–1257. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04525.
- da Costa, C. A., de Oliveira, P. R. B., de Bem, G. F., de Cavalho, L. C. R. M., Ognibene, D. T., da Silva, A. F. E., et al. (2012). Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 385, 1199–1209. doi:10.1007/s00210-012-0798-z.
- Daiber, A., and Chlopicki, S. (2020). Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies. *Free Radic. Biol. Med.* 157, 15–37. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.026.
- De Batista, P. R., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R., Médici, C. T., Silva, M. A. S. C., et al. (2014). Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS One* 9, e104020. doi:10.1371/journal.pone.0104020.
- De Ciuceis, C., Amiri, F., Brassard, P., Endemann, D. H., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2005). Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler.*

- Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2106–2113. doi:10.1161/01.ATV.0000181743.28028.57.
- De Ciuceis, C., Rossini, C., La Boria, E., Porteri, E., Petroboni, B., Gavazzi, A., et al. (2014). Immune mechanisms in hypertension. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* 21, 227–234. doi:10.1007/s40292-014-0040-9.
- De Gasparo, M. (2002). AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features. *Drugs* 62, 1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036384>.
- De Miguel, C., Rudemiller, N. P., Abais, J. M., and Mattson, D. L. (2015). Inflammation and Hypertension: New Understandings and Potential Therapeutic Targets. *Curr. Hypertens. Rep.* 17, 507. doi:10.1007/s11906-014-0507-z.
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., and Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 115, 1285–1295. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.
- DeGeorge, G. L., Heck, D. E., and Laskin, J. D. (1997). Arginine metabolism in keratinocytes and macrophages during nitric oxide biosynthesis: multiple modes of action of nitric oxide synthase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 54, 103–112. doi:10.1016/s0006-2952(97)00144-5.
- Deng, H., Sun, Y., Zeng, W., Li, H., Guo, M., Yang, L., et al. (2020). New Classification of Macrophages in Plaques: a Revolution. *Curr. Atheroscler. Rep.* 22, 31. doi:10.1007/s11883-020-00850-y.
- Dhar, I., Dhar, A., Wu, L., and Desai, K. M. (2013). Increased Methylglyoxal Formation with Upregulation of Renin Angiotensin System in Fructose Fed Sprague Dawley Rats. *PLoS One* 8, e74212. doi:10.1371/journal.pone.0074212.
- Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1289–1301. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033.
- Dikalov, S., Dikalova, A., Bikineyeva, A., Schmidt, H., Harrison, D., and Griending, K. (2008). Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1340–1351. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.013.
- Dikalov, S. I., and Dikalova, A. E. (2019). Crosstalk Between Mitochondrial Hyperacetylation and Oxidative Stress in Vascular Dysfunction and Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 31, 710–721. doi:10.1089/ars.2018.7632.
- Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G., and Chrissobolis, S. (2014). Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/406960.
- Dinkova-Kostova, A. T., Liby, K. T., Stephenson, K. K., Holtzclaw, W. D., Gao, X., Suh, N., et al. (2005). Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: Correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4584–4589. doi:10.1073/pnas.0500815102.
- Doehner, W., and Landmesser, U. (2011). Xanthine Oxidase and Uric Acid in Cardiovascular Disease: Clinical Impact and Therapeutic Options. *Semin. Nephrol.* 31, 433–440. doi:10.1016/j.semnephrol.2011.08.007.

- Drake, R. L., Vogl, A. W., and Mitchell, A. W. M. (2018). *Gray. Anatomía básica*. 2nd ed. Elsevier España, S.L.
- Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K., and Sobey, C. G. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 453–471. doi:10.1038/nrd3403.
- Drummond, G. R., and Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 452–463. doi:10.1016/j.tem.2014.06.012.
- Dubó, S., Gallegos, D., Cabrera, L., Sobrevia, L., Zúñiga, L., and González, M. (2016). Cardiovascular Action of Insulin in Health and Disease: Endothelial L-Arginine Transport and Cardiac Voltage-Dependent Potassium Channels. *Front. Physiol.* 7, 74. doi:10.3389/fphys.2016.00074.
- Durante, W. (2010). Targeting heme oxygenase-1 in vascular disease. *Curr. Drug Targets* 11, 1504–1516. doi:10.2174/1389450111009011504.
- Ebrahimian, T., and Touyz, R. M. (2008). Thioredoxin in Vascular Biology: Role in Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1127–1136. doi:10.1089/ars.2007.1985.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N. S., Salleh, S., and Gurtu, S. (2012). Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 7–9. doi:10.1155/2012/374037.
- Erkens, R., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Krause, L., Weidenbach, M., et al. (2015). Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 906–917. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.409.
- Erkens, R., Suvorava, T., Sutton, T. R., Fernandez, B. O., Mikus-Lelinska, M., Barbarino, F., et al. (2018). Nrf2 Deficiency Unmasks the Significance of Nitric Oxide Synthase Activity for Cardioprotection. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1–15. doi:10.1155/2018/8309698.
- Erne, P. (1996). Left-ventricular hypertrophy as a cardiac risk factor: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Praxis (Bern. 1994)*. 85, 227–233. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8701189>.
- Eşrefoğlu, M., Gül, M., Ateş, B., and Erdoğan, A. (2011). The effects of caffeic acid phenethyl ester and melatonin on age-related vascular remodeling and cardiac damage. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25, 580–590. doi:10.1111/j.1472-8206.2010.00876.x.
- Ettehad, D., Emdin, C. A., Kiran, A., Anderson, S. G., Callender, T., Emberson, J., et al. (2016). Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 387, 957–967. doi:10.1016/S0140-6736(15)01225-8.
- Fan, S., Hu, Y., You, Y., Xue, W., Chai, R., Zhang, X., et al. (2022). Role of resveratrol in inhibiting pathological cardiac remodeling. *Front. Pharmacol.* 13, 924473. doi:10.3389/fphar.2022.924473.
- Farooqui, Z., Mohammad, R. S., Lokhandwala, M. F., and Banday, A. A. (2021). Nrf2 inhibition induces oxidative stress, renal inflammation and hypertension in mice. *Clin. Exp. Hypertens.* 43, 175–180. doi:10.1080/10641963.2020.1836191.

- Félétou, M., Huang, Y., and Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br. J. Pharmacol.* 164, 894–912. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x.
- Félétou, M., and Vanhoutte, P. M. (2009). EDHF: an update. *Clin. Sci.* 117, 139–155. doi:10.1042/CS20090096.
- Figueiredo, V. N., Yugar-Toledo, J. C., Martins, L. C., Martins, L. B., de Faria, A. P. C., de Haro Moraes, C., et al. (2012). Vascular stiffness and endothelial dysfunction: Correlations at different levels of blood pressure. *Blood Press.* 21, 31–38. doi:10.3109/08037051.2011.617045.
- Fiorim, J., Simões, M. R., de Azevedo, B. F., Ribeiro, R. F., dos Santos, L., Padilha, A. S., et al. (2020). Increased endothelial nitric oxide production after low level lead exposure in rats involves activation of angiotensin II receptors and PI3K/Akt pathway. *Toxicology* 443, 152557. doi:10.1016/j.tox.2020.152557.
- Flórez Beledo, J. (2013). *Farmacología Humana*. 6th ed. Elsevier Masson SAS.
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., et al. (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 98, 1627–1738. doi:10.1152/physrev.00038.2017.
- Förstermann, U., and Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- Frangogiannis, N. G. (2019). Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol. Aspects Med.* 65, 70–99. doi:10.1016/j.mam.2018.07.001.
- Fried, L. F., Emanuele, N., Zhang, J. H., Brophy, M., Conner, T. A., Duckworth, W., et al. (2013). Combined Angiotensin Inhibition for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 369, 1892–1903. doi:10.1056/NEJMoa1303154.
- Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., and Nishikibe, M. (1994). Clearance of Circulating Endothelin-1 by ETB Receptors in Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1461–1465. doi:10.1006/bbrc.1994.1395.
- Fürst, R., Blumenthal, S. B., Kiemer, A. K., Zahler, S., and Vollmar, A. M. (2006). Nuclear Factor- κ B-Independent Anti-Inflammatory Action of Salicylate in Human Endothelial Cells: Induction of Heme Oxygenase-1 by the c-Jun N-Terminal Kinase/Activator Protein-1 Pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 389–394. doi:10.1124/jpet.106.102251.
- Gao, Y. (2017). “Architecture of the Blood Vessels,” in *Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation* (Springer Singapore), 3–12. doi:10.1007/978-981-10-4810-4_1.
- García-Redondo, A. B., Aguado, A., Briones, A. M., and Salaices, M. (2016). NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Res.* 114, 110–120. doi:10.1016/j.phrs.2016.10.015.
- Garstkiewicz, M., Strittmatter, G. E., Grossi, S., Sand, J., Fenini, G., Werner, S., et al. (2017). Opposing effects of Nrf2 and Nrf2-activating compounds on the NLRP3 inflammasome independent of Nrf2-mediated gene expression. *Eur. J. Immunol.* 47, 806–817. doi:10.1002/eji.201646665.

- Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., et al. (2006). Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* 580, 497–504. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.049.
- Gibbons, G. H., and Dzau, V. J. (1994). The Emerging Concept of Vascular Remodeling. *N. Engl. J. Med.* 330, 1431–1438. doi:10.1056/nejm199405193302008.
- Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Zarzuelo, M. J., Galindo, P., Quintela, A. M., et al. (2012). Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 70–79. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.015.
- Gomolak, J. R., and Didion, S. P. (2014). Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation. *Front. Physiol.* 5, 396. doi:10.3389/fphys.2014.00396.
- González-Amor, M., García-Redondo, A. B., Jorge, I., Zalba, G., Becares, M., Ruiz-Rodríguez, M. J., et al. (2021). Interferon-stimulated gene 15 pathway is a novel mediator of endothelial dysfunction and aneurysms development in angiotensin II infused mice through increased oxidative stress. *Cardiovasc. Res.*, cvab321. doi:10.1093/cvr/cvab321.
- González, J., Valls, N., Brito, R., and Rodrigo, R. (2014). Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J. Cardiol.* 6, 353–366. doi:10.4330/wjc.v6.i6.353.
- González, M. C., Arribas, S. M., Molero, F., and Fernández-Alfonso, M. S. (2001). Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 280, 2876–2881. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.6.h2876.
- Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2021). Oxidative Stress and Hypertension. *Circ. Res.* 128, 993–1020. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318063.
- Guzik, T. J., Hoch, N. E., Brown, K. A., McCann, L. A., Rahman, A., Dikalov, S., et al. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* 204, 2449–2460. doi:10.1084/jem.20070657.
- Hadi, H. A. R., Carr, C. S., and Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc. Health Risk Manag.* 1, 183–198. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319104>.
- Hall, J. E., and Hall, M. E. (2021). *Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica*. 14th ed. , ed. J. Hall Elsevier.
- Halper, J., and Kjaer, M. (2014). Basic components of connective tissues and extracellular matrix: Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 802, 31–47. doi:10.1007/978-94-7-7893-1_3.
- Harwani, S. C. (2018). Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Transl. Res.* 191, 45–63. doi:10.1016/j.trsl.2017.10.011.
- He, X., Deng, J., Yu, X.-J., Yang, S., Yang, Y., and Zang, W.-J. (2020). Activation of M3AChR (Type 3 Muscarinic Acetylcholine Receptor) and Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2) Signaling by Choline Alleviates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Vascular Remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, 2649–2664. doi:10.1161/ATVBAHA.120.315146.

- Heller, R., Werner-Felmayer, G., and Werner, E. R. (2004). α -Tocopherol and Endothelial Nitric Oxide Synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1031, 74–85. doi:10.1196/annals.1331.007.
- Hennig, P., Garstkiewicz, M., Grossi, S., Di Filippo, M., French, L., and Beer, H. (2018). The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 562. doi:10.3390/ijms19020562.
- Hernanz, R., Briones, A. M. M. M., Salaiques, M., and Alonso, M. J. J. J. (2014). New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin. Sci. (Lond)*. 126, 111–121. doi:10.1042/CS20120651.
- Hernanz, R., Martínez-Revelles, S., Palacios, R., Martín, A., Cachofeiro, V., Aguado, A., et al. (2015). Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3159–3176. doi:10.1111/bph.13117.
- Higashi, Y., Maruhashi, T., Noma, K., and Kihara, Y. (2014). Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc. Med.* 24, 165–169. doi:10.1016/j.tcm.2013.12.001.
- Hong, H.-J., Hsiao, G., Cheng, T.-H., and Yen, M.-H. (2001). Supplementation With Tetrahydrobiopterin Suppresses the Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 38, 1044–1048. doi:10.1161/hy1101.095331.
- Hsieh, H.-L., Lin, C.-C., Chan, H.-J., Yang, C. M., and Yang, C.-M. (2012). c-Src-dependent EGF receptor transactivation contributes to ET-1-induced COX-2 expression in brain microvascular endothelial cells. *J. Neuroinflammation* 9, 593. doi:10.1186/1742-2094-9-152.
- Hu, Y., and Xu, Q. (2011). Adventitial Biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1523–1529. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221176.
- Huang, Y., Li, W., Su, Z., and Kong, A.-N. T. (2015). The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1401–1413. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.08.001.
- Iglarz, M., Steiner, P., Wanner, D., Rey, M., Hess, P., and Clozel, M. (2015). Vascular Effects of Endothelin Receptor Antagonists Depends on Their Selectivity for ETA Versus ETB Receptors and on the Functionality of Endothelial ETB Receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 66, 332–337. doi:10.1097/FJC.0000000000000283.
- Immenschuh, S., and Ramadori, G. (2000). Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1121–1128. doi:10.1016/S0006-2952(00)00443-3.
- Inanaga, K., Ichiki, T., Matsuura, H., Miyazaki, R., Hashimoto, T., Takeda, K., et al. (2009). Resveratrol attenuates angiotensin II-induced interleukin-6 expression and perivascular fibrosis. *Hypertens. Res.* 32, 466–471. doi:10.1038/hr.2009.47.
- Intengan, H. D., and Schiffrin, E. L. (2001). Vascular Remodeling in Hypertension. *Hypertension* 38, 581–587. doi:10.1161/hy09t1.096249.
- Ishizaka, N., Aizawa, T., Mori, I., Taguchi, J.-I., Yazaki, Y., Nagai, R., et al. (2000). Heme oxygenase-1 is upregulated in the rat heart in response to chronic administration of angiotensin II. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H672–H678.

- doi:10.1152/ajpheart.2000.279.2.H672.
- Ishizaka, N., De León, H., Laursen, J. B., Fukui, T., Wilcox, J. N., De Keulenaer, G., et al. (1997). Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. *Circulation* 96, 1923–1929. doi:10.1161/01.CIR.96.6.1923.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., et al. (1997). An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322. doi:10.1006/bbrc.1997.6943.
- Jackson, W. F. (2018). Kv channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation* 25, e12421. doi:10.1111/micc.12421.
- Jaén, R. I., Val-Blasco, A., Prieto, P., Gil-Fernández, M., Smani, T., López-Sendón, J. L., et al. (2020). Innate Immune Receptors, Key Actors in Cardiovascular Diseases. *JACC Basic to Transl. Sci.* 5, 735–749. doi:10.1016/j.jacbts.2020.03.015.
- Jansen, T., Hortmann, M., Oelze, M., Opitz, B., Steven, S., Schell, R., et al. (2010). Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1-evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 186–195. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.04.011.
- Javkhedkar, A. A., Quiroz, Y., Rodriguez-Iturbe, B., Vaziri, N. D., Lokhandwala, M. F., and Banday, A. A. (2015). Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R840–R846. doi:10.1152/ajpregu.00308.2014.
- Jia, Z., Aoyagi, T., and Yang, T. (2010). mPGES-1 Protects Against DOCA-Salt Hypertension via Inhibition of Oxidative Stress or Stimulation of NO/cGMP. *Hypertension* 55, 539–546. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144840.
- Jia, Z., Guo, X., Zhang, H., Wang, M.-H., Dong, Z., and Yang, T. (2008). Microsomal Prostaglandin Synthase-1-Derived Prostaglandin E₂ Protects Against Angiotensin II-Induced Hypertension via Inhibition of Oxidative Stress. *Hypertension* 52, 952–959. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.111229.
- Jiménez-Altayó, F., Briones, A. M., Giraldo, J., Planas, A. M., Salaices, M., and Vila, E. (2006). Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1 β Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 42–52. doi:10.1124/jpet.105.088435.
- Kang, S. J., You, A., and Kwak, M. K. (2011). Suppression of Nrf2 signaling by angiotensin II in murine renal epithelial cells. *Arch. Pharm. Res.* 34, 829–836. doi:10.1007/s12272-011-0517-1.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., and Levonen, A.-L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45–49. doi:10.1016/j.redox.2012.10.001.
- Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., Munzel, T., and Daiber, A. (2014). eNOS Uncoupling in Cardiovascular Diseases - the Role of Oxidative Stress and Inflammation. *Curr. Pharm. Des.* 20, 3579–3594. doi:10.2174/13816128113196660748.
- Keleku-Lukwete, N., Suzuki, M., Otsuki, A., Tsuchida, K., Katayama, S., Hayashi, M., et al. (2015).

- Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 12169–12174. doi:10.1073/pnas.1509158112.
- Khor, T. O., Huang, M.-T., Prawan, A., Liu, Y., Hao, X., Yu, S., et al. (2008). Increased Susceptibility of Nrf2 Knockout Mice to Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Cancer Prev. Res.* 1, 187–191. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0028.
- Kim, Y.-M., Pae, H.-O., Park, J. E., Lee, Y. C., Woo, J. M., Kim, N.-H., et al. (2011). Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 137–167. doi:10.1089/ars.2010.3153.
- Ko, E. A., Amiri, F., Pandey, N. R., Javeshghani, D., Leibovitz, E., Touyz, R. M., et al. (2007). Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 292, H1789–H1795. doi:10.1152/ajpheart.01118.2006.
- Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G., and Nishiyama, A. (2007). The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacol. Rev.* 59, 251–287. doi:10.1124/pr.59.3.3.
- Koch Hansen, L., Sevelsted-Møller, L., Rabjerg, M., Larsen, D., Hansen, T. P., Klinge, L., et al. (2014). Expression of T-cell Kv1.3 potassium channel correlates with pro-inflammatory cytokines and disease activity in ulcerative colitis. *J. Crohn's Colitis* 8, 1378–1391. doi:10.1016/j.crohns.2014.04.003.
- Kodama, H., Fukuda, K., Takahashi, E., Tahara, S., Tomita, Y., Ieda, M., et al. (2003). Selective Involvement of p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src in Endothelin-1-Induced JNK Activation. *Hypertension* 41, 1372–1379. doi:10.1161/01.HYP.0000069698.11814.F4.
- Kofler, S., Nickel, T., and Weis, M. (2005). Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin. Sci.* 108, 205–213. doi:10.1042/CS20040174.
- Kojšová, S., Jendeková, L., Zicha, J., Kuneš, J., Andriantsitohaina, R., and Pecháňová, O. (2006). The effect of different antioxidants on nitric oxide production in hypertensive rats. *Physiol. Res.* 55, S3–S16. doi:10.33549/physiolres.930000.55.S1.3.
- Kong, X., Thimmulappa, R., Craciun, F., Harvey, C., Singh, A., Kombairaju, P., et al. (2011). Enhancing Nrf2 Pathway by Disruption of Keap1 in Myeloid Leukocytes Protects against Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 928–938. doi:10.1164/rccm.201102-0271OC.
- Konukoglu, D., and Uzun, H. (2017). Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 956, 511–540. doi:10.1007/5584_2016_90.
- Kossmann, S., Hu, H., Steven, S., Schönfelder, T., Fraccarollo, D., Mikhed, Y., et al. (2014). Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II. *J. Biol. Chem.* 289, 27540–27550. doi:10.1074/jbc.M114.604231.
- Kronish, I. M., Woodward, M., Sergie, Z., Ogedegbe, G., Falzon, L., and Mann, D. M. (2011). Meta-Analysis: impact of drug class on adherence to antihypertensives. *Circulation* 123, 1611–1621. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.983874.
- Kumar, V., Abbas, A. K., and Aster, J. C. (2020). *Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease.* 10th ed. Elsevier.

- Kwon, J.-S., Joung, H., Kim, Y. S., Shim, Y.-S., Ahn, Y., Jeong, M. H., et al. (2012). Sulforaphane inhibits restenosis by suppressing inflammation and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 225, 41–49. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.040.
- Lam, J., and Wulff, H. (2011). The lymphocyte potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 as targets for immunosuppression. *Drug Dev. Res.* 72, 573–584. doi:10.1002/ddr.20467.
- Laplante, M.-A., Wu, R., Moreau, P., and de Champlain, J. (2005). Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 589–596. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.026.
- Laurent, S., and Boutouyrie, P. (2015). The Structural Factor of Hypertension: large and small artery alterations. *Circ. Res.* 116, 1007–1021. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303596.
- Laurent, S., Boutouyrie, P., Asmar, R., Gautier, I., Laloux, B., Guize, L., et al. (2001). Aortic Stiffness Is an Independent Predictor of All-Cause and Cardiovascular Mortality in Hypertensive Patients. *Hypertension* 37, 1236–1241. doi:10.1161/01.HYP.37.5.1236.
- León, R., Buendia, I., Navarro, E., Michalska, P., Gameiros, I., Egea, J., et al. (2016). Compuestos derivados del acrilato de 3-alquiloamino-1H-indolilo y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. (Patent No. WO2016/059269 A1).
- Leopold Wager, C. M., and Wormley, F. L. (2014). Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. *Mucosal Immunol.* 7, 1023–1035. doi:10.1038/mi.2014.65.
- Levonen, A. L., Inkala, M., Heikura, T., Jauhiainen, S., Jyrkkänen, H. K., Kansanen, E., et al. (2007). Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 741–747. doi:10.1161/01.ATV.0000258868.80079.4d.
- Li, J., Ichikawa, T., Villacorta, L., Janicki, J. S., Brower, G. L., Yamamoto, M., et al. (2009). Nrf2 Protects Against Maladaptive Cardiac Responses to Hemodynamic Stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1843–1850. doi:10.1161/ATVBAHA.109.189480.
- Li, J., Zhang, C., Xing, Y., Janicki, J. S., Yamamoto, M., Wang, X. L., et al. (2011). Up-regulation of p27kip1 contributes to Nrf2-mediated protection against angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 90, 315–324. doi:10.1093/cvr/cvr010.
- Li, X.-H., Li, C.-Y., Xiang, Z.-G., Hu, J.-J., Lu, J.-M., Tian, R.-B., et al. (2012). Allicin Ameliorates Cardiac Hypertrophy and Fibrosis through Enhancing of Nrf2 Antioxidant Signaling Pathways. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 26, 457–465. doi:10.1007/s10557-012-6415-z.
- Li, Z., Zhang, Y., Liu, B., Luo, W., Li, H., and Zhou, Y. (2017). Role of E-type prostaglandin receptor EP3 in the vasoconstrictor activity evoked by prostacyclin in thromboxane-prostanoid receptor deficient mice. *Sci. Rep.* 7, 42167. doi:10.1038/srep42167.
- Libby, P. (2006). Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 456S–460S. doi:10.1093/ajcn/83.2.456S.
- Linker, R. A., Lee, D.-H., Ryan, S., van Dam, A. M., Conrad, R., Bista, P., et al. (2011). Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 134, 678–692. doi:10.1093/brain/awq386.
- Lombardi, R., Rodriguez, G., Chen, S. N., Ripplinger, C. M., Li, W., Chen, J., et al. (2009). Resolution

- of Established Cardiac Hypertrophy and Fibrosis and Prevention of Systolic Dysfunction in a Transgenic Rabbit Model of Human Cardiomyopathy Through Thiol-Sensitive Mechanisms. *Circulation* 119, 1398–1407. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.790501.
- Lopes, R. A., Neves, K. B., Tostes, R. C., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2015). Downregulation of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor and Associated Antioxidant Genes Contributes to Redox-Sensitive Vascular Dysfunction in Hypertension. *Hypertension* 66, 1240–1250. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06163.
- Lu, D., and Kassab, G. S. (2011). Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J. R. Soc. Interface* 8, 1379–1385. doi:10.1098/rsif.2011.0177.
- Luft, F. C. (2001). Workshop: Mechanisms and Cardiovascular Damage in Hypertension. *Hypertension* 37, 594–598. doi:10.1161/01.HYP.37.2.594.
- Luo, J., Yan, D., Li, S., Liu, S., Zeng, F., Cheung, C. W., et al. (2020). Allopurinol reduces oxidative stress and activates Nrf2/p62 to attenuate diabetic cardiomyopathy in rats. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 1760–1773. doi:10.1111/jcmm.14870.
- Lusardi, P., Piazza, E., and Fogari, R. (2000). Cardiovascular effects of melatonin in hypertensive patients well controlled by nifedipine: a 24-hour study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 423–427. doi:10.1046/j.1365-2125.2000.00195.x.
- Lüscher, T. F., and Tanner, F. C. (1993). Endothelial Regulation of Vascular Tone and Growth. *Am. J. Hypertens.* 6, 283S–293S. doi:10.1093/ajh/6.7.283S.
- Luttrell, D. K., and Luttrell, L. M. (2004). Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* 23, 7969–7978. doi:10.1038/sj.onc.1208162.
- Lyu, L., Chen, J., Wang, W., Yan, T., Lin, J., Gao, H., et al. (2021). Scoparone alleviates Ang II-induced pathological myocardial hypertrophy in mice by inhibiting oxidative stress. *J. Cell. Mol. Med.* 25, 3136–3148. doi:10.1111/jcmm.16304.
- Ma, W.-X., Li, C.-Y., Tao, R., Wang, X.-P., and Yan, L.-J. (2020). Reductive Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Cardiomyopathy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1–11. doi:10.1155/2020/5136957.
- Majesky, M. W., Dong, X. R., Høglund, V., Mahoney, W. M., and Daum, G. (2011). The Adventitia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1530–1539. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221549.
- Marchesi, C., Rehman, A., Rautureau, Y., Kasal, D. A., Briet, M., Leibowitz, A., et al. (2013). Protective role of vascular smooth muscle cell PPAR γ in angiotensin II-induced vascular disease. *Cardiovasc. Res.* 97, 562–570. doi:10.1093/cvr/cvs362.
- Marian, A. J., Tan, Y., Li, L., Chang, J., Syrris, P., Hessabi, M., et al. (2018). Hypertrophy Regression With N-Acetylcysteine in Hypertrophic Cardiomyopathy (HALT-HCM). *Circ. Res.* 122, 1109–1118. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312647.
- Martínez-Casales, M., Hernanz, R., and Alonso, M. J. (2021). Vascular and Macrophage Heme Oxygenase-1 in Hypertension: A Mini-Review. *Front. Physiol.* 12, 643435. doi:10.3389/fphys.2021.643435.
- Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., García-Redondo, A. B., Alvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J. V., et al. (2013). Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 51–

65. doi:10.1089/ars.2011.4335.
- May, J. M., and Harrison, F. E. (2013). Role of Vitamin C in the Function of the Vascular Endothelium. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 2068–2083. doi:10.1089/ars.2013.5205.
- McMaster, W. G., Kirabo, A., Madhur, M. S., and Harrison, D. G. (2015). Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage. *Circ. Res.* 116, 1022–1033. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303697.
- Meeapat, S., Prasatthong, P., Potue, P., Bunbupha, S., Pakdeechote, P., and Maneesai, P. (2021). Diosmetin Ameliorates Vascular Dysfunction and Remodeling by Modulation of Nrf2/HO-1 and p-JNK/p-NF- κ B Expression in Hypertensive Rats. *Antioxidants* 10, 1487. doi:10.3390/antiox10091487.
- Mehta, P. K., and Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Physiol.* 292, C82–C97. doi:10.1152/ajpcell.00287.2006.
- Menéndez, E., Delgado, E., Fernández-Vega, F., Prieto, M. A., Bordiú, E., Calle, A., et al. (2016). Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. Resultados del estudio Di@bet.es. *Rev. Española Cardiol.* 69, 572–578. doi:10.1016/j.recesp.2015.11.036.
- Michalska, P., Buendia, I., Morales, J. Á., Pérez-Castillo, A., Luengo, E., Cuadrado, A., et al. (2017). Novel generation of Nrf2 inducers for the treatment of multiple sclerosis. in *GLIA Edinburgh 2017* (GLIA), Volume: 65, S1: E202. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/toc/10981136/2017/65/S1>.
- Mikolajczyk, T. P., Nosalski, R., Szczepaniak, P., Budzyn, K., Osmenda, G., Skiba, D., et al. (2016). Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* 30, 1987–1999. doi:10.1096/fj.201500088R.
- Minuz, P., Patrignani, P., Gaino, S., Seta, F., Capone, M. L., Tacconelli, S., et al. (2004). Determinants of Platelet Activation in Human Essential Hypertension. *Hypertension* 43, 64–70. doi:10.1161/01.HYP.0000105109.44620.1B.
- Mitchell, G. F., Lacourcière, Y., Ouellet, J.-P., Izzo, J. L., Neutel, J., Kerwin, L. J., et al. (2003). Determinants of Elevated Pulse Pressure in Middle-Aged and Older Subjects With Uncomplicated Systolic Hypertension. *Circulation* 108, 1592–1598. doi:10.1161/01.CIR.0000093435.04334.1F.
- Montezano, A. C., Amiri, F., Tostes, R. C., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2007). Inhibitory effects of PPAR- γ on endothelin-1-induced inflammatory pathways in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *J. Am. Soc. Hypertens.* 1, 150–160. doi:10.1016/j.jash.2007.01.005.
- Montezano, A. C., Dulak-Lis, M., Tsiropoulou, S., Harvey, A., Briones, A. M., and Touyz, R. M. (2015). Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.* 31, 631–641. doi:10.1016/j.cjca.2015.02.008.
- Moore, J. P., Vinh, A., Tuck, K. L., Sakkal, S., Krishnan, S. M., Chan, C. T., et al. (2015). M2 macrophage accumulation in the aortic wall during angiotensin II infusion in mice is associated with fibrosis, elastin loss, and elevated blood pressure. *Am. J. Physiol. Circ.*

- Physiol.* 309, H906–H917. doi:10.1152/ajpheart.00821.2014.
- Moran, J. P., Cohen, L., Greene, J. M., Xu, G., Feldman, E. B., Hames, C. G., et al. (1993). Plasma ascorbic acid concentrations relate inversely to blood pressure in human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 213–217. doi:10.1093/ajcn/57.2.213.
- Moreno, C., Prieto, P., Macías, Á., Pimentel-Santillana, M., de la Cruz, A., Través, P. G., et al. (2013). Modulation of Voltage-Dependent and Inward Rectifier Potassium Channels by 15-Epi-Lipoxin-A 4 in Activated Murine Macrophages: Implications in Innate Immunity. *J. Immunol.* 191, 6136–6146. doi:10.4049/jimmunol.1300235.
- Muller, D. N., Dechend, R., Mervaala, E. M. A., Park, J., Schmidt, F., Fiebeler, A., et al. (2000). NF- κ B Inhibition Ameliorates Angiotensin II-Induced Inflammatory Damage in Rats. *Hypertension* 35, 193–201. doi:10.1161/01.HYP.35.1.193.
- Mulvany, M. J. (1999). Vascular remodelling of resistance vessels: Can we define this? *Cardiovasc. Res.* 41, 9–13. doi:10.1016/S0008-6363(98)00289-2.
- Mulvany, M. J. (2008). Small artery remodelling in hypertension: Causes, consequences and therapeutic implications. *Med. Biol. Eng. Comput.* 46, 461–467. doi:10.1007/s11517-008-0305-3.
- Mulvany, M. J. (2012). Small Artery Remodelling in Hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110, 49–55. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00758.x.
- Mulvany, M. J., and Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* 41, 19–26. doi:10.1161/01.RES.41.1.19.
- Muñiz, P., Coma, M. J., and Terán, J. (2014). Estrés Oxidativo y Daño Vascular en Procesos de Hipoxia. Malondialdehído (MDA) como Biomarcador de Daño Oxidativo. *Rev. Electrónica Biomed. J. Biomed.* 2, 46–49. Available at: <https://biomed.uninet.edu/2014/n2/muniz.html>.
- Muñoz-Durango, N., Fuentes, C., Castillo, A., González-Gómez, L., Vecchiola, A., Fardella, C., et al. (2016). Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 797. doi:10.3390/ijms17070797.
- Murphy, K., and Weaver, C. (2016). *Janeway's Immunobiology*. 9th ed. Garland Science.
- Nag, A. C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28, 41–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7428441>.
- Nakao, T., Horie, T., Baba, O., Nishiga, M., Nishino, T., Izuhara, M., et al. (2017). Genetic Ablation of MicroRNA-33 Attenuates Inflammation and Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Several Anti-Inflammatory Pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 2161–2170. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309768.
- Naviaux, R. K. (2014). Mitochondrion Metabolic features of the cell danger response. *MITOCH* 16, 7–17. doi:10.1016/j.mito.2013.08.006.
- Nawrot, T. S., Staessen, J. A., Roels, H. A., Den Hond, E., Thijs, L., Fagard, R. H., et al. (2006). Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. *Eur.*

- Heart J.* 28, 628–633. doi:10.1093/eurheartj/ehl479.
- Ndisang, J. F., and Mishra, M. (2013). The heme oxygenase system selectively suppresses the proinflammatory macrophage M1 phenotype and potentiates insulin signaling in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 26, 1123–1131. doi:10.1093/ajh/hpt082.
- Nelson, M. T., and Quayle, J. M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. Physiol.* 268, C799–C822. doi:10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799.
- Neves, M. F., Viridis, A., and Schiffrin, E. L. (2003). Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused rats. *J. Hypertens.* 21, 189–198. doi:10.1097/00004872-200301000-00029.
- Ng, C.-Y., Kamisah, Y., Faizah, O., and Jaarin, K. (2012). The role of repeatedly heated soybean oil in the development of hypertension in rats: association with vascular inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* 93, 377–387. doi:10.1111/j.1365-2613.2012.00839.x.
- Niu, L.-G., Sun, N., Liu, K.-L., Su, Q., Qi, J., Fu, L.-Y., et al. (2022). Genistein Alleviates Oxidative Stress and Inflammation in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus by Activating the Sirt1/Nrf2 Pathway in High Salt-Induced Hypertension. *Cardiovasc. Toxicol.* Online ahead of print. doi:10.1007/s12012-022-09765-3.
- Noel, S., Martina, M. N., Bandapalle, S., Racusen, L. C., Potteti, H. R., Hamad, A. R. A., et al. (2015). T Lymphocyte-Specific Activation of Nrf2 Protects from AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 2989–3000. doi:10.1681/ASN.2014100978.
- Norlander, A. E., and Madhur, M. S. (2017). Inflammatory cytokines regulate renal sodium transporters: How, where, and why? *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 313, F141–F144. doi:10.1152/ajprenal.00465.2016.
- Norlander, A. E., Madhur, M. S., and Harrison, D. G. (2018). The immunology of hypertension. *J. Exp. Med.* 215, 21–33. doi:10.1084/jem.20171773.
- Nørrelund, H., Christensen, K. L., Samani, N. J., Kimber, P., Mulvany, M. J., and Korsgaard, N. (1994). Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension* 24, 301–308. doi:10.1161/01.HYP.24.3.301.
- Nwabuo, C. C., and Vasan, R. S. (2020). Pathophysiology of Hypertensive Heart Disease: Beyond Left Ventricular Hypertrophy. *Curr. Hypertens. Rep.* 22, 11. doi:10.1007/s11906-020-1017-9.
- Ocaranza, M. P., and Jalil, J. E. (2012). Protective Role of the ACE2/Ang-(1–9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *Int. J. Hypertens.* 2012, 1–12. doi:10.1155/2012/594361.
- Oh, C. J., Park, S., Kim, J.-Y., Kim, H.-J., Jeoung, N. H., Choi, Y.-K., et al. (2014). Dimethylfumarate attenuates restenosis after acute vascular injury by cell-specific and Nrf2-dependent mechanisms. *Redox Biol.* 2, 855–864. doi:10.1016/j.redox.2014.06.003.
- Okamoto, R., Ali, Y., Hashizume, R., Suzuki, N., and Ito, M. (2019). BNP as a Major Player in the Heart-Kidney Connection. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3581. doi:10.3390/ijms20143581.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., et al. (2001). The Extra Domain A of Fibronectin Activates Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229–10233.

doi:10.1074/jbc.M100099200.

- Olde Engberink, R. H. G., Frenkel, W. J., van den Bogaard, B., Brewster, L. M., Vogt, L., and van den Born, B.-J. H. (2015). Effects of Thiazide-Type and Thiazide-Like Diuretics on Cardiovascular Events and Mortality. *Hypertension* 65, 1033–1040. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05122.
- Olivencia, M. A., Martínez-Casales, M., Peraza, D. A., García-Redondo, A. B., Mondéjar-Parreño, G., Hernanz, R., et al. (2021). Kv1.3 channels are novel determinants of macrophage-dependent endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension in mice. *Br. J. Pharmacol.* 178, 1836–1854. doi:10.1111/bph.15407.
- Omar, A., Chatterjee, T. K., Tang, Y., Hui, D. Y., and Weintraub, N. L. (2014). Proinflammatory Phenotype of Perivascular Adipocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1631–1636. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303030.
- OMS (2017). Enfermedades cardiovasculares. Available at: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- OMS (2021). Hipertensión. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>.
- ONTARGET Investigators, Yusuf, S., Teo, K. K., Pogue, J., Dyal, L., Copland, I., et al. (2008). Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N. Engl. J. Med.* 358, 1547–1559. doi:10.1056/NEJMoa0801317.
- Opie, L. H., and Lecour, S. (2016). Melatonin has multiorgan effects. *Eur. Hear. J. - Cardiovasc. Pharmacother.* 2, 258–265. doi:10.1093/ehjcvp/pvv037.
- Pagé, E. L., Robitaille, G. A., Pouysségur, J., and Richard, D. E. (2002). Induction of Hypoxia-inducible Factor-1 α by Transcriptional and Translational Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277, 48403–48409. doi:10.1074/jbc.M209114200.
- Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R., and Immenschuh, S. (2010). Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1895–1903. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.014.
- Palacios-Ramírez, R., Hernanz, R., Martín, A., Pérez-Girón, J. V., Barrús, M. T., González-Carnicero, Z., et al. (2019). Pioglitazone Modulates the Vascular Contractility in Hypertension by Interference with ET-1 Pathway. *Sci. Rep.* 9, 16461. doi:10.1038/s41598-019-52839-6.
- Pall, M. L., and Levine, S. (2015). Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. *Sheng Li Xue Bao* 67, 1–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25672622>.
- Paravicini, T. M., and Touyz, R. M. (2008). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Diabetes Care* 31, S170–S180. doi:10.2337/dc08-s247.
- Park, J. B., and Schiffrin, E. L. (2001). Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J. Hypertens.* 19, 921–930. doi:10.1097/00004872-200105000-00013.
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., and Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS):

- The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 94, 317–325. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.091.
- Patton, K. T. ., and Thibodeau, G. A. (2013). *Anatomía y Fisiología*. 8th ed. Elsevier.
- Patton, K. T. ., and Thibodeau, G. A. (2021). *Estructura y función del cuerpo humano*. 16th ed. Elsevier.
- Paulsen, F., and Waschke, J. (2018). *Sobotta. Atlas de anatomía humana Vol 1*. 24th ed. , eds. F. Paulsen and J. Waschke Elsevier.
- Pechanova, O., Paulis, L., and Simko, F. (2014). Peripheral and Central Effects of Melatonin on Blood Pressure Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 17920–17937. doi:10.3390/ijms151017920.
- Pena-Silva, R. A., and Heistad, D. D. (2010). EP1c Times for Angiotensin: EP1 receptors facilitate angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Hypertension* 55, 846–848. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.148346.
- Pérez-García, M. T., Ciudad, P., and López-López, J. R. (2018). The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *Am. J. Physiol. Physiol.* 314, C27–C42. doi:10.1152/ajpcell.00136.2017.
- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., and Rubio-Ruiz, M. E. (2017). Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2098. doi:10.3390/ijms18102098.
- Perez-Vizcaino, F., and Duarte, J. (2010). Flavonols and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* 31, 478–494. doi:10.1016/j.mam.2010.09.002.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., and Andriantsitohaina, R. (2006). Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic. Res.* 40, 1054–1065. doi:10.1080/10715760600823128.
- Perticone, F., Ceravolo, R., Pujia, A., Ventura, G., Iacopino, S., Scozzafava, A., et al. (2001). Prognostic Significance of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Patients. *Circulation* 104, 191–196. doi:10.1161/01.CIR.104.2.191.
- Piao, M. S., Park, J. J., Choi, J. Y., Lee, D. H., Yun, S. J., Lee, J. B., et al. (2012). Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Arch. Dermatol. Res.* 304, 387–395. doi:10.1007/s00403-012-1215-7.
- Plantinga, Y., Ghiadoni, L., Magagna, A., Giannarelli, C., Franzoni, F., Taddei, S., et al. (2007). Supplementation With Vitamins C and E Improves Arterial Stiffness and Endothelial Function in Essential Hypertensive Patients. *Am. J. Hypertens.* 20, 392–397. doi:10.1016/j.amjhyper.2006.09.021.
- Pober, J. S., and Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803–815. doi:10.1038/nri2171.
- Pocock, G., and Richards, C. D. (2005). “El corazón y la circulación,” in *Fisiología Humana. La base de la medicina* (Masson), 291–343.
- Pongs, O., and Schwarz, J. R. (2010). Ancillary Subunits Associated With Voltage-Dependent K⁺ Channels. *Physiol. Rev.* 90, 755–796. doi:10.1152/physrev.00020.2009.

- Priestley, J. R. C., Kautenburg, K. E., Casati, M. C., Endres, B. T., Geurts, A. M., and Lombard, J. H. (2016). The NRF2 knockout rat: a new animal model to study endothelial dysfunction, oxidant stress, and microvascular rarefaction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 310, H478–H487. doi:10.1152/ajpheart.00586.2015.
- Psaltis, P. J., and Simari, R. D. (2015). Vascular Wall Progenitor Cells in Health and Disease. *Circ. Res.* 116, 1392–1412. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305368.
- Pu, Q., Neves, M. F., Viridis, A., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2003). Endothelin Antagonism on Aldosterone-Induced Oxidative Stress and Vascular Remodeling. *Hypertension* 42, 49–55. doi:10.1161/01.HYP.0000078357.92682.EC.
- Qi, D., Wei, M., Jiao, S., Song, Y., Wang, X., Xie, G., et al. (2019). Hypoxia inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells promotes angiotensin II-induced vascular remodeling via activation of CCL7-mediated macrophage recruitment. *Cell Death Dis.* 10, 544. doi:10.1038/s41419-019-1757-0.
- Qian, L., Li, X., Fang, R., Wang, Z., Xu, Y., Zhang, H., et al. (2014). Class A scavenger receptor deficiency augments angiotensin II-induced vascular remodeling. *Biochem. Pharmacol.* 90, 254–264. doi:10.1016/j.bcp.2014.05.015.
- Qiu, L., Hu, L., Liu, X., Li, W., Zhang, X., Xia, H., et al. (2021). Physalin B inhibits PDGF-BB-induced VSMC proliferation, migration and phenotypic transformation by activating the Nrf2 pathway. *Food Funct.* 12, 10950–10966. doi:10.1039/D1FO01926K.
- Qiu, M. R., Campbell, T. J., and Breit, S. N. (2002). A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 130, 67–74. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01965.x.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griending, K. K., et al. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* 97, 1916–1923. doi:10.1172/JCI118623.
- Rajasekaran, N. S., Connell, P., Christians, E. S., Yan, L.-J., Taylor, R. P., Orosz, A., et al. (2007). Human α B-Crystallin Mutation Causes Oxido-Reductive Stress and Protein Aggregation Cardiomyopathy in Mice. *Cell* 130, 427–439. doi:10.1016/j.cell.2007.06.044.
- Rajsheker, S., Manka, D., Blomkalns, A. L., Chatterjee, T. K., Stoll, L. L., and Weintraub, N. L. (2010). Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 191–196. doi:10.1016/j.coph.2009.11.005.
- Rami, A. Z. A., Hamid, A. A., Anuar, N. N. M., Aminuddin, A., and Ugusman, A. (2022). Exploring the Relationship of Perivascular Adipose Tissue Inflammation and the Development of Vascular Pathologies. *Mediators Inflamm.* 2022, 1–16. doi:10.1155/2022/2734321.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., and Flower, R. J. (2008). *Rang y Dale. Farmacología.* 6th ed. Elsevier.
- Rashid, M. H., Huq, R., Tanner, M. R., Chhabra, S., Khoo, K. K., Estrada, R., et al. (2015). A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. *Sci. Rep.* 4, 4509. doi:10.1038/srep04509.
- Redón, J., Oliva, M. R., Tormos, C., Giner, V., Chaves, J., Iradi, A., et al. (2003). Antioxidant Activities and Oxidative Stress Byproducts in Human Hypertension. *Hypertension* 41, 1096–

1101. doi:10.1161/01.HYP.0000068370.21009.38.
- Renna, N. F., de las Heras, N., and Miatello, R. M. (2013). Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. *Int. J. Hypertens.* 2013, 1–7. doi:10.1155/2013/808353.
- Rizzoni, D., and Agabiti-Rosei, E. (2012). Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern. Emerg. Med.* 7, 205–212. doi:10.1007/s11739-011-0548-0.
- Rizzoni, D., Porteri, E., Boari, G. E. M., De Ciuceis, C., Sleiman, I., Muiesan, M. L., et al. (2003). Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. *Circulation* 108, 2230–2235. doi:10.1161/01.CIR.0000095031.51492.C5.
- Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., and Cuadrado, A. (2019). Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 1–20. doi:10.1155/2019/9372182.
- Rocha, A. P. M., Carvalho, L. C. R. M., Sousa, M. A. V., Madeira, S. V. F., Sousa, P. J. C., Tano, T., et al. (2007). Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul. Pharmacol.* 46, 97–104. doi:10.1016/j.vph.2006.08.411.
- Rodrigo, R., González-Montero, J., and Sotomayor, C. G. (2021). Novel Combined Antioxidant Strategy against Hypertension, Acute Myocardial Infarction and Postoperative Atrial Fibrillation. *Biomedicines* 9, 620. doi:10.3390/biomedicines9060620.
- Romero, M., Jiménez, R., Sánchez, M., López-Sepúlveda, R., Zarzuelo, A., Tamargo, J., et al. (2010). Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis* 212, 78–85. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.031.
- Roque, F. R., Briones, A. M., García-Redondo, A. B., Galán, M., Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., et al. (2013). Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 168, 686–703. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02224.x.
- Roush, G. C., Ernst, M. E., Kostis, J. B., Tandon, S., and Sica, D. A. (2015). Head-to-Head Comparisons of Hydrochlorothiazide With Indapamide and Chlorthalidone. *Hypertension* 65, 1041–1046. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05021.
- Rucker, A. J., and Crowley, S. D. (2017). The role of macrophages in hypertension and its complications. *Pflugers Arch.* 469, 419–430. doi:10.1007/s00424-017-1950-x.
- Ruiz-Ortega, M., Esteban, V., Rupérez, M., Sánchez-López, E., Rodríguez-Vita, J., Carvajal, G., et al. (2006). Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 15, 159–166. doi:10.1097/01.mnh.0000203190.34643.d4.
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Rupérez, M., Suzuki, Y., and Egido, J. (2001). Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κ B in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16, 27–33. doi:10.1093/ndt/16.suppl_1.27.
- Rus, H., Pardo, C. A., Hu, L., Darrah, E., Cudrici, C., Niculescu, T., et al. (2005). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11094–11099. doi:10.1073/pnas.0501770102.

- Rüster, C., and Wolf, G. (2006). Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2985–2991. doi:10.1681/ASN.2006040356.
- Ryan, M. J., Didion, S. P., Mathur, S., Faraci, F. M., and Sigmund, C. D. (2004). PPAR γ Agonist Rosiglitazone Improves Vascular Function and Lowers Blood Pressure in Hypertensive Transgenic Mice. *Hypertension* 43, 661–666. doi:10.1161/01.HYP.0000116303.71408.c2.
- Santos, C. X. C., Nabeebaccus, A. A., Shah, A. M., Camargo, L. L., Filho, S. V., and Lopes, L. R. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Nox-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in the Peripheral Vasculature: Potential Role in Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 121–134. doi:10.1089/ars.2013.5262.
- Santos, M., and Shah, A. M. (2014). Alterations in Cardiac Structure and Function in Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 428. doi:10.1007/s11906-014-0428-x.
- Sato, M., Yokoyama, U., Fujita, T., Okumura, S., and Ishikawa, Y. (2011). The Roles of Cytochrome P450 in Ischemic Heart Disease. *Curr. Drug Metab.* 12, 526–532. doi:10.2174/138920011795713715.
- Satta, S., Mahmoud, A. M., Wilkinson, F. L., Yvonne Alexander, M., and White, S. J. (2017). The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1–18. doi:10.1155/2017/9237263.
- Sattler, S. (2017). “The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, eds. S. Sattler and T. Kennedy-Lydon (Springer, Cham), 3–14. doi:10.1007/978-3-319-57613-8_1.
- Savoia, C., and Schiffrin, E. L. (2007). Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin. Sci.* 112, 375–384. doi:10.1042/CS20060247.
- Savoia, C., and Volpe, M. (2011). Angiotensin receptor modulation and cardiovascular remodeling. *JRAAS - J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 12, 381–384. doi:10.1177/1470320311417750.
- Schieffer, B., Luchtefeld, M., Braun, S., Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., and Drexler, H. (2000). Role of NAD(P)H Oxidase in Angiotensin II-Induced JAK/STAT Signaling and Cytokine Induction. *Circ. Res.* 87, 1195–1201. doi:10.1161/01.RES.87.12.1195.
- Schiffrin, E. L. (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascul. Pharmacol.* 43, 19–29. doi:10.1016/j.vph.2005.03.004.
- Schiffrin, E. L. (2012). Vascular remodeling in hypertension: Mechanisms and treatment. *Hypertension* 59, 367–374. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187021.
- Schiffrin, E. L., Larivière, R., and Touyz, R. M. (1995). ET A and ET B receptors on vascular smooth muscle cells from mesenteric vessels of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, S193–S194. doi:10.1111/j.1440-1681.1995.tb02877.x.
- Schiffrin, E. L., and Touyz, R. M. (2004). From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 287, H435–H446. doi:10.1152/ajpheart.00262.2004.
- Schorlemmer, A., Matter, M. L., and Shohet, R. V. (2008). Cardioprotective Signaling by Endothelin. *Trends Cardiovasc. Med.* 18, 233–239. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.005.

- Seddon, M., Looi, Y. H., and Shah, A. M. (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93, 903–907. doi:10.1136/hrt.2005.068270.
- Senanayake, G. V. K., Banigesh, A., Wu, L., Lee, P., and Juurlink, B. H. J. (2012). The Dietary Phase 2 Protein Inducer Sulforaphane Can Normalize the Kidney Epigenome and Improve Blood Pressure in Hypertensive Rats. *Am. J. Hypertens.* 25, 229–235. doi:10.1038/ajh.2011.200.
- Seo, B., Oemar, B. S., Siebenmann, R., von Segesser, L., and Lüscher, T. F. (1994). Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 89, 1203–1208. doi:10.1161/01.CIR.89.3.1203.
- Shawky, N. M., Pichavaram, P., Shehatou, G. S. G., Suddek, G. M., Gameil, N. M., Jun, J. Y., et al. (2016). Sulforaphane improves dysregulated metabolic profile and inhibits leptin-induced VSMC proliferation: Implications toward suppression of neointima formation after arterial injury in western diet-fed obese mice. *J. Nutr. Biochem.* 32, 73–84. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.01.009.
- Shimizu, S., Saito, M., Oiwa, H., Ohmasa, F., Tsounapi, P., Oikawa, R., et al. (2014). Olmesartan ameliorates urinary dysfunction in the spontaneously hypertensive rat via recovering bladder blood flow and decreasing oxidative stress. *NeuroUrol. Urodyn.* 33, 350–357. doi:10.1002/nau.22405.
- Shinozaki, K., Kashiwagi, A., Nishio, Y., Okamura, T., Yoshida, Y., Masada, M., et al. (1999). Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* 48, 2437–2445. doi:10.2337/diabetes.48.12.2437.
- Shirakawa, H., Giriwono, P. E., Oguchi, K., Ueda, K., Hokazono, H., Hiwatashi, K., et al. (2015). Fermented barley extract supplementation ameliorates metabolic state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1876–1883. doi:10.1080/09168451.2015.1052772.
- Silverthorn, D. U. (2008). *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*. 4th ed. Editorial Médica Panamericana.
- Simko, F., Pechanova, O., Pelouch, V., Krajcirovicova, K., Mullerova, M., Bednarova, K., et al. (2009). Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 27, S5–S10. doi:10.1097/01.hjh.0000358830.95439.e8.
- Simko, F., Pechanova, O., Repova Bednarova, K., Krajcirovicova, K., Celec, P., Kamodyova, N., et al. (2014). Hypertension and Cardiovascular Remodelling in Rats Exposed to Continuous Light: Protection by ACE-Inhibition and Melatonin. *Mediators Inflamm.* 2014, 1–10. doi:10.1155/2014/703175.
- Simões, R. P., Fardin, P. B. A., Simões, M. R., Vassallo, D. V., and Padilha, A. S. (2020). Long-term Mercury Exposure Accelerates the Development of Hypertension in Prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rats Inducing Endothelial Dysfunction: the Role of Oxidative Stress and Cyclooxygenase-2. *Biol. Trace Elem. Res.* 196, 565–578. doi:10.1007/s12011-019-01952-8.
- Singh, M. V., Chapleau, M. W., Harwani, S. C., and Abboud, F. M. (2014a). The immune system and hypertension. *Immunol. Res.* 59, 243–253. doi:10.1007/s12026-014-8548-6.

- Singh, Z., Karthigesu, I. P., Singh, P., and Kaur, R. (2014b). Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: a Review. *Iran. J Publ Heal.* 43, 7–16.
- Sinha, N., and Dabla, P. K. (2015). Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. *Curr. Hypertens. Rev.* 11, 132–42. doi:10.2174/1573402111666150529130922.
- Siti, H. N., Kamisah, Y., and Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul. Pharmacol.* 71, 40–56. doi:10.1016/j.vph.2015.03.005.
- Stakos, D. A., Tziakas, D. N., Chalikias, G. K., Mitrousi, K., Tsigalou, C., and Boudoulas, H. (2010). Associations Between Collagen Synthesis and Degradation and Aortic Function in Arterial Hypertension. *Am. J. Hypertens.* 23, 488–494. doi:10.1038/ajh.2010.2.
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., et al. (2013). The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 23–47. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183802.
- Steyers, C. M., and Miller, F. J. (2014). Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 11324–11349. doi:10.3390/ijms150711324.
- Stitham, J., Arehart, E., Gleim, S. R., Li, N., Douville, K., and Hwa, J. (2007). New insights into human prostacyclin receptor structure and function through natural and synthetic mutations of transmembrane charged residues. *Br. J. Pharmacol.* 152, 513–522. doi:10.1038/sj.bjp.0707413.
- Su, X., Wang, S., Zhang, H., Yang, G., Bai, Y., Liu, P., et al. (2021). Sulforaphane prevents angiotensin II-induced cardiomyopathy by activation of Nrf2 through epigenetic modification. *J. Cell. Mol. Med.* 25, 4408–4419. doi:10.1111/jcmm.16504.
- Suárez Quintanilla, J., Iturrieta Zuazo, I., Rodríguez Pérez, A. I., and García Esteo, F. J. (2020). *Anatomía humana para estudiantes de Ciencias de la Salud*. 2nd ed. , eds. J. Suárez Quintanilla, I. Iturrieta Zuazo, A. I. Rodríguez Pérez, and F. J. García Esteo Elsevier.
- Suematsu, M., Suzuki, H., Delano, F. A., and Schmid-Schönbein, G. W. (2002). The Inflammatory Aspect of the Microcirculation in Hypertension: Oxidative Stress, Leukocytes/Endothelial Interaction, Apoptosis. *Microcirculation* 9, 259–276.
- Sumpio, B. E., Riley, J. T., and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1508–1512. doi:10.1016/s1357-2725(02)00075-4.
- Sun, H.-J., Wu, Z.-Y., Nie, X.-W., and Bian, J.-S. (2020). Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. *Front. Pharmacol.* 10, 1568. doi:10.3389/fphar.2019.01568.
- Susic, D., and Frohlich, E. D. (2000). Hypertension and the heart. *Curr. Hypertens. Rep.* 2, 565–269. doi:10.1007/s11906-996-0042-7.
- Sussan, T. E., Gajghate, S., Chatterjee, S., Mandke, P., McCormick, S., Sudini, K., et al. (2015). Nrf2 reduces allergic asthma in mice through enhanced airway epithelial cytoprotective function. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 309, L27–L36. doi:10.1152/ajplung.00398.2014.
- Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., and Egido, J. (2003). Inflammation and angiotensin II. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 881–900. doi:10.1016/S1357-

2725(02)00271-6.

- Szeto, C.-C., Sugano, K., Wang, J.-G., Fujimoto, K., Whittle, S., Modi, G. K., et al. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) therapy in patients with hypertension, cardiovascular, renal or gastrointestinal comorbidities: joint APAGE/APLAR/APSDE/APSH/APSN/PoA recommendations. *Gut* 69, 617–629. doi:10.1136/gutjnl-2019-319300.
- Takimoto-Ohnishi, E., and Murakami, K. (2019). Renin–angiotensin system research: from molecules to the whole body. *J. Physiol. Sci.* 69, 581–587. doi:10.1007/s12576-019-00679-4.
- Tamargo, J. (2004a). Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* 70, 9–31.
- Tamargo, J. (2004b). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* 62, 9–33. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.026.
- Tan, D.-X., Manchester, L., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., and Reiter, R. (2015). Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules* 20, 18886–18906. doi:10.3390/molecules201018886.
- Tan, X., Jiao, P.-L., Sun, J.-C., Wang, W., Ye, P., Wang, Y.-K., et al. (2021). β -Arrestin1 Reduces Oxidative Stress via Nrf2 Activation in the Rostral Ventrolateral Medulla in Hypertension. *Front. Neurosci.* 15, 657825. doi:10.3389/fnins.2021.657825.
- Tanase, D. M., Apostol, A. G., Costea, C. F., Tarniceriu, C. C., Tudorancea, I., Maranduca, M. A., et al. (2022). Oxidative Stress in Arterial Hypertension (HTN): The Nuclear Factor Erythroid Factor 2-Related Factor 2 (Nrf2) Pathway, Implications and Future Perspectives. *Pharmaceutics* 14, 1–18. doi:10.3390/pharmaceutics14030534.
- Taniyama, Y., Ushio-Fukai, M., Hitomi, H., Rocic, P., Kingsley, M. J., Pfahnl, C., et al. (2004). Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 287, C494–C499. doi:10.1152/ajpcell.00439.2003.
- Tanner, M. R., Tajhya, R. B., Huq, R., Gehrman, E. J., Rodarte, K. E., Atik, M. A., et al. (2017). Prolonged immunomodulation in inflammatory arthritis using the selective Kv1.3 channel blocker HsTX1[R14A] and its PEGylated analog. *Clin. Immunol.* 180, 45–57. doi:10.1016/j.clim.2017.03.014.
- Tapia, E., Zatarain-Barrón, Z. L., Hernández-Pando, R., Zarco-Márquez, G., Molina-Jijón, E., Cristóbal-García, M., et al. (2013). Curcumin reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. *Phytomedicine* 20, 359–366. doi:10.1016/j.phymed.2012.11.014.
- Thimmulappa, R. K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S. P., Yamamoto, M., Kensler, T. W., et al. (2006). Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.* 116, 984–995. doi:10.1172/JCI25790.
- Thomas, G. D. (2011). Neural control of the circulation. *Adv. Physiol. Educ.* 35, 28–32. doi:10.1152/advan.00114.2010.
- Thomopoulos, C., Parati, G., and Zanchetti, A. (2015a). Effects of blood pressure-lowering on outcome incidence in hypertension: 5. Head-to-head comparisons of various classes of antihypertensive drugs - overview and meta-analyses. *J. Hypertens.* 33, 1321–1341.

doi:10.1097/HJH.0000000000000614.

- Thomopoulos, C., Parati, G., and Zanchetti, A. (2015b). Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: 4. Effects of various classes of antihypertensive drugs—overview and meta-analyses. *J. Hypertens.* 33, 195–211. doi:10.1097/HJH.0000000000000447.
- Thomopoulos, C., Parati, G., and Zanchetti, A. (2017). Effects of blood-pressure-lowering treatment on outcome incidence in hypertension. 11. Effects of total cardiovascular risk and achieved blood pressure. *J. Hypertens.* 35, 2138–2149. doi:10.1097/HJH.0000000000001548.
- Tobeiha, M., Jafari, A., Fadaei, S., Mirazimi, S. M. A., Dashti, F., Amiri, A., et al. (2022). Evidence for the Benefits of Melatonin in Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 9, 888319. doi:10.3389/fcvm.2022.888319.
- Tortora, G. J., and Derrickson, B. (2020). *Principios de anatomía y fisiología*. 13th ed. Editorial Médica Panamericana.
- Touyz, R. M. (2005). Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II – editorial review. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 125–131. doi:10.1097/00041552-200503000-00007.
- Touyz, R. M., and Briones, A. M. (2011). Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens. Res.* 34, 5–14. doi:10.1038/hr.2010.201.
- Touyz, R. M., Briones, A. M., Sedeek, M., Burger, D., and Montezano, A. C. (2011). NOX Isoforms and Reactive Oxygen Species in Vascular Health. *Mol. Interv.* 11, 27–35. doi:10.1124/mi.11.1.5.
- Touyz, R. M., and Montezano, A. C. (2015). “Hypertensive Vasculopathy,” in *PanVascular Medicine*, ed. P. Lanzer (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 1595–1618. doi:10.1007/978-3-642-37078-6_51.
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., and Montezano, A. C. (2020). Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Can. J. Cardiol.* 36, 659–670. doi:10.1016/j.cjca.2020.02.081.
- Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* 52, 639–672. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121512>.
- Touyz, R. M., Tabet, F., and Schiffrin, E. L. (2003). Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30, 860–866. doi:10.1046/j.1440-1681.2003.03930.x.
- Tresguerres, J. A. F., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Delpón, E., Rey, E., Escrich, E., et al. (2020). *Fisiología Humana*. 5th ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Tsutsui, H., Kinugawa, S., and Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 301, 2181–2190. doi:10.1152/ajpheart.00554.2011.
- Tucker, W. D., Arora, Y., and Mahajan, K. (2021). *Anatomy, Blood Vessels*. StatPearls Publishing Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262226>.

- Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F. A., Sonntag, W. E., Pearson, K., et al. (2010). Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 299, H18–H24. doi:10.1152/ajpheart.00260.2010.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., Gautam, T., Koncz, P., Losonczy, G., et al. (2011). Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 301, H363–H372. doi:10.1152/ajpheart.01134.2010.
- Vallejo, S., Palacios, E., Romacho, T., Villalobos, L., Peiró, C., and Sánchez-Ferrer, C. F. (2014). The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc. Diabetol.* 13, 158. doi:10.1186/s12933-014-0158-z.
- Vicenová, B., Vopálenský, V., Burýšek, L., and Pospíšek, M. (2009). Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. *Physiol. Res.* 58, 481–498. doi:10.33549/physiolres.931673.
- Vicente, R., Escalada, A., Coma, M., Fuster, G., Sánchez-Tilló, E., López-Iglesias, C., et al. (2003). Differential Voltage-dependent K⁺ Channel Responses during Proliferation and Activation in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 278, 46307–46320. doi:10.1074/jbc.M304388200.
- Vicente, R., Escalada, A., Villalonga, N., Texidó, L., Roura-Ferrer, M., Martín-Satué, M., et al. (2006). Association of Kv1.5 and Kv1.3 Contributes to the Major Voltage-dependent K⁺ Channel in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 281, 37675–37685. doi:10.1074/jbc.M605617200.
- Viel, E. C., Benkirane, K., Javeshghani, D., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2008). Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 295, H281–H288. doi:10.1152/ajpheart.00304.2008.
- Villalonga, N., David, M., Bielanska, J., Vicente, R., Comes, N., Valenzuela, C., et al. (2010). Immunomodulation of voltage-dependent K⁺ channels in macrophages: molecular and biophysical consequences. *J. Gen. Physiol.* 135, 135–147. doi:10.1085/jgp.200910334.
- Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., and Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Front. Immunol.* 10, 1462. doi:10.3389/fimmu.2019.01462.
- Viridis, A., Duranti, E., and Taddei, S. (2011). Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int. J. Hypertens.* 2011, 1–7. doi:10.4061/2011/916310.
- Wagenseil, J. E., and Mecham, R. P. (2009). Vascular ECM and arterial mechanics. *Physiol. Rev.* 89, 957–989. doi:10.1152/physrev.00041.2008.Vascular.
- Wang, C., Luo, Z., Carter, G., Wellstein, A., Jose, P. A., Tomlinson, J., et al. (2018). NRF2 prevents hypertension, increased ADMA, microvascular oxidative stress, and dysfunction in mice with two weeks of ANG II infusion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 314, R399–R406. doi:10.1152/ajpregu.00122.2017.
- Wang, J., Chen, H., Seth, A., and McCulloch, C. A. (2003). Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 285, 1871–1881. doi:10.1152/ajpheart.00387.2003.
- Wang, M., Lee, E., Song, W., Ricciotti, E., Rader, D. J., Lawson, J. A., et al. (2008). Microsomal

- Prostaglandin E Synthase-1 Deletion Suppresses Oxidative Stress and Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Circulation* 117, 1302–1309. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.731398.
- Wensveen, F. M., Jelenčić, V., Valentić, S., Šestan, M., Wensveen, T. T., Theurich, S., et al. (2015). NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat. Immunol.* 16, 376–385. doi:10.1038/ni.3120.
- Wenzel, P., Knorr, M., Kossmann, S., Stratmann, J., Hausding, M., Schuhmacher, S., et al. (2011). Lysozyme M-Positive Monocytes Mediate Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction. *Circulation* 124, 1370–1381. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034470.
- Wenzel, U. O., Bode, M., Kurts, C., and Ehmke, H. (2019). Salt, inflammation, IL-17 and hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 176, 1853–1863. doi:10.1111/bph.14359.
- Wenzel, U., Turner, J. E., Krebs, C., Kurts, C., Harrison, D. G., and Ehmke, H. (2016). Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 677–686. doi:10.1681/ASN.2015050562.
- Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Himmelfarb, C. D., et al. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Pr. *J. Am. Coll. Cardiol.* 17, 127–248. Available at: <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/ten-points-to-remember/2017/11/09/11/41/2017-guideline-for-high-blood-pressure-in-adults>.
- Widlansky, M. E., and Gutterman, D. D. (2011). Regulation of Endothelial Function by Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1517–1530. doi:10.1089/ars.2010.3642.
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., et al. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 39, 3021–3104. doi:10.1093/eurheartj/ehy339.
- Wright, M. M., Kim, J., Hock, T. D., Leitiger, N., Freeman, B. A., and Agarwal, A. (2009). Human haem oxygenase-1 induction by nitro-linoleic acid is mediated by cAMP, AP-1 and E-box response element interactions. *Biochem. J.* 422, 353–361. doi:10.1042/BJ20090339.
- Wruck, C. J., Fragoulis, A., Gurzynski, A., Brandenburg, L.-O., Kan, Y. W., Chan, K., et al. (2011). Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 844–850. doi:10.1136/ard.2010.132720.
- Wu, B., Liu, J., Bian, E., Hu, W., Huang, C., Meng, X., et al. (2020). Blockage of Kv1.3 regulates macrophage migration in acute liver injury by targeting δ -catenin through RhoA signaling. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 671–681. doi:10.7150/ijbs.38950.
- Wu, L., Noyan Ashraf, M. H., Facci, M., Wang, R., Paterson, P. G., Ferrie, A., et al. (2004). Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7094–7099. doi:10.1073/pnas.0402004101.
- Wu, Q. Q., Wang, Y., Senitko, M., Meyer, C., Wigley, W. C., Ferguson, D. A., et al. (2011).

- Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPAR γ , and HO-1. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 300, 1180–1192. doi:10.1152/ajprenal.00353.2010.
- Wu, S., Gao, J., Ohlemeyer, C., Roos, D., Niessen, H., Kottgen, E., et al. (2005). Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1601–1610. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.006.
- Xiao, L., and Harrison, D. G. (2020). Inflammation in Hypertension. *Can. J. Cardiol.* 36, 635–647. doi:10.1016/j.cjca.2020.01.013.
- Xie, Z., Chen, F., Li, W. A., Geng, X., Li, C., Meng, X., et al. (2017). A review of sleep disorders and melatonin. *Neurol. Res.* 39, 559–565. doi:10.1080/01616412.2017.1315864.
- Xing, Y., Niu, T., Wang, W., Li, J., Li, S., Janicki, J. S., et al. (2012). Triterpenoid Dihydro-CDDO-Trifluoroethyl Amide Protects against Maladaptive Cardiac Remodeling and Dysfunction in Mice: A Critical Role of Nrf2. *PLoS One* 7, e44899. doi:10.1371/journal.pone.0044899.
- Xiong, D., Hu, W., Ye, S.-T., and Tan, Y.-S. (2018). Isoliquiritigenin alleviated the Ang II-induced hypertensive renal injury through suppressing inflammation cytokines and oxidative stress-induced apoptosis via Nrf2 and NF- κ B pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, 161–168. doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.013.
- Xu, J., and Shi, G.-P. (2014). Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 2106–2119. doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.008.
- Yamamoto, M., Kensler, T. W., and Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol. Rev.* 98, 1169–1203. doi:10.1152/physrev.00023.2017.
- Ye, J., Que, B., Huang, Y., Lin, Y., Chen, J., Liu, L., et al. (2019). Interleukin-12p35 knockout promotes macrophage differentiation, aggravates vascular dysfunction, and elevates blood pressure in angiotensin II-infused mice. *Cardiovasc. Res.* 115, 1102–1113. doi:10.1093/cvr/cvy263.
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 35–42. doi:10.1038/nature00978.
- Yin, F. C. P., Spurgeon, H. A., Rakusan, K., Weisfeldt, M. L., and Lakatta, E. G. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 243, H941–H947. doi:10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941.
- Yoo, S.-H., Lim, Y., Kim, S.-J., Yoo, K.-D., Yoo, H.-S., Hong, J.-T., et al. (2013). Sulforaphane inhibits PDGF-induced proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cell by up-regulation of p53 leading to G1/S cell cycle arrest. *Vascul. Pharmacol.* 59, 44–51. doi:10.1016/j.vph.2013.06.003.
- Yu, C., and Xiao, J.-H. (2021). The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 1–16. doi:10.1155/2021/6635460.
- Yu, S., Yang, H., Guo, X., and Sun, Y. (2020). Klotho attenuates angiotensin II-induced cardiotoxicity through suppression of necroptosis and oxidative stress. *Mol. Med. Rep.* 23, 66. doi:10.3892/mmr.2020.11705.

- Zhang, A., Suzuki, T., Adachi, S., Naganuma, E., Suzuki, N., Hosoya, T., et al. (2021a). Distinct Regulations of HO-1 Gene Expression for Stress Response and Substrate Induction. *Mol. Cell. Biol.* 41, 387–395. doi:10.1128/MCB.00236-21.
- Zhang, J., Rudemiller, N. P., Patel, M. B., Karlovich, N. S., Wu, M., McDonough, A. A., et al. (2016). Interleukin-1 Receptor Activation Potentiates Salt Reabsorption in Angiotensin II-Induced Hypertension via the NKCC2 Co-transporter in the Nephron. *Cell Metab.* 23, 360–368. doi:10.1016/j.cmet.2015.11.013.
- Zhang, M., Xu, Y., Qiu, Z., and Jiang, L. (2019). Sulforaphane Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration via Suppression of NOX4/ROS/Nrf2 Signaling. *Int. J. Biol. Sci.* 15, 148–157. doi:10.7150/ijbs.28874.
- Zhang, Q., Liu, J., Duan, H., Li, R., Peng, W., and Wu, C. (2021b). Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *J. Adv. Res.* 34, 43–63. doi:10.1016/j.jare.2021.06.023.
- Zhang, Q., Xue, T., Guan, J., Wang, W., Shi, J., Lu, J., et al. (2021c). Iriogenin alleviates angiotensin II -induced oxidative stress and apoptosis in HUVEC cells by activating Nrf2 pathway. *Drug Dev. Res.* 82, 999–1007. doi:10.1002/ddr.21802.
- Zhang, X., Goncalves, R., and Mosser, D. M. (2008). The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* 83, Unit 14.1. doi:10.1002/0471142735.im1401s83.
- Zhang, Y., Murugesan, P., Huang, K., and Cai, H. (2020). NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cardiol.* 17, 170–194. doi:10.1038/s41569-019-0260-8.
- Zhao, Q., Zhang, J., and Wang, H. (2015). PGC-1 α limits angiotensin II-induced rat vascular smooth muscle cells proliferation via attenuating NOX1-mediated generation of reactive oxygen species. *Biosci. Rep.* 35, e00252. doi:10.1042/BSR20150112.
- Zheng, J.-P., Cheng, Z., Jiang, J., Ke, Y., and Liu, Z. (2015). Cyclosporin A upregulates ETB receptor in vascular smooth muscle via activation of mitogen-activating protein kinases and NF- κ B pathways. *Toxicol. Lett.* 235, 1–7. doi:10.1016/j.toxlet.2015.03.004.
- Zheng, L., and Du, X. (2014). Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Hypertension. *Cell Biochem. Biophys.* 69, 209–211. doi:10.1007/s12013-013-9791-5.
- Zhong, W.-X., Zhang, G.-S., and Tang, J. (2021). The effect of Nrf2 activators tBHQ and 4-octyl itaconate on the nucleus pulposus cell degeneration. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 25, 5189–5198. doi:10.26355/eurrev_202108_26532.
- Zhu, J., Yang, Y., Hu, S.-G., Zhang, Q.-B., Yu, J., and Zhang, Y.-M. (2017). T-lymphocyte Kv1.3 channel activation triggers the NLRP3 inflammasome signaling pathway in hypertensive patients. *Exp. Ther. Med.* 14, 147–154. doi:10.3892/etm.2017.4490.
- Zoja, C., Corna, D., Nava, V., Locatelli, M., Abbate, M., Gaspari, F., et al. (2013). Analogs of bardoxolone methyl worsen diabetic nephropathy in rats with additional adverse effects. *Am. J. Physiol. Physiol.* 304, F808–F819. doi:10.1152/ajprenal.00376.2012.