

UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



## **TESIS DOCTORAL**

---

**PAPEL DE ET-1 EN LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y LA CONTRACTILIDAD  
VASCULAR EN HIPERTENSIÓN. MODULACIÓN POR PPAR $\gamma$**

Departamento de Ciencias Básicas de la Salud

Roberto Palacios Ramírez

MADRID, 2016





Departamento de Ciencias Básicas de la Salud

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad Rey Juan Carlos

**MARÍA JESÚS ALONSO GORDO**, Catedrática, y **RAQUEL HERNANZ MARTÍN**, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Ciencias Básicas de la Salud de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos,

CERTIFICAN:

Que D. **ROBERTO PALACIOS RAMÍREZ** ha realizado bajo su dirección el trabajo ***“Papel de ET-1 en la expresión de COX-2 y la contractilidad vascular en hipertensión. Modulación por PPARγ”***, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Rey Juan Carlos.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a 27 de Enero de 2016.

Dra. María Jesús Alonso Gordo  
Catedrática

Dra. Raquel Hernanz Martín  
Profesora Contratada Doctor



Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-36400), Cardiovascular Network, Instituto de Salud Carlos III (RD12/0042/0024), Fundación Mutua Madrileña y por una Ayuda para la Realización de Proyectos de Investigación de la Universidad Rey Juan Carlos y la Comunidad de Madrid (URJC-CM2007-BIO-1423). Roberto Palacios ha sido becario de formación docente de la Universidad Rey Juan Carlos y en la actualidad es Personal Investigador en la Universidad Autónoma de Madrid.



# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN/SUMMARY</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	23
<u><b>Hipertensión arterial</b></u> .....	26
<i>Factores que influyen en el desarrollo de la hipertensión</i> .....	30
<u><b>Sistema renina-angiotensina</b></u> .....	31
<i>Sistema renina-angiotensina en hipertensión</i> .....	37
<u><b>Endotelinas</b></u> .....	39
<i>ET-1</i> .....	40
<i>Otros péptidos de la familia de las endotelinas</i> .....	44
<i>Endotelina en hipertensión</i> .....	45
<u><b>Ciclooxigenasa</b></u> .....	47
<i>COX-2 en hipertensión</i> .....	51
<u><b>Especies reactivas de oxígeno</b></u> .....	53
<i>Tipos de ROS</i> .....	54
<i>Fuentes de ROS</i> .....	56
<i>ROS en hipertensión</i> .....	61
<u><b>Receptores activados por el proliferador de peroxisomas</b></u> .....	63
<i>Regulación de la expresión génica</i> .....	65
<i>Tipos de PPAR</i> .....	71
<i>PPAR<math>\gamma</math> en hipertensión</i> .....	76
<b>OBJETIVOS</b> .....	79
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	83
<u><b>Material biológico</b></u> .....	85
<u><b>Cultivos celulares</b></u> .....	87
<u><b>Western Blot</b></u> .....	89
<u><b>Inmunofluorescencia</b></u> .....	92
<u><b>Cuantificación de ARNm</b></u> .....	93
<i>qRT-PCR</i> .....	95
<u><b>Cuantificación de la producción de anión superóxido</b></u> .....	98

<b><u>Actividad NADPH oxidasa</u></b> .....	99
<b><u>Determinación de los niveles de NO</u></b> .....	100
<b><u>Reactividad vascular</u></b> .....	100
<b><u>Análisis estadístico</u></b> .....	102
<b><u>Soluciones y fármacos utilizados</u></b> .....	103
<b>RESULTADOS</b> .....	107
<b><u>Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por Ang II mediante la inhibición de la producción de ROS y ET-1 en CMLV de ratas hipertensas</u></b> .....	109
<i>Pioglitazona reduce la incrementada expresión vascular de COX-2, ET-1 y el estrés oxidativo asociados al sistema renina-angiotensina en hipertensión</i> .....	109
<i>Ang II induce la expresión de COX-2 en CMLV de ratas WKY y SHR</i> .....	112
<i>Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por Ang II en CMLV de WKY y SHR</i> .....	114
<i>ET-1 contribuye a la inducción de COX-2 por Ang II en CMLV de SHR</i> .....	115
<i>Pioglitazona reduce el incremento en la expresión de ET-1 inducida por Ang II en CMLV de SHR</i> .....	119
<i>El estrés oxidativo contribuye a la expresión de ET-1 y COX-2 inducida por Ang II</i> .....	120
<i>Pioglitazona reduce el estrés oxidativo inducido por Ang II en CMLV de SHR</i> .....	123
<i>AP-1 contribuye a la aumentada expresión de COX-2 y ET-1 y al estrés oxidativo inducido por Ang II en CMLV de SHR</i> .....	124
<i>Pioglitazona inhibe la activación de AP-1 inducida por Ang II en CMLV de SHR</i> .....	127
<i>NFκB contribuye a la aumentada expresión de COX-2 y ET-1 y al estrés oxidativo inducidos por Ang II en CMLV de SHR</i> .....	128
<i>Pioglitazona inhibe la activación de NFκB inducida por Ang II en CMLV de SHR</i> .....	131
<b><u>Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por ET-1 mediante la inhibición de la producción de ROS en CMLV de SHR</u></b> .....	132
<i>El estrés oxidativo contribuye a la expresión de COX-2 inducida por ET-1 en CMLV de ratas SHR</i> .....	132
<i>ET-1 activa los factores de transcripción AP-1 y NFκB en CMLV de SHR</i> .....	135
<i>AP-1 y NFκB contribuyen a la aumentada expresión de COX-2 producida por ET-1 en CMLV de SHR</i> .....	137
<i>AP-1 y NFκB contribuyen al estrés oxidativo inducido por ET-1 en CMLV de SHR</i> .....	138

<i>Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por ET-1 en CMLV de SHR</i> .....	140
<i>Pioglitazona reduce el estrés oxidativo inducido por ET-1 en CMLV de SHR</i> .....	141
<i>Pioglitazona inhibe la activación de AP-1 y NFκB inducida por ET-1 en CMLV de SHR</i> .....	142
<b><u>Pioglitazona modifica el efecto de ET-1 sobre la contracción a fenilefrina en arterias mesentéricas de resistencia de ratas hipertensas alterando la proporción de receptores</u></b>	
<b><u>ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub></u></b> .....	144
<i>ET-1 potencia la contracción a fenilefrina en arterias de ratas hipertensas a través de receptores ET<sub>A</sub></i> .....	145
<i>Prostanoides contráctiles derivados de COX-2, actuando sobre receptores TP, participan en el aumento de contracción a fenilefrina inducido por ET-1 en SHR</i> .....	147
<i>La reducción en la biodisponibilidad de NO participa en el incremento de la contracción a fenilefrina inducido por ET-1 en SHR</i> .....	150
<i>Tras el tratamiento de ratas hipertensas con pioglitazona, ET-1, a través de receptores ET<sub>B</sub>, aumenta la biodisponibilidad de NO reduciendo la contracción a fenilefrina</i> .....	153
<b>DISCUSIÓN</b> .....	159
<b><u>Efecto del tratamiento in vivo de SHR con pioglitazona sobre los incrementados niveles vasculares de COX-2, ET-1 y ROS asociados al SRA</u></b> .....	162
<b><u>Efecto de pioglitazona sobre la participación de ET-1 en la inducción de COX-2 estimulada por Ang II en CMLV de ratas hipertensas</u></b> .....	168
<b><u>Modulación por pioglitazona del efecto de ET-1 en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en arterias mesentéricas de resistencia de ratas hipertensas</u></b> .....	177
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	185
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	191



## **ABREVIATURAS**



15dPGJ<sub>2</sub>: 15-deoxi-delta-12, 14-prostaglandina J<sub>2</sub>

AA: ácido araquidónico

AC: adenilato ciclasa

ACh: acetilcolina

ADH: hormona antidiurética

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AMR: arteria mesentérica de resistencia

Ang: angiotensina

AP-1: proteína activadora-1

AT: receptor de angiotensina

AUF-1: *ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1*

BCL: *B-Cell CLL/Lymphoma*

BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina

CCL2: ligando del motivo C-C 2 (MCP-1)

CMLV: células de músculo liso vascular

COX-2: ciclooxigenasa 2

CXCL1: ligando del motivo C-X-C

DAG: diacilglicerol

DHA: ácido docosahexanoico

DOCA: acetato de deoxicortecosterona

DP: receptor de PGD<sub>2</sub>

ECA: enzima convertora de angiotensina

ECE: enzima convertora de endotelina

EDHF: factor hiperpolarizante derivado de endotelio

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

Elk-1: proteína similar a E-26 1

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

EP: receptor de PGE<sub>2</sub>

EPA: ácido eicosapentanoico

ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares 1/2

ET: endotelina

FAK: quinasas de adhesión focal

FDA: *Food and Drug Administration*

FP: receptor de PGF<sub>2α</sub>

GC: guanilato ciclasa

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GPCR: receptor acoplado a proteínas G

HDAC: histona deacetilasa

HDL: lipoproteína de alta densidad

HODE: ácido hidroxioctadienoico

HTA: hipertensión arterial

HuR: *human antigen R*

ICAM: molécula de adhesión intercelular

IECA: inhibidores de la enzima convertora de angiotensina

IκB: inhibidor de NFκB

IKK: quinasa del inhibidor de NFκB

IL-1β: interleuquina 1β

IL-6: interleuquina 6

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IP: receptor de PGI<sub>2</sub>

IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trifosfato

IRAP: aminopeptidasa de membrana regulada por insulina

JAK: janus quinasa

JNK1/2: quinasa N-terminal de jun 1/2

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2)

NAD: nicotín adenin dinucleótido

NADPHox: nicotín adenin dinucleótido fosfato oxidasa

NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B

NO: óxido nítrico

NOXA1: *NOX activator 1*

NOXO1: *NOX organizer 1*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno 1

PAD: presión arterial diastólica

PAS: presión arterial sistólica

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PG: prostaglandina

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa

PIAS1: proteína inhibidora de STAT1 activada

PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC: proteína quinasa C

PLC: fosfolipasa C

PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas

PPRE: elemento de respuesta a PPAR

Pyk2: proteína tirosina quinasa 2

RXR: receptor del ácido 9-cis retinoico

ROS: especies reactivas de oxígeno

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

SOD: superóxido dismutasa

SRA: sistema renina-angiotensina

STAT: transductor de señal y activador de la transcripción

SUMO: modificadores tipo ubiquitina de pequeño tamaño

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$

TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteasas

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$

TP: receptor de TXA<sub>2</sub>

TKS4/5: sustrato de tirosín quinasa

TX: tromboxano

VCAM: molécula de adhesión vascular

VIC: péptido vasoactivo de contracción intestinal

VEGFR: receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

WKY: ratas Wistar Kyoto

XO: xantina oxidasa

XOR: xantina oxidorreductasa

## **RESUMEN/SUMMARY**



Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. De éstas, la hipertensión arterial es la más extendida, siendo responsable de un 12,8% de las muertes totales. Actualmente esta patología está considerada una enfermedad inflamatoria crónica y se relaciona con elevados niveles de citoquinas, de mediadores proinflamatorios como prostanoïdes derivados de la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (COX-2), así como de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos factores participan en el desarrollo de las alteraciones funcionales y estructurales de la pared vascular características de la patología hipertensiva. El sistema renina-angiotensina (SRA), a través de su principal péptido efector angiotensina II (Ang II), tiene un papel fundamental en el desarrollo de estos procesos inflamatorios. Por otra parte, el sistema endotelina (ET) es un importante modulador del tono vascular, el crecimiento y los mecanismos vasculares de control de la presión arterial; además posee acciones proinflamatorias, por lo que una alteración en el mismo también contribuye a la patología hipertensiva. Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) tienen importantes acciones antiinflamatorias ejercidas mediante la regulación de la expresión de genes por mecanismos de transrepresión. PPAR $\gamma$  se expresa en todas las células de la pared vascular, donde su activación tiene efectos protectores cardiovasculares a través de la regulación de la producción de citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión, la fibrinólisis, etc. Entre los mecanismos implicados en las acciones antiinflamatorias de los agonistas de PPAR $\gamma$  destaca su capacidad de reducir el estrés oxidativo.

El objetivo general de este trabajo ha sido analizar la modulación por PPAR $\gamma$  en la participación de ET-1 en la aumentada expresión de COX-2 en hipertensión, así como en el efecto de ET-1 sobre la contractilidad vascular. Para ello, se han utilizado: 1) aorta y arteria mesentérica de resistencia de ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY), espontáneamente hipertensas (SHR) y SHR tratadas con el agonista PPAR $\gamma$  pioglitazona o con el antagonista de receptores AT<sub>1</sub> losartán, y 2) cultivos primarios de músculo liso vascular (CMLV) de aorta de ratas WKY y SHR estimulados con Ang II y ET-1 en ausencia y en presencia de pioglitazona.

Los principales hallazgos de este trabajo son:

1. Pioglitazona reduce el incremento del estrés oxidativo y de la expresión vascular de COX-2, pre-pro-ET-1 y del receptor ET<sub>A</sub> asociados al SRA en hipertensión. Además, la glitazona aumenta la expresión de receptores ET<sub>B</sub>.

2. La estimulación con Ang II incrementa la expresión de COX-2, siendo este efecto mayor en CMLV de SHR que en WKY. Además, en células de SHR, pero no de WKY, Ang II aumenta los niveles de pre-pro-ET-1 que contribuye a la inducción de COX-2 por Ang II en estas células.

3. En cultivos de células de SHR, Ang II incrementa el estrés oxidativo por activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB. Estos mecanismos participan en la expresión de pre-pro-ET-1 y COX-2 inducida por Ang II.

4. Pioglitazona reduce los niveles de pre-pro-ET-1 y COX-2 inducidos por Ang II mediante la reducción de ROS por interferencia con AP-1 y NFκB.

5. En CMLV de SHR, ET-1, a través de receptores ET<sub>A</sub>, induce la expresión de COX-2 por mecanismos dependientes de la activación de AP-1 y NFκB y de la subsecuente producción de ROS.

6. Pioglitazona disminuye el estrés oxidativo interfiriendo con la activación de AP-1 y NFκB; estos mecanismos contribuyen a la reducción de la expresión de COX-2 inducida por ET-1 producida por el agonista PPARγ.

7. En arterias de SHR, pero no de WKY, ET-1, a través de receptores ET<sub>A</sub>, potencia la contracción a fenilefrina. Este efecto está mediado por el aumento de la participación de derivados de COX-2 que actúan a través de receptores TP, así como por la reducción de la participación de óxido nítrico (NO). Además, ET-1 aumenta la actividad NADPH oxidasa, lo que puede contribuir a la reducción de la biodisponibilidad de NO observada.

8. En arterias de ratas hipertensas tratadas con pioglitazona, ET-1, a través de receptores ET<sub>B</sub>, reduce la contracción a fenilefrina por incrementar la biodisponibilidad de

NO y su participación en la respuesta contráctil. Además, en estas condiciones, se observa una disminución de la actividad NADPH oxidasa.

En conclusión, los resultados de esta Tesis indican que pioglitazona disminuye la incrementada expresión vascular de COX-2 en hipertensión mediante la reducción tanto de la producción de ET-1 como de su efecto sobre la expresión de dicha enzima proinflamatoria. Además, la glitazona reduce la relación entre la expresión de receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, revirtiendo el efecto de ET-1 sobre la contracción a fenilefrina; en esta situación, ET-1 reduce dicha contracción debido al aumento en la biodisponibilidad de NO. La actividad antioxidante de este compuesto contribuye a los efectos vasculares mencionados. Estos resultados permiten avanzar en el conocimiento de los mecanismos que contribuyen a los efectos cardioprotectores de los agonistas PPAR $\gamma$  y de la importancia de estos compuestos en la mejora de la inflamación vascular asociada a la hipertensión.



Cardiovascular diseases are the major cause of mortality and morbidity worldwide. Of these, hypertension is the most frequent being responsible of 12.8% of total deaths. Nowadays hypertension is considered a chronic inflammatory disease associated with high levels of cytokines and proinflammatory mediators such as prostanoids derived from the inducible isoform of cyclooxygenase (COX-2) as well as reactive oxygen species (ROS). These factors participate in the development of the vascular functional and structural alterations characteristic of hypertension. Angiotensin II (Ang II), the main effector peptide of the renin-angiotensin system (RAS), has a key role in the development of these inflammatory processes. In addition, the endothelin (ET) system is an important modulator of the vascular tone, the growing and the vascular mechanisms of blood pressure control; in addition, ET-1 has proinflammatory effects. For this, an alteration in this system contributes to the hypertensive disease. Peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) have significant antiinflammatory actions through gene expression regulation by transrepression mechanisms. PPAR $\gamma$  is expressed in all cell types of the vascular wall, where its activation has cardioprotective effects by regulation of cytokines production, expression of adhesion molecules, fibrinolysis, etc. Among the mechanisms implicated in the anti-inflammatory actions of the PPAR $\gamma$  agonists its ability to reduce oxidative stress is of paramount importance.

The general aim of this study has been to analyze the modulation induced by PPAR $\gamma$  of the contribution of ET-1 to the increased COX-2 expression in hypertension, as well as of the ET-1 effect on vascular contractility. For this, we have used: 1) aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) from Wistar-Kyoto (WKY) rats, spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR treated with either the PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone or the AT $_1$  receptor antagonist losartan, and 2) primary cultures of vascular smooth muscle (VSMC) from WKY and SHR aorta which were stimulated with Ang II and ET-1 incubated or not with pioglitazone.

The main findings of this study are:

1. Pioglitazone reduces the RAS-associated oxidative stress and increase of vascular expression of COX-2 and pre-pro-ET-1 and its ET<sub>A</sub> receptor in hypertension. Moreover, the glitazone increases ET<sub>B</sub> receptor expression.

2. Ang II increases COX-2 expression, this effect being greater in VSMC from SHR than WKY. In addition, Ang II increases pre-pro-ET-1 levels only in cells from SHR. This effect contributes to Ang II-induced COX-2 expression in cells from this strain.

3. In cultured cells from SHR, Ang II increases oxidative stress by activation of the transcription factors AP-1 and NFκB. These mechanisms participate in Ang II-induced pre-pro-ET-1 and COX-2 expressions.

4. Pioglitazone reduces Ang II-induced pre-pro-ET-1 and COX-2 levels by decreasing ROS as a result of AP-1 and NFκB interference.

5. In VSMC from SHR, ET-1 induces COX-2 expression through ET<sub>A</sub> receptors; activation of AP-1 and NFκB and the subsequent ROS production play a role in this effect.

6. Pioglitazone reduces oxidative stress by interfering with AP-1 and NFκB activation. These mechanisms are involved in the reduction of ET-1-induced COX-2 expression caused by the PPARγ agonist.

7. Only in arteries from SHR, ET-1, binding to ET<sub>A</sub> receptors, potentiates phenylephrine-induced contraction. Activation of TP receptors by COX-2 derivatives as well as reduction in nitric oxide (NO) bioavailability participate in this effect. In addition, ET-1 increases NADPH oxidase activity, which can contribute to the observed reduction of NO bioavailability.

8. In arteries from hypertensive rats treated with pioglitazone, ET-1 reduces phenylephrine contraction through ET<sub>B</sub> receptors by increasing NO bioavailability and its participation in the contractile response. Furthermore, in this situation, a decrease of NADPH oxidase activity is observed.

In conclusion, the results of this Thesis demonstrate that pioglitazone diminishes the increased vascular COX-2 expression in hypertension through the reduction of ET-1 production and its effect on COX-2 expression. In addition, the glitazone reduces the ratio of the ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> expression. In this situation, ET-1 induces an opposing effect reducing phenylephrine-induced contraction as a consequence of increased NO bioavailability. The antioxidant activity of this compound contributes to these vascular effects. These results advance our understanding of the mechanisms that contribute to the cardioprotective effects of the PPAR $\gamma$  agonists and the importance of these compounds in the improvement of vascular inflammation associated to hypertension.



# **INTRODUCCIÓN**

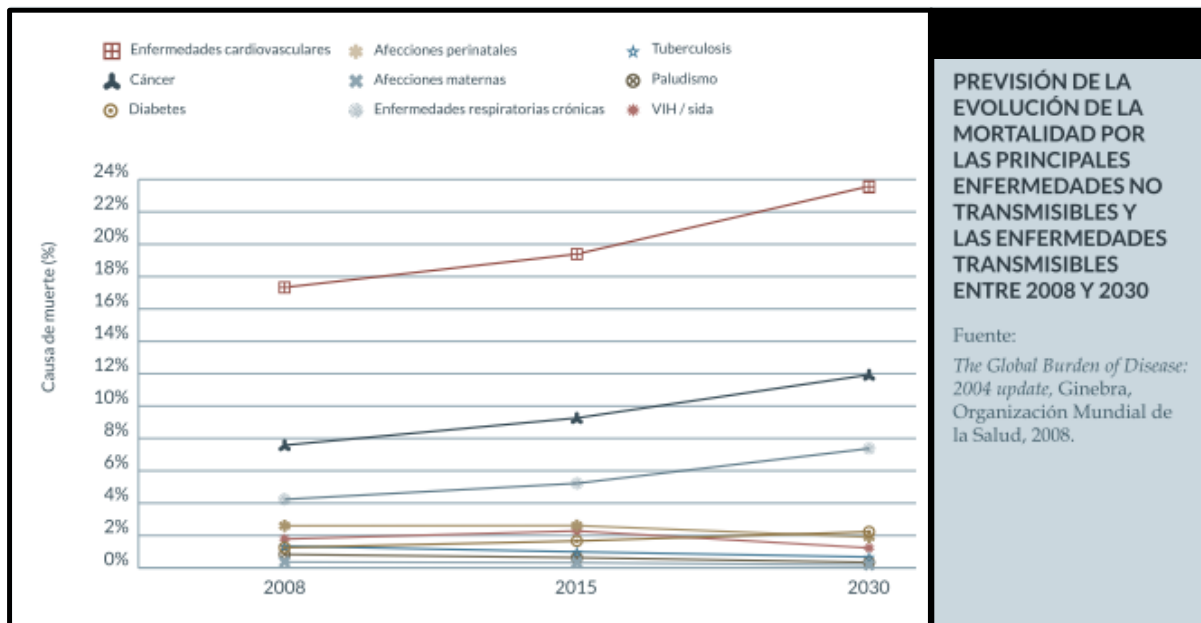


Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. La hipertensión arterial (HTA), caracterizada por un incremento de la resistencia vascular periférica, es uno de los principales factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la enfermedad cardíaca isquémica y al ictus. Esta patología se considera una enfermedad inflamatoria y, como tal, se relaciona con elevados niveles de marcadores proinflamatorios como citoquinas y enzimas proinflamatorias, entre las que se encuentra la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Sanz-Rosa *et al.*, 2005; Savoia y Schiffrin, 2006; Alvarez *et al.*, 2007), así como de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Redón *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2009). Todos estos mediadores contribuyen al desarrollo de alteraciones estructurales y funcionales asociadas a la hipertensión afectando a diversos órganos, incluyendo el sistema cardiovascular. Entre estas alteraciones destacan la disfunción en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, la mayor respuesta vasoconstrictora a diferentes agonistas (Alvarez *et al.*, 2005) o el remodelado vascular (Schiffrin y Touyz, 2004). Por otra parte, el sistema endotelina (ET) es un importante modulador del tono vascular, el crecimiento y los mecanismos vasculares de control de la presión arterial, además de poseer acciones proinflamatorias, de manera que una alteración en el mismo también contribuye a la patología hipertensiva. Otro de los factores que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de este proceso hipertensivo es el sistema renina-angiotensina (SRA); así, los fármacos que interfieren con este sistema, bien a nivel de síntesis de angiotensina II (Ang II), su principal péptido efector, o bien a nivel de receptor, son empleados frecuentemente en el tratamiento de la HTA, mostrando un alto grado de efectividad en el control de la presión arterial (Dohi *et al.*, 2003) y mejorando la disfunción endotelial (On *et al.*, 2002) y el remodelado vascular asociados con esta patología (Takai *et al.*, 2005). Por otro lado, los receptores activados por el proliferador de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), que se encuentran expresados en el sistema cardiovascular, tienen efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y vasodilatadores. La reducción en los niveles de este receptor que se ha descrito en hipertensión (Pérez-Girón, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Hernanz *et al.*, 2012; Akyürek *et al.*, 2014) puede contribuir al incremento de los procesos inflamatorios y oxidativos antes descritos (Xiong *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010).

En esta introducción se va a hacer una revisión del estado actual del conocimiento acerca de los mecanismos que contribuyen a la inflamación y las alteraciones vasculares en la hipertensión, así como el papel que ejerce la activación de PPARs sobre ellos.

### **Hipertensión arterial**

En 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS) elaboró un informe en el que ponía de manifiesto la importancia de concienciar a la población sobre el impacto y la peligrosidad de las enfermedades cardiovasculares en la salud pública. A nivel global, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes al año, casi un tercio del total (<http://bit.ly/OMSmuerte2008>). En la figura 1 se muestra la previsión de la evolución de la mortalidad a causa de las principales enfermedades no transmisibles hasta 2030; como se puede observar, las muertes por enfermedad cardiovascular superan ampliamente a las demás.



**Fig. 1:** Previsión de la evolución de la mortalidad por las principales enfermedades transmisibles y no transmisibles entre 2008 y 2030. Tomado de <http://bit.ly/WHO-2004update>.

En el ámbito de la enfermedad cardiovascular, la hipertensión y sus complicaciones causan aproximadamente 7,5 millones de muertes anuales, lo que supone el 12,8% de las muertes totales (<http://bit.ly/WHO-HTA>). La elevada incidencia de estas enfermedades

genera una gran carga económica para los sistemas de salud de los países. De hecho, se prevé que si no se toman medidas para combatir la hipertensión y otras enfermedades no transmisibles, las pérdidas económicas sobrepasarán al gasto público en salud (<http://bit.ly/1OYylq6>). La prevalencia de hipertensión en la población general es del 30-45% aunque este porcentaje aumenta con el envejecimiento (Mancia *et al.*, 2014). Los datos de la población española presentados por el presidente de la Sociedad Española de Hipertensión en su reunión anual celebrada en Marzo de 2015 van en el mismo sentido. Así, en nuestro país existen 14 millones de personas con hipertensión (lo que supone entre el 35 y 40% de la población, porcentaje que asciende hasta el 60-70% en mayores de 65 años), de los cuales 9,5 millones no están controlados, y de ellos 4 están sin diagnosticar. Asimismo, se estima que los gastos derivados de esta patología en nuestro país son de 3.600 millones de euros al año, un 7,5% del presupuesto sanitario anual.

La hipertensión se denomina primaria o esencial cuando no existe una causa específica definida que la produce; si existe una causa conocida (enfermedad renal, malformación de vasos sanguíneos,...) se le denomina hipertensión secundaria. La hipertensión esencial supone entre el 90 y el 95% de los casos totales y, aunque se desconoce la causa, se sabe que factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en su desarrollo (Carretero y Oparil, 2000).

Los valores de presión arterial óptimos para un adulto son <120 mm de Hg de presión arterial sistólica (PAS) y <80 mm de Hg de presión arterial diastólica (PAD) (120/80) (Mancia *et al.*, 2014). Se considera hipertensión una PAS superior a 140 mm de Hg y diastólica superior a 90 mm de Hg, aunque estos valores pueden variar en función de la edad o de la presencia de otras alteraciones concomitantes como diabetes o enfermedad renal. Además, se ha definido un estado prehipertensivo cuando los valores de presión arterial oscilan entre 120/80 mmHg y 139/89 mmHg (Mancia *et al.*, 2014; James *et al.*, 2014), ya que se incrementan las probabilidades de que estos sujetos tengan eventos cardiovasculares, además de un alto riesgo de desarrollar hipertensión. La hipertensión se puede dividir en distintos grados dependiendo de los valores de PAS y PAD. En la tabla 1 se muestran los tipos de hipertensión y el riesgo asociado a cada uno de ellos, tanto cuando se presenta

únicamente hipertensión como cuando aparecen factores de riesgo adicionales, como enfermedad renal crónica o diabetes.

Otros factores de riesgo, DO asintomático o enfermedad	Presión sanguínea (mm de Hg)			
	NORMAL ALTA  PAS 130-139  o PAD 85-89	HT GRADO 1  PAS 140-159  o PAD 90-99	HT GRADO 2  PAS 160-179  o PAD 100-109	HT GRADO 3  PAS ≥ 180  o PAD ≥ 110
Sin FR adicionales		Riesgo bajo	Riesgo moderado	Riesgo alto
1-2 FR	Riesgo bajo	Riesgo moderado	Riesgo moderado-alto	Riesgo alto
≥ 3 FR	Riesgo bajo-moderado	Riesgo moderado-alto	Riesgo alto	Riesgo alto
DO, CKD fase 3 o diabetes	Riesgo moderado-alto	Riesgo alto	Riesgo alto	Riesgo alto-muy alto
CVD sintomática, CKD fase ≥ 4 o diabetes con DO/FRs	Riesgo muy alto	Riesgo muy alto	Riesgo muy alto	Riesgo muy alto

**Tabla 1:** Riesgo cardiovascular según el grado de hipertensión y factores de riesgo adicionales. DO: daño orgánico; FR: factor de riesgo; CKD: enfermedad renal crónica; CVD: enfermedad cardiovascular establecida. Adaptada de Mancia *et al.*, 2014.

Tanto la guía de hipertensión europea (Mancia *et al.*, 2014) como la de EEUU (James *et al.*, 2014) recomiendan empezar tratamientos farmacológicos para reducir la presión sanguínea en pacientes con hipertensión grado 1, incluso en ausencia de otros factores de riesgo adicionales. Si el paciente tiene diabetes, enfermedad cardiovascular o renal se recomienda comenzar el tratamiento incluso cuando la presión sanguínea está en valores normales-altos. En todos los casos, se recomienda un cambio en el estilo de vida como mejoras en la alimentación (más vegetales, menos comidas grasas, menos sal), mantener una actividad física regular, reducir la ingesta de alcohol, reducir y mantener el peso corporal y dejar de fumar. En muchos casos la monoterapia resulta poco efectiva a la hora de reducir la presión a valores normales y hay que usar más de un fármaco. La tabla 2 muestra los principales grupos de fármacos que se emplean en la terapia antihipertensiva.

Indicaciones y contraindicaciones de las principales clases de fármacos antihipertensivos considerados de primera línea			
	Condiciones que favorecen su empleo	Contraindicaciones absolutas	Contraindicaciones relativas
<b>Diuréticos tiazídicos</b>	Hipertensión sistólica aguda (ancianos) Insuficiencia cardíaca Hipertensión en pacientes de raza negra	Gota	Síndrome metabólico Intolerancia a la glucosa Embarazo
<b>Bloqueantes <math>\beta</math></b>	Angina Postinfarto de miocardio Insuficiencia cardíaca Taquiarritmias Glaucoma Embarazo	Asma Bloqueo AV (grado 2-3)	Vasculopatía periférica Síndrome metabólico Intolerancia a la glucosa Deportistas y pacientes con actividad física EPOC
<b>Antagonistas de calcio</b>			
- <i>Dihidropiridinas</i>	Hipertensión sistólica aislada (ancianos) Angina Hipertrofia del ventrículo izquierdo Aterosclerosis en carótida o coronaria Embarazo Hipertensión en pacientes de raza negra		Taquiarritmias Insuficiencia cardíaca
- <i>Verapamilo, Diltiacem</i>	Angina Aterosclerosis Taquicardia supraventricular	Bloqueo AV (grado 2-3) Insuficiencia cardíaca	
<b>IECA</b>	Insuficiencia cardíaca Disfunción del ventrículo izquierdo Postinfarto de miocardio Nefropatía Hipertrofia del ventrículo izquierdo Aterosclerosis en carótida Proteinuria/microalbuminuria Fibrilación auricular Síndrome metabólico	Embarazo Edema angineurótico Hiperpotasemia Estenosis bilateral de la arteria renal	
<b>ARAI</b>	Insuficiencia cardíaca Postinfarto de miocardio Nefropatía diabética Hipertrofia del ventrículo izquierdo Proteinuria/microalbuminuria Fibrilación auricular Síndrome metabólico Tos inducida por IECA	Embarazo Hiperpotasemia Estenosis bilateral de la arteria renal	

**Tabla 2:** Indicaciones y contraindicaciones de las principales clases de fármacos antihipertensivos considerados de primera línea. IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII: antagonistas del receptor de angiotensina II; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Tomado de Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2009.

Se considera hipertensión resistente aquella en la que el tratamiento con 3 fármacos antihipertensivos diferentes, uno de ellos un diurético, no logra el objetivo de bajada de

presión sanguínea. En este caso, se pueden utilizar técnicas invasivas (cirugía) de estimulación de los barorreceptores de las carótidas o denervación renal (Mancia *et al.*, 2014).

Si no se controla, la hipertensión puede provocar infarto de miocardio, hipertrofia ventricular e insuficiencia cardíaca. En los vasos sanguíneos, la presión alta puede provocar dilataciones (aneurismas) y zonas de debilidad en la pared vascular, lo que aumenta las probabilidades de obstrucción y rotura. Además, la hipertensión puede causar insuficiencia renal, ceguera y deterioro cognitivo. La presión elevada en los vasos sanguíneos también puede causar fugas de sangre hacia el cerebro y desencadenar accidentes cerebrovasculares (<http://bit.ly/HTA2013OMS>). Aún en ausencia de accidente cerebrovascular, se ha encontrado que la hipertensión puede potenciar la pérdida de memoria y la neurodegeneración en presencia de un estímulo neuroinflamatorio (Goel *et al.*, 2015).

#### *Factores que influyen en el desarrollo de la hipertensión*

Uno de los fenómenos característicos de la hipertensión arterial es el incremento de la resistencia vascular periférica, asociado con alteraciones vasculares estructurales, mecánicas y funcionales, que aumenta el riesgo de accidentes cardiovasculares (Marchesi *et al.*, 2008; Paravicini y Touyz, 2008). En cuanto a las alteraciones funcionales, se ha demostrado en hipertensión arterial un aumento en la vasoconstricción en respuesta a diferentes sustancias vasoactivas como serotonina (Russell *et al.*, 2002), fenilefrina (Álvarez *et al.*, 2005) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1998; Gao y Lee, 2001), entre otros, y, principalmente, una disminución de la relajación dependiente de endotelio (Schulz *et al.*, 2008). Asimismo, se han descrito alteraciones en la sensibilización de la maquinaria contráctil al Ca<sup>2+</sup> que parecen participar en el incremento de la resistencia vascular en la hipertensión (Lee *et al.*, 2004). Respecto a las alteraciones estructurales, éstas incluyen remodelado vascular, con un incremento en la relación media/luz (Heagerty *et al.*, 2010; Mulvany, 2012; Rizzoni y Agabiti-Rosei, 2012). Además, el remodelado vascular se asocia con alteraciones de las propiedades mecánicas de la pared, como el incremento en la rigidez (Briones *et al.*, 2010; Martínez-Lemus y Galiñanes, 2011). Tanto la disfunción endotelial como el remodelado de pequeños vasos son factores pronósticos relevantes para eventos

cardiovasculares en poblaciones de alto riesgo (Rizzoni *et al.*, 2003; Mathiassen *et al.*, 2007; Münzel *et al.*, 2008).

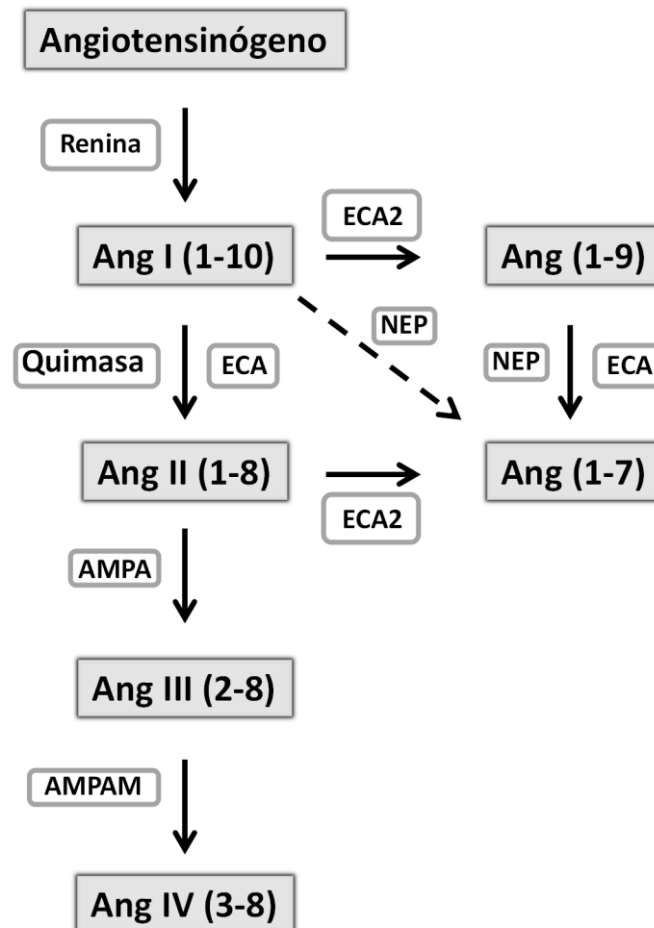
En los últimos años se ha establecido que la hipertensión es una enfermedad de naturaleza inflamatoria. Así, elevados niveles circulantes de moléculas inflamatorias son predictivos del inicio de hipertensión, tanto en pacientes como en modelos animales (Pauletto y Rattazzi, 2006; Savoia y Schiffrin, 2006). En la hipertensión se ha observado un aumento de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleuquina (IL)6, IL-1 $\beta$ , la isoforma inducida de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) y la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o CCL2), una elevada expresión y actividad de enzimas proinflamatorias como la COX-2, así como un incremento en el estrés oxidativo plasmático y vascular (Alvarez *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008; Paravicini y Touyz, 2008; Hernanz *et al.*, 2015; Dange *et al.*, 2015). También se encuentran incrementados la actividad del SRA (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006) y el sistema ET (Schiffrin y Thibault, 1991), lo que contribuye a su vez al incremento de la inflamación y al estrés oxidativo. Además, el aumento en la producción de ROS es responsable de la activación de factores de transcripción como el factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera  $\kappa$  de linfocitos B (NF $\kappa$ B) o la proteína activadora-1 (AP-1) (Bowie y O'Neill, 2000; Beswick *et al.*, 2001; Majzunova *et al.*, 2013), implicados en la inducción de la expresión de citoquinas como IL-1 $\beta$  y de enzimas como COX-2 (Tsatsanis *et al.*, 2006). Todo ello puede contribuir a las alteraciones vasculares estructurales y funcionales observadas en esta patología.

A continuación se presentan los mediadores más importantes que regulan el tono y la inflamación vascular cuya alteración puede jugar un papel importante en la patología hipertensiva.

### **Sistema renina-angiotensina**

El SRA juega un papel fundamental en el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares. Así, se ha descrito un incremento tanto en los niveles como en el grado de activación de los integrantes de este sistema en aterosclerosis (Hammoud *et al.*, 2007), diabetes (McGuire *et al.*, 2008) e hipertensión (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006; Boos y Lip, 2006;

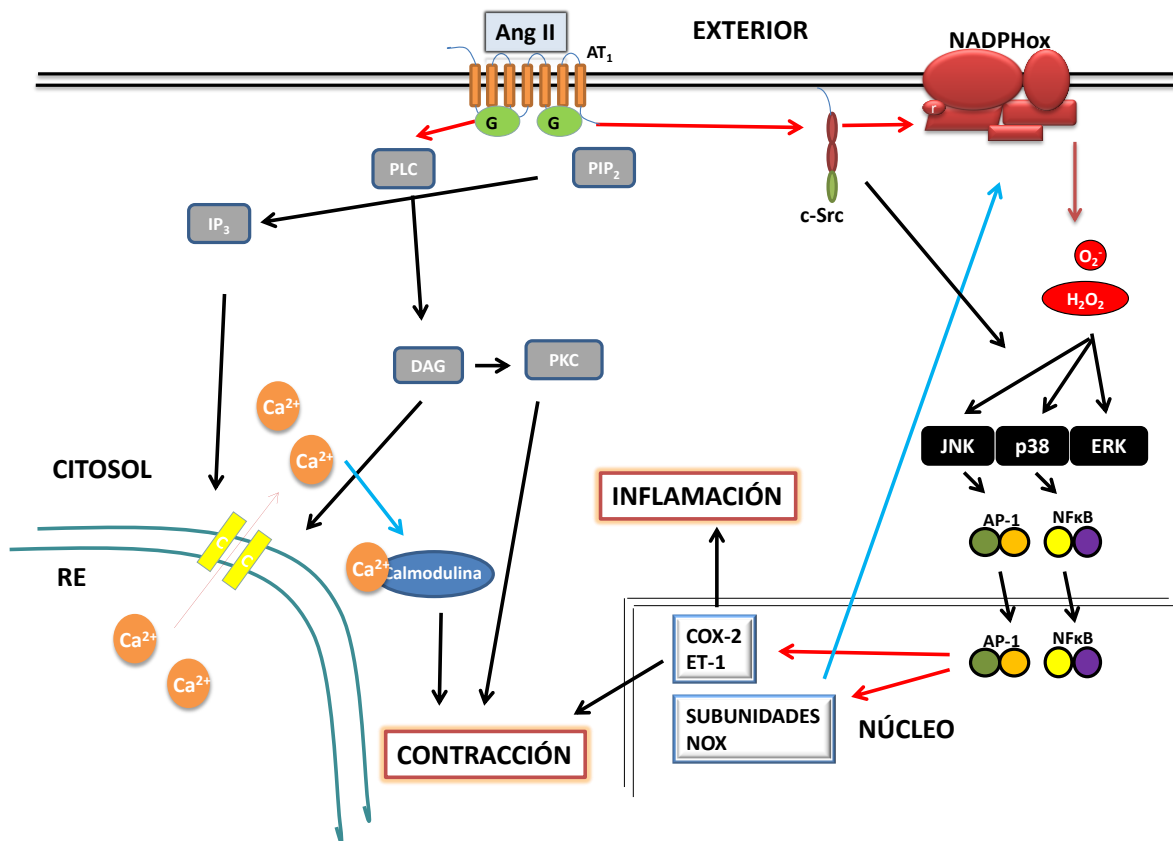
Kobori *et al.*, 2007). El SRA fue considerado originariamente un sistema estrictamente circulante; sin embargo, con el paso del tiempo, se han incrementado las evidencias a favor de su ubicuidad, detectándose sus componentes en tejidos y órganos como el cerebro, el riñón, la corteza adrenal, el corazón o la propia pared vascular (Touyz y Schiffrin, 2000; Bader *et al.*, 2001; Kobori *et al.*, 2007). El principal péptido efector de la vía es la Ang II, la cual se sintetiza por acción de la renina. La renina activa es capaz de escindir una proteína circulante liberada de forma constitutiva por el hígado llamada angiotensinógeno, produciendo Ang I, péptido de 10 aa sin actividad biológica. Ang I será sustrato de la enzima convertora de angiotensina (ECA) para dar lugar a la Ang II de 8 aa (Fig. 2). El paso limitante de esta vía es la producción de renina por las células granulares del aparato yuxtglomerular. La liberación de renina se regula por determinados estímulos; en general, la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , el AMPc y el GMPc pueden modular esta liberación de renina (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1989; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Son inhibidores de esta secreción de Ang II el péptido natriurético auricular, la sustancia P y ET-1; por otro lado, son activadores la forskolina, la bradiquinina, la histamina y los agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Karlberg, 1983; Pinet *et al.*, 1987; Pedraza-Chaverri *et al.*, 1989; Rossi *et al.*, 1999). La disminución de los niveles de  $\text{Na}^+$  y de la presión sanguínea activa la liberación de renina (Humphreys *et al.*, 1975; Thrasher, 1994).



**Fig. 2:** Esquema del sistema renina-angiotensina. Ang: angiotensina; ECA: enzima convertora de angiotensina; AMPA: aminopeptidasa A; AMPM: aminopeptidasa M; NEP: endopeptidasa neutra.

Ang II ejerce sus efectos a través de la unión a receptores  $AT_1$  y  $AT_2$ , ambos acoplados a proteínas G. Los receptores  $AT_1$ , de los cuales se han caracterizado y clonado dos isoformas,  $AT_{1a}$  y  $AT_{1b}$ , se expresan en muchos tejidos incluyendo riñón, glándulas adrenales y sistema cardiovascular (Murphy *et al.*, 1991; Sasamura *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1995). Los receptores  $AT_2$  se expresan mayoritariamente en tejidos fetales, reduciéndose sus niveles según avanza el desarrollo. A pesar de ello, su expresión es detectable en órganos reproductores, páncreas, riñón, médula, corazón y, al igual que los  $AT_1$ , en la vasculatura (Touyz y Schiffrin, 2000). A nivel vascular ambos receptores están localizados en células endoteliales, células de músculo liso vascular (CMLV) y en fibroblastos (Nguyen y Touyz, 2011).

Tras la unión de Ang II a su receptor AT<sub>1</sub>, se activan una serie de cascadas de señalización intracelular que regulan los efectos fisiológicos del péptido (Fig. 3). Así, se activa la fosfolipasa C (PLC), que rompe el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG); ambos producen la acumulación de Ca<sup>2+</sup> en el citosol de las CMLV produciendo vasoconstricción. Aunque el receptor AT<sub>1</sub> no posee actividad quinasa *per se*, existen tirosina quinasas asociadas con este receptor, como c-Src, que permiten el inicio de los eventos de señalización a través de la activación de varias proteínas intracelulares como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) o la vía JAK/STAT (janus quinasa/transductor de señal y activador de la transcripción); esto conduce a la transcripción de genes, como las quinasas de adhesión focal (FAK) y adaptadores moleculares como p130cas, que regulan la proliferación, adhesión y transformación celular (Mehta y Griendling, 2007). Además, la activación de diversas MAPK como ERK1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares), JNK1/2 (quinasa N-terminal de jun) y p38, activa, entre otros, factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 y NFκB, que conducen a una regulación positiva de procesos de inflamación, diferenciación, proliferación, migración y fibrosis de las CMLV, así como al incremento del estrés oxidativo (Fig. 3) (Touyz y Schiffrin, 2000; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2010). Por otra parte, Ang II puede producir transactivación de receptores de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) (Saito y Berk, 2001; Pagé *et al.*, 2002; Andrae *et al.*, 2008). A través de AT<sub>1</sub>, Ang II también regula la producción de ROS procedente de diversas fuentes (Rajagopalan *et al.*, 1996; Schieffer *et al.* 2000; Álvarez *et al.*, 2007; Dikalov *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2015), así como la expresión y la actividad de COX-2, y en consecuencia, la liberación de prostanoïdes (Mistry y Nasjletti, 1990; Sarkis y Roman, 2004; Alvarez *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008; Beltrán *et al.*, 2009; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Además, Ang II puede activar a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Rao *et al.*, 1994) para producir ácido araquidónico (AA), sustrato de COX-2 (Davidge, 2001).

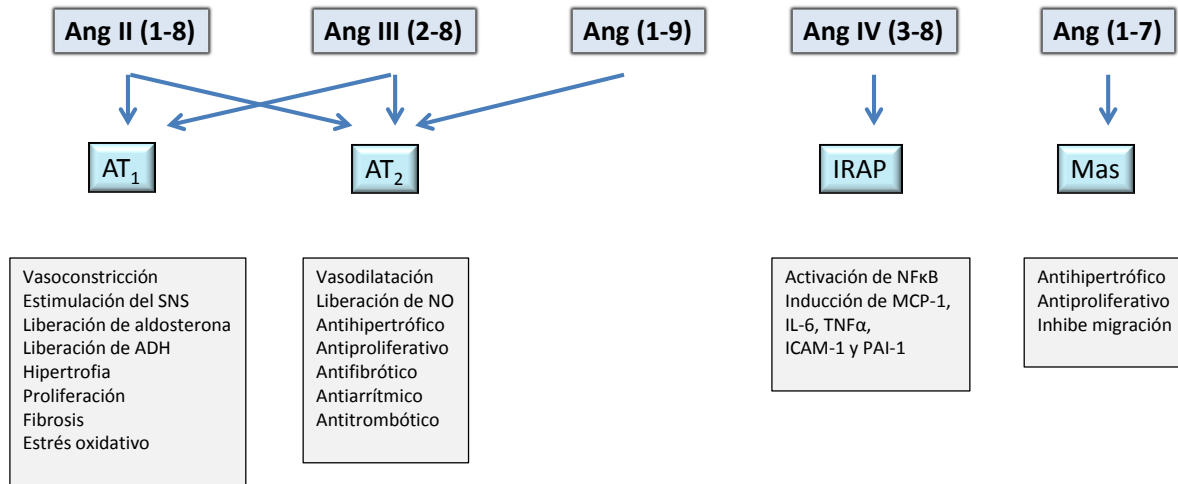


**Fig. 3:** Activación de mecanismos contráctiles y proinflamatorios por Ang II a través de receptores AT<sub>1</sub>: receptor de Ang II tipo 1; Ang II: angiotensina II; AP-1: proteína activadora-1; COX-2: ciclooxigenasa-2; DAG: diacilglicerol; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; ET-1: endotelina-1; G: proteína G; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; JNK: quinasa N-terminal de jun; NADPHox: nicotín adenin dinucleótido fosfato oxidasa; NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKC: proteína quinasa C; PLC: fosfolipasa C; RE: retículo endoplásmico.

A través de la unión a los receptores AT<sub>2</sub>, Ang II induce vasodilatación en diversos tipos de arterias aisladas que incluyen renales, cerebrales y mesentéricas (Widdop *et al.*, 2003). Esta relajación puede ser dependiente (Arima *et al.*, 1997; Matrougui *et al.*, 1999) o independiente (Dimitropoulou *et al.*, 2001) de endotelio e implica vías de señalización que incluyen liberación de óxido nítrico (NO) (Matrougui *et al.*, 1999), producción de bradiquinina (Katada y Majima, 2002), activación del citocromo P-450 (Arima *et al.*, 1997) y modulación de la actividad de canales de K<sup>+</sup> (Arima *et al.*, 1997; Dimitropoulou *et al.*, 2001). Además, a través de AT<sub>2</sub>, Ang II estimula fosfatasa que defosforilan proteínas quinasas como JAK y factores de transcripción como STAT, los cuales, como se ha mencionado anteriormente, estimulan la proliferación de las CMLV (Widdop *et al.*, 2003). Así, esta vía

puede revertir, o al menos contrarrestar, los efectos proliferativos y promotores del crecimiento celular mediados por la activación de  $AT_1$ .

Aunque el principal efector del SRA es la Ang II, existen otros componentes con acciones biológicas, los cuales se muestran en la figura 4.



**Fig. 4:** Otras sustancias biológicamente activas del sistema renina-angiotensina, receptores sobre los que actúan y sus principales efectos. ADH: hormona antidiurética; Ang: angiotensina; AT: receptor de angiotensina; ICAM: molécula de adhesión intercelular-1; IL-6: interleuquina 6; NO: óxido nítrico; IRAP: aminopeptidasa de membrana regulada por insulina; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno; TNFα: factor de necrosis tumoral α. Adaptado de Fyhrquist y Saijonmaa, 2008.

**Ang III (Ang 2-8):** Hexapéptido generado por la proteólisis de la Ang II llevada a cabo por la aminopeptidasa A (Fig. 2). Utiliza los mismos receptores que Ang II, por lo que tiene efectos parecidos (Fig. 4), aunque puede ser más importante en algunos procesos, como en la liberación de vasopresina (ADH) (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

**Ang IV (Ang 3-8):** Hexapéptido generado por la proteólisis de Ang III llevada a cabo por la aminopeptidasa M (Fig. 2). Realiza sus funciones a través de receptores  $AT_4$ , recientemente identificados como aminopeptidasas reguladas por insulina (IRAP). Produce activación de NFκB, dando lugar a un incremento del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), CCL2 (ligando del motivo C-C) o MCP-1, IL-6 y TNFα. Parece que Ang

IV está implicada en la respuesta inflamatoria vascular y, por tanto, podría jugar un papel en la patofisiología cardiovascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

**Ang (1-9):** Se genera por la proteólisis de la Ang I que produce la ECA-2 (Fig. 2). Se ha descrito que es un regulador de la hipertrofia cardiaca (Ocaranza *et al.*, 2010) y que puede inhibir la proliferación (Flores-Munoz *et al.*, 2012) y la migración de CMLV (Mckinney *et al.*, 2014). Produce sus efectos a través de la activación de receptores AT<sub>2</sub> (Zheng *et al.*, 2015a) (Fig. 4).

**Ang (1-7):** La Ang II también puede ser sustrato de la ECA-2 dando lugar a la Ang (1-7), aunque este heptapéptido también puede originarse por la proteólisis de Ang (1-9) producida por la endopeptidasa neutra o la ECA, así como a partir de la Ang I por acción de la endopeptidasa neutra (Fig. 2). Tiene una afinidad baja por receptores AT<sub>1</sub> (es un agonista parcial), lo que le permite activar el receptor en ausencia de Ang II pero actuar como un antagonista en su presencia. Realiza sus funciones principalmente a través de receptores Mas (Fig. 4), produciendo efectos como vasodilatación o inhibición de la proliferación (Ferrario *et al.*, 2005; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

#### *Sistema renina-angiotensina en hipertensión*

La implicación del SRA en hipertensión no es un hecho discutido en la actualidad. Así, la hipertensión se relaciona con un incremento en la actividad del SRA y en los niveles circulantes de Ang II, y se ha descrito que la infusión de Ang II incrementa la presión arterial (Ryan *et al.*, 2004). Algunos autores han descrito niveles aumentados de AT<sub>1</sub> en hipertensión, receptor a través del cual Ang II produce sus efectos hipertensivos (Dhar *et al.*, 2013; Bhatt *et al.*, 2014). Todo ello justifica que, como se observa en la tabla 2, un gran grupo de fármacos de elección en el tratamiento de la hipertensión actúe sobre el SRA a diferentes niveles.

Además de los conocidos efectos a nivel central y renal, las acciones vasculares de Ang II pueden contribuir a explicar el incremento de la presión arterial atribuido al SRA. La Ang II no sólo está implicada en la contracción vascular, sino que, como hemos mencionado,

induce efectos tróficos sobre las CMLV a través de la activación de distintas vías implicadas en crecimiento, inflamación, migración y respuestas fibróticas (Rajagopalan *et al.*, 1996; Touyz y Schiffrin, 2000; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Taniyama *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Ruiz-Ortega *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que Ang II es crucial para la integridad y el funcionamiento de la pared vascular, de manera que el incremento en los niveles de Ang II asociado a la hipertensión juega un papel importante en las alteraciones, tanto funcionales como estructurales, que se observan en dicha enfermedad (Mehta y Griendling, 2007). La Ang II participa en el remodelado vascular asociado a la hipertensión regulando el crecimiento celular, la hipertrofia/hiperplasia y la fibrosis tisular y facilitando la deposición de proteínas de matriz extracelular (Schiffrin y Touyz, 2004). En este sentido, pacientes hipertensos tratados con IECAs o antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> de Ang II mostraron una regresión significativa del remodelado vascular en grandes y pequeñas arterias con independencia de los cambios hemodinámicos (Malik *et al.*, 2005; Boutouyrie *et al.*, 2011; Briet y Schiffrin, 2013). Estos cambios estructurales asociados a la hipertensión van acompañados de cambios funcionales en los cuales Ang II juega un papel importante. Así, Ang II aumenta la producción de sustancias contráctiles o las respuestas vasoconstrictoras de las mismas y está implicada en el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes (Schiffrin y Touyz, 2004; Mehta y Griendling, 2007).

Entre los mecanismos por los que Ang II contribuye a las alteraciones funcionales y estructurales asociadas a la hipertensión, destaca el aumento en la producción de ROS, la reducción de la biodisponibilidad de NO y la inducción de la síntesis de prostanoides (Rajagopalan *et al.*, 1996; Schieffer *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2007; Dikalov *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2015). En secciones posteriores se presentarán evidencias del papel de estos mediadores en la función y estructura vascular y de como su alteración participa en la fisiopatología de la hipertensión. Además, el efecto proinflamatorio de Ang II a nivel local puede contribuir a las alteraciones vasculares que acompañan a la hipertensión. Así, en hipertensión aumenta localmente la permeabilidad de los vasos mediante daño endotelial mediado por el incremento de la presión arterial y por la liberación de segundos mensajeros activados por AT<sub>1</sub>, como prostaglandinas y el VEGF (Pagé *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003). Además de favorecer la infiltración celular, Ang II interviene en el reclutamiento de

leucocitos a través de sus receptores  $AT_1$  y  $AT_2$ , modulando la expresión de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales por mecanismos que implican ROS y MAPK (Touyz, 2005). Por otra parte, en la microcirculación mesentérica de rata se ha descrito que Ang II induce la adhesión de leucocitos a través del aumento en la expresión de P-selectina, E-selectina e integrinas  $\alpha_4$  y  $\beta_2$  (Alvarez *et al.*, 2004). Además, Ang II modula la producción de citoquinas y quimioquinas que también intervienen en el proceso de reclutamiento de leucocitos (Marchesi *et al.*, 2008). Por último, Ang II participa en la reparación del tejido dañado mediante la activación de la proliferación y fibrosis que contribuyen al remodelado vascular (Kurosaka *et al.*, 2009; Louis *et al.*, 2011). El aumento del estrés oxidativo y la activación de factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 y NF $\kappa$ B por Ang II también son esenciales para el desarrollo de este proceso inflamatorio (Touyz y Schiffrin, 2000; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005).

### **Endotelinas**

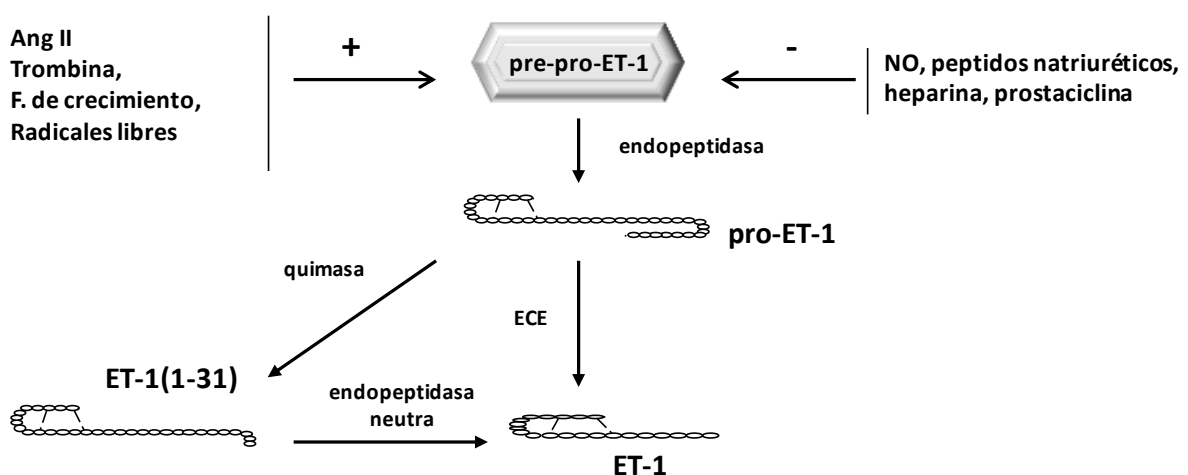
La familia de las endotelinas son un grupo de péptidos vasoactivos que se generan como pre-pro-péptidos, que tras 2 procesamientos adquieren su forma final como péptidos de 21 aa. Esta familia comprende a endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) y endotelina-3 (ET-3); además, en murinos existe un péptido homólogo de ET-2 llamado péptido vasoactivo de contracción intestinal (VIC), también conocido como endotelina-4 (ET-4), que se diferencia de ET-1 en 3 aa y de ET-2 en 1 (Saida *et al.*, 1989; Masuo *et al.*, 2003). También existen unos péptidos de 21 aa con dos puentes disulfuro, presentes en el veneno de las serpientes de la familia *Atractaspididae*, llamados sarafotoxinas, que pertenecen a la familia de las endotelinas y que tienen propiedades vasoactivas; el miembro más conocido es la sarafotoxina 6c (Ducancel, 2005).

Todos los miembros de la familia producen efectos presores. Cuando se inyecta ET-1 en bolo en arterias coronarias de cerdo se observa, en primer lugar, una relajación del vaso de unos 2 min de duración que va seguida de una respuesta presora que ocurre entre los 10 y 20 min; a continuación hay una depresión que dura entre 3 y 10 min, seguida de una nueva respuesta constrictora de más de una hora de duración. Este aumento bifásico de la

presión arterial no se observa con ET-3. ET-2 produce un efecto más potente y duradero mientras que ET-3 produce un efecto más débil (Inoue *et al.*, 1989).

### ET-1

ET-1 fue aislada originalmente del sobrenadante de cultivo de células endoteliales de aorta de cerdo (Yanagisawa *et al.*, 1988) y constituye el miembro más importante y abundante de la familia de las endotelinas (Barton y Yanagisawa, 2008). En humanos, el gen de ET-1 se encuentra en el cromosoma 6 y codifica un producto de aproximadamente 200 aa, pre-pro-endotelina-1, que es escindido por endopeptidasas neutras (*furin-like pro-protein convertase*), dando lugar a un péptido de 39 aa denominado pro-endotelina o *big endothelin*; este péptido, tras ser procesado por la enzima convertora de endotelina (ECE), da lugar a un péptido de 21 aa, que será la forma madura de ET-1; sin embargo, si es procesado por una quimasa produce un péptido vasoactivo de 31 aa llamado ET-1(1-31), que posteriormente es transformado en ET-1 por la acción de endopeptidasas neutras (Fig. 5) (Fecteau *et al.*, 2005; Barton y Yanagisawa, 2008). Una vez sintetizada, la ET-1 puede secretarse mediante una vía constitutiva (Harrison *et al.*, 1995) y otra regulada a través de cuerpos de Weibel-Palade (Doi *et al.*, 2002), aunque se ha observado que los estímulos que incrementan este tipo de liberación inicialmente activan la transcripción del gen (Doi *et al.*, 2004).



**Fig. 5:** Esquema del procesamiento de pre-pro-endotelina-1 (pre-pro-ET-1). ECE: enzima convertora de endotelina; Ang II: angiotensina II; NO: óxido nítrico.

En el lecho vascular, ET-1 es producida principalmente en las células endoteliales, aunque también puede ser generada en otros tipos celulares de la pared vascular incluyendo CMLV o macrófagos infiltrados (Yanagisawa *et al.*, 1988; Hahn *et al.*, 1990; Hong *et al.*, 2004; Mencarelli *et al.*, 2009). No obstante, su expresión no se limita al lecho vascular ya que se puede encontrar en una amplia variedad de tejidos con niveles de expresión variable (Randall *et al.*, 1989; Giannessi *et al.*, 2001). Desde el punto de vista fisiológico, la ET-1 regula multitud de funciones; tanto es así, que los ratones KO para el péptido no son viables y mueren tras el nacimiento (Kisanuki *et al.*, 2010). A nivel vascular, uno de los principales efectos de ET-1 es su contribución al mantenimiento del tono basal (Haynes y Webb, 1994).

El principal mecanismo de control de la producción de ET-1 es la regulación de la transcripción génica, principalmente por factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 y NFκB, para los cuales el gen de la ET-1 posee elementos de respuesta (Lorenz *et al.*, 2009; Rodríguez-Pascual *et al.*, 2011; Stow *et al.*, 2011). Además, también es importante la regulación de la estabilidad de su mensajero mediante elementos ricos en AU en la región 3' UTR (Reimunde *et al.*, 2005). Existen diversos estímulos que pueden activar la expresión de ET-1 como Ang II (Cheng *et al.*, 2003), trombina (Delerive *et al.*, 1999), hipoxia (Doi *et al.*, 2004) y las lipoproteínas de alta densidad (Hu *et al.*, 1994); también está ampliamente descrita la capacidad de las ROS de incrementar los niveles de ET-1 (Cheng *et al.*, 2003; Schiffrin, 2005). Por el contrario, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, y los péptidos natriuréticos auricular y cerebral inhiben su producción y su liberación (Khimji y Rockey, 2010).

### Receptores de ET-1

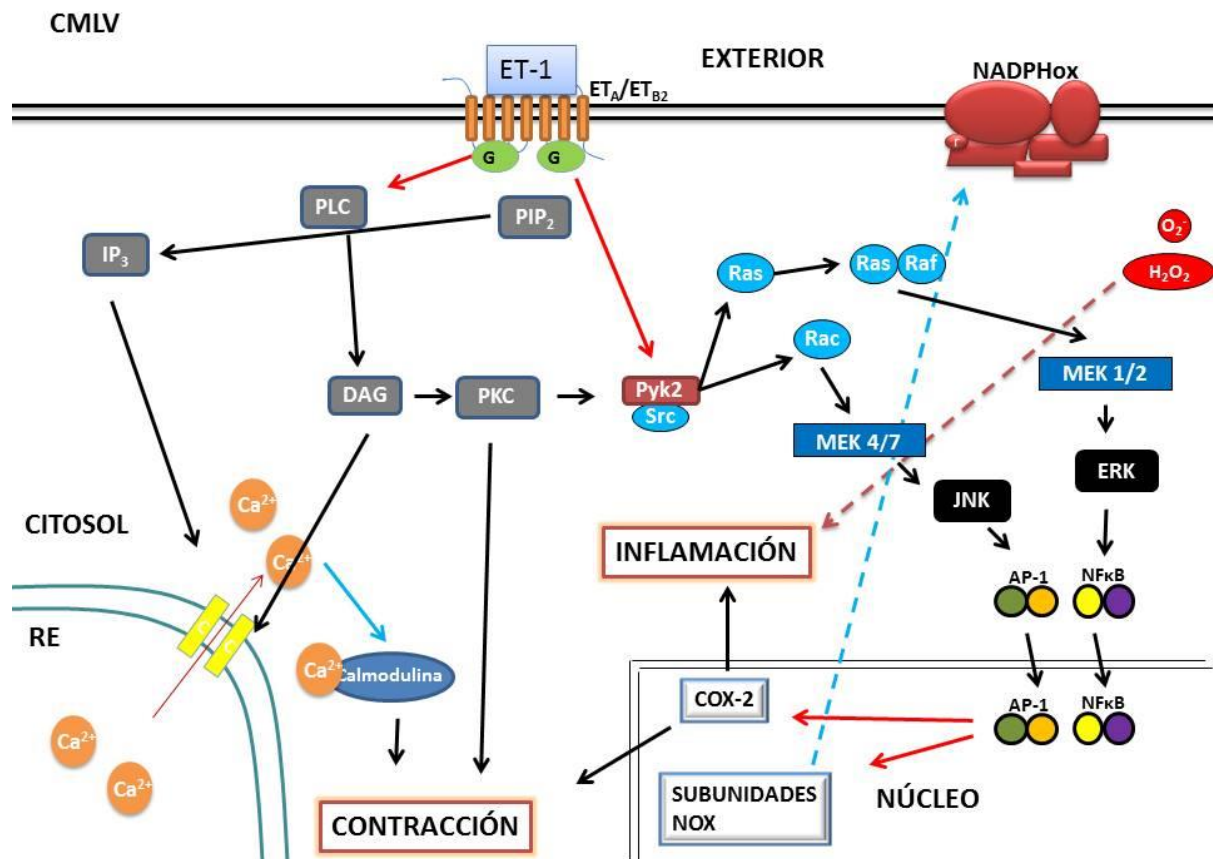
Hasta la fecha se ha descrito la existencia de 3 receptores de endotelina, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> y ET<sub>C</sub>, que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> muestran un patrón de distribución específico de tejido y una diferente función en cada uno (Tabla 3) (Khimji y Rockey, 2010). Sus pesos moleculares están entre 45 y 50 kDa, y presentan una homología del 50% en su secuencia aminoacídica, a la vez que un alto grado de conservación en mamíferos (80-90 %) (Levin, 1995).

	Tipo de receptor	Papel fisiológico
<b>Células endoteliales</b>	ET <sub>B</sub>	Control del tono vascular, aclaramiento de ET-1 circulante
<b>CML</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Control del tono del músculo liso, proliferación celular
<b>Miofibroblastos</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Contractilidad y síntesis de proteínas de matriz extracelular
<b>Cardiomiocitos</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Proliferación celular, contracción, apoptosis inducida por hipoxia
<b>Hepatocitos</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Metabolismo energético hepático (inducción de glucógeno fosforilasa y de la gluconeogénesis), síntesis y metabolismo de ET
<b>Células del túbulo colector renal</b>	ET <sub>B</sub>	Reabsorción tubular
<b>Neuronas</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Elongación de la neurita, respuesta a estrés y apoptosis neuronal
<b>Osteoblastos</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Proliferación y diferenciación de osteoblastos, activación de la síntesis de matriz extracelular ósea
<b>Queratinocitos</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Proliferación y melanogénesis
<b>Adipocitos</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Metabolismo lipídico y glucídico

**Tabla 3:** Distribución de receptores de ET y papel fisiológico. CML: células de músculo liso. Adaptada de Khimji y Rockey, 2010.

ET<sub>A</sub> tiene 427 aa y está codificado por un gen localizado en el cromosoma 4. Su especificidad por ET-1 y ET-2 es mucho mayor que por ET-3. Está principalmente expresado en CMLV y cardiomiocitos (Schorlemmer *et al.*, 2008; Deacon y Knox 2010). Se asocia a proteínas Gq/G11 (Takigawa *et al.*, 1995). La unión de ET-1 a los receptores ET<sub>A</sub> de las CMLV puede dar lugar a una respuesta vasoconstrictora, por activación de la PLC y aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Schiffrin, 2005; Böhm *et al.*, 2007). Además, mediante la activación de estos receptores ET-1 ejerce una potente actividad mitogénica y actúa como mediador de la respuesta inflamatoria vascular por la activación de distintas quinasas (Chiloeches *et al.*, 1999; Kodama *et al.*, 2003; Luttrell y Luttrell, 2004; Schorlemmer *et al.*, 2008). Por otra parte, también se ha demostrado la capacidad de ET-1 para incrementar la producción de ROS (Laplante *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010), activar PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) y factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 y NFκB (Montezano *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2012), así como diferentes isoformas de proteína

quinasas (Chen *et al.*, 2009). Estas vías de señalización llevan a la inducción de moléculas de adhesión celular o de enzimas proinflamatorias, incluyendo COX-2 (Montezano *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2012) (Fig. 6).



**Fig. 6:** Activación de distintas rutas de señalización por ET-1 a través de receptores ET<sub>A/B2</sub> en CMLV. AP-1: proteína activadora-1; ET<sub>A</sub>: receptor de ET-1 tipo A; ET<sub>B2</sub>: receptor de ET-1 tipo B2; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; JNK: quinasa N-terminal de jun; PKC: proteína quinasa C; Pyk2: proteína tirosina quinasa 2; MEK: quinasa de MAPK; NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; Ras, Raf y Rac: pequeñas GTPasas.

ET<sub>B</sub> tiene 442 aa y el gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 13. Se han observado dos variantes por *splicing*; una de ellas tiene 10 aa adicionales, pero su función no difiere del original; la otra tiene un dominio intracelular muy reducido y se cree que funciona como mecanismo de aclaramiento de ET-1 (Battistini *et al.*, 1994; Mizuguchi *et al.*, 1997; Davenport, 2002; Kohan *et al.*, 2011). Posee la misma especificidad para todos los péptidos de la familia de las endotelinas. Se une a proteínas G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub> y G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> (Takigawa *et al.*, 1995). En humanos se encuentra una expresión elevada de ET<sub>B</sub> en riñón, hígado y

pulmón, con un patrón de expresión que refleja los altos niveles del receptor en células endoteliales y otras células similares, como las células epiteliales (Maguire y Davenport, 2015). A nivel vascular, los receptores ET<sub>B</sub> se localizan en el endotelio y en las CMLV, donde tienen un papel controvertido, pues pueden producir efectos diferentes, e incluso opuestos. Además, en condiciones patológicas puede cambiar su patrón de expresión y de funcionamiento (Iglarz *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015b). Algunos agonistas y antagonistas son capaces de discriminar entre los receptores ET<sub>B</sub> presentes en endotelio y los que están en CMLV, permitiendo elaborar una clasificación meramente funcional. Así, ET<sub>B1</sub> está presente en células endoteliales y media aclaramiento de ET-1 (Fukuroda *et al.*, 1994) y vasodilatación mediante la liberación de PGI<sub>2</sub>, factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) y NO (Schiffrin, 2005; Böhm *et al.*, 2007), mientras que ET<sub>B2</sub> está presente en CMLV y es responsable de la inducción de vasoconstricción y proliferación por mecanismos similares a los mediados por ET<sub>A</sub> (Seo *et al.*, 1994; Schiffrin *et al.*, 1995b; Iglarz *et al.*, 2015) (Fig. 6). Por otra parte, ET<sub>B</sub> puede formar heterodímeros con otros receptores como ET<sub>A</sub>; este receptor heterólogo presenta un retraso en la internalización, produciendo un incremento de Ca<sup>2+</sup> más sostenido (Evans y Walker, 2008).

ET<sub>C</sub> se clonó de los melanóforos de *Xenopus laevis* y está implicado en la movilización de pigmentos. No se han encontrado homólogos en mamíferos por lo que farmacológicamente su existencia es testimonial (Karne *et al.*, 1993; Davenport, 2002).

#### *Otros péptidos de la familia de las endotelinas*

**ET-1(1-31):** Al igual que ET-1, ET-1(1-31) produce vasoconstricción a través de receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Rossi *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2001). Además, este péptido proporciona una señal quimiotáctica más potente que la de la propia ET-1 mediante el incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular tras la activación de receptores ET<sub>A</sub> (Cui *et al.*, 2001)

**ET-2/VIC:** Es producida principalmente en riñón e intestino y además es clave en la homeostasis energética, la termorregulación y el mantenimiento de la morfología y la función del pulmón. Los ratones deficientes en ET-2 sufren retraso del crecimiento y muerte prematura, mientras que aquellos deficientes en ET-2 sólo en pulmón muestran estructuras

enfisematosas con hipoxemia crónica (Chang *et al.*, 2013). También se ha observado un papel de ET-2 en la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Cacioppo *et al.*, 2014). Como hemos comentado, VIC es el análogo de ET-2 que se encuentra presente en murinos.

**ET-3:** Es producida principalmente en cerebro, intestino y células del túbulo renal (Masaki, 1998). Se ha descrito que ET-3 está implicada en el desarrollo del sistema nervioso entérico (Gisser *et al.*, 2013) y actúa sobre el cerebro para regular la ingesta de sal contribuyendo al mantenimiento de los niveles de Na<sup>+</sup> de los líquidos corporales (Hiyama *et al.*, 2013). Se une a receptores ET<sub>B1</sub> (Davenport, 2002) y ET<sub>B2</sub>, mostrando a través de estos últimos capacidad antiinflamatoria a bajas concentraciones (Sato y Ebina, 2013). Por otra parte, es el único péptido de la familia que se une a ET<sub>C</sub> (Davenport, 2002).

### *Endotelina en hipertensión*

El sistema endotelina está implicado en el desarrollo de diversas patologías como insuficiencia cardiaca, arterioesclerosis y diabetes (Schiffrin, 2005; Giachini *et al.*, 2008). En algunos modelos de hipertensión el incremento de presión arterial se ha correlacionado con un aumento en la síntesis vascular de ET-1 (Schiffrin, 2001). Así, en la hipertensión inducida por sal, el tratamiento con un antagonista de receptores de ET-1 reduce la presión arterial (Schiffrin *et al.*, 1995a) y revierte el remodelado hipertrófico que se produce en esta patología (Li *et al.*, 1994). Sin embargo, en el modelo de hipertensión genética de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), la ET-1 no parece jugar un papel importante, aunque la respuesta vasoconstrictora a ET-1 está incrementada (Montagnani *et al.*, 1999).

En pacientes con hipertensión esencial se han observado elevadas concentraciones plasmáticas de ET-1 (Saito *et al.*, 1990, Haak *et al.*, 1992), aunque también se han reportado niveles normales (Schiffrin y Thibault, 1991). En realidad nunca se ha establecido una correlación demasiado consistente en pacientes hipertensos entre los niveles plasmáticos de ET-1 y la hipertensión, a excepción de en pacientes afroamericanos (Ergul *et al.*, 1996), pacientes con deterioro en el aclaramiento renal (Hoffman *et al.*, 1994) o en casos de hipertensión severa (Schiffrin *et al.*, 1997). Por otra parte, el organismo es capaz de aclarar el péptido con mucha eficacia (Khimji y Rockey, 2010; Khalil, 2011). El hecho de que los

niveles de ET-1 no estén aumentados no es muy significativo porque se le considera un factor que actúa de forma autocrina/paracrina; así, la ET-1 sintetizada por las células endoteliales se libera de forma polarizada hacia la pared del vaso, donde actúa sobre las CMLV, y no hacia la circulación; en cualquier caso, aunque los niveles de ET-1 no sean muy elevados, el péptido puede producir efectos en la vasculatura, de manera que, a concentraciones tan bajas que no producen contracción, ET-1 puede potenciar la contractilidad a otras sustancias vasoactivas (Gondre y Christ, 1998; García-Villalón *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2014b), mecanismos estos que están incrementados en pacientes hipertensos (Haynes *et al.*, 1994). Además, se ha descrito que la vasoconstricción inducida por administración exógena de ET-1 es más acentuada en pacientes hipertensos que en normotensos y se correlaciona positivamente con la presión arterial media sólo en individuos hipertensos (Schiffrin y Thibault, 1991). Otro de los mecanismos que explican el papel de ET-1 en la hipertensión es el cambio en la distribución de sus receptores. Así, se ha observado en diversos modelos animales y en pacientes afroamericanos una menor proporción de receptores ET<sub>B</sub> vasodilatadores/vasoconstrictores (Touyz y Schiffrin, 2003; Shreenivas y Oparil, 2007; Sandhu *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2014b) y hay estudios que demuestran incremento en los niveles de ET<sub>A</sub> en hipertensión (Hoche *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2014a).

ET-1 también puede participar en la hipertensión como consecuencia de la inducción de mecanismos que favorezcan el proceso inflamatorio en la pared vascular. Así, ET-1 incrementa el estrés oxidativo mediante la activación de diferentes fuentes como NADPH oxidasa (Banes-Berceli *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2014b), xantina oxidasa (Viel *et al.*, 2008), mitocondria (Callera *et al.*, 2006) o la eNOS desacoplada (Loomis *et al.*, 2005; Iglarz y Clozel, 2010). Este incremento de ROS conduciría a la estimulación de los factores de transcripción NFκB y AP-1, a la expresión de genes redox-sensibles, a la regulación positiva de moléculas de adhesión y a otros mecanismos que conducen a la atracción de macrófagos y neutrófilos hacia la pared vascular; todo ello, junto con la estimulación de factores de crecimiento, origina el crecimiento y la respuesta inflamatoria que caracteriza algunos modelos de hipertensión; además, se ha descrito que ET-1

incrementa la expresión de enzimas inflamatorias como COX-2 en CMLV y células endoteliales (Montezano *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008).

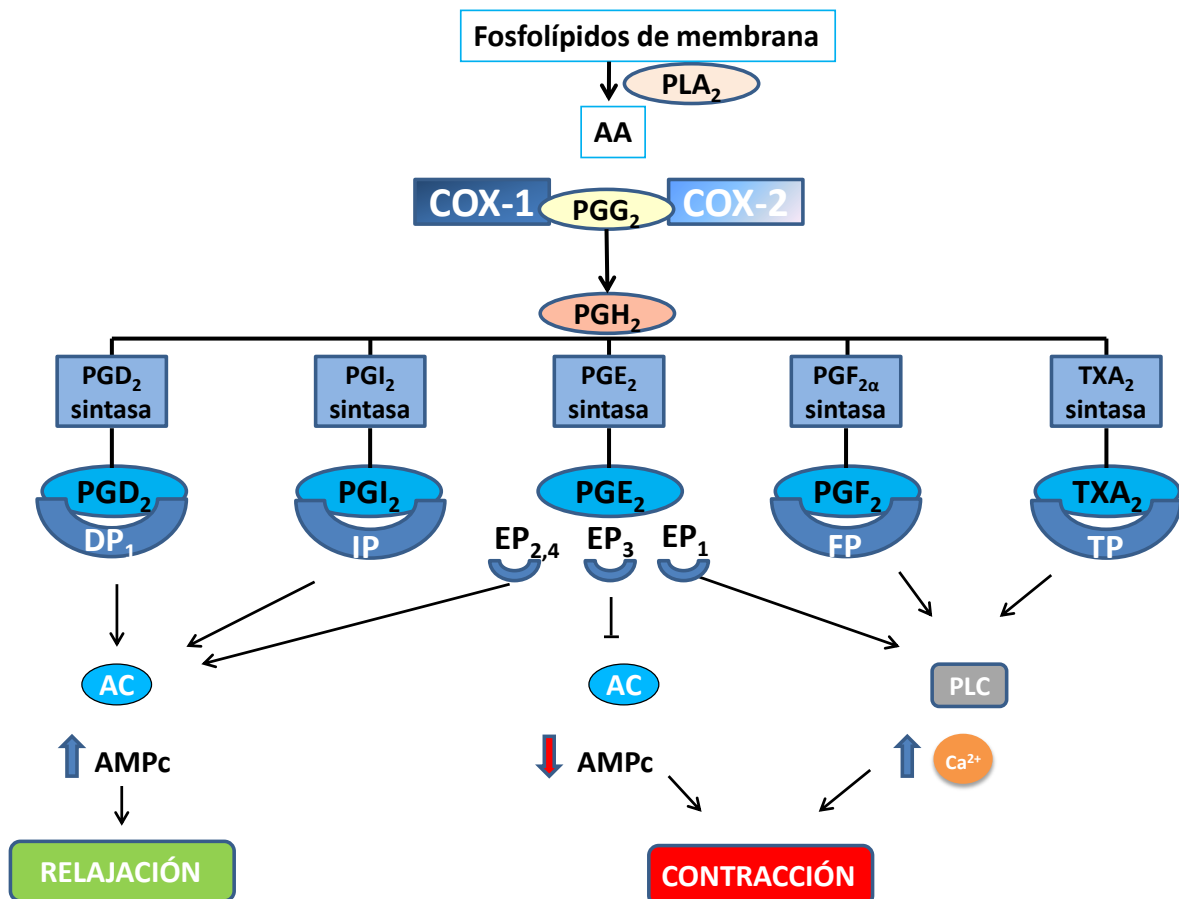
Por otra parte, la ET-1 se ha postulado como un mediador importante para explicar algunos efectos hemodinámicos así como el daño cardiovascular inducidos por Ang II en hipertensión (Rossi *et al.*, 1999). Así, la Ang II incrementa la liberación de ET-1 y la expresión del ARNm de pre-pro-ET-1 (Alexyer *et al.*, 2001; An *et al.*, 2006), y el tratamiento con IECAs normaliza los incrementados niveles plasmáticos de ET-1 en pacientes hipertensos (Uemasu *et al.*, 1994). Además, algunos efectos producidos por la infusión de Ang II como la hipertensión, proliferación, los cambios en la función endotelial y los efectos renales se atenúan con antagonistas de receptores de ET-1 (Rajagopalan *et al.*, 1997; Montanari *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004). El primer ensayo clínico de un antagonista de receptores ET<sub>A/B</sub> de ET-1 en hipertensión esencial fue publicado en 1998 (Krum *et al.*, 1998). En este estudio se observó que a la dosis más elevada (2 g/día), el fármaco reducía la presión arterial de forma similar a una dosis de 20 mg/día de enalapril (un IECA). En otro ensayo clínico, darusentan, un antagonista parcialmente selectivo por ET<sub>A</sub>, también redujo la presión arterial, sin efectos secundarios importantes a corto plazo (Nakov *et al.*, 2002). Este mismo fármaco redujo tanto la PAS como la PAD en pacientes con hipertensión resistente (Weber *et al.*, 2009; Bakris *et al.*, 2010; Reichetzeder *et al.*, 2014). Por lo tanto, estos fármacos podrían suponer una buena alternativa, no sólo para estos pacientes resistentes, sino también para pacientes de raza negra (afroamericanos), donde, como ya hemos dicho, se encuentran mayores niveles de ET-1 plasmática (Ergul *et al.*, 1996).

### **Ciclooxigenasa**

Los prostanoïdes o eicosanoïdes derivan del AA, el cual procede de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana llevada a cabo por la PLA<sub>2</sub>, y que será sustrato para la COX o prostaglandina H<sub>2</sub> endoperóxidosintasa. La COX posee dos actividades enzimáticas, una oxigenasa, que incorpora dos moléculas de oxígeno al AA convirtiéndolo en PGG<sub>2</sub>, y una peroxidasa, que cataliza la reducción de PGG<sub>2</sub> dando lugar al producto final PGH<sub>2</sub> (Davidge, 2001). La PGH<sub>2</sub> es la molécula precursora de todos los prostanoïdes que serán generados por la acción de sintasas específicas; todas las sintasas se expresan en el lecho vascular por

lo que la síntesis de prostanoideos se puede llevar a cabo completamente en la pared del vaso (Tang y Vanhoutte, 2008). Las dos enzimas limitantes en la producción de prostanoideos son la PLA<sub>2</sub> y la COX. Los prostanoideos más comunes son prostaciclina o PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y TXA<sub>2</sub>, los cuales median sus efectos por unión a receptores acoplados a proteínas G específicos (Fig. 7). El receptor del TXA<sub>2</sub>, TP, se asocia con proteínas G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>; PGE<sub>2</sub> se une a 4 subtipos de receptores: EP<sub>1</sub> se asocia a G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, EP<sub>2</sub> a G<sub>s</sub>, EP<sub>3</sub> a G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> y EP<sub>4</sub> a G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>; PGD<sub>2</sub> se une a dos subtipos de receptores, DP<sub>1</sub> que se asocia a proteínas G<sub>s</sub> y DP<sub>2</sub> que se asocia a G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>; el receptor de PGF<sub>2α</sub> FP se asocia a G<sub>s</sub> y por último, el receptor de PGI<sub>2</sub> IP se asocia a proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> y G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>.

Respecto al efecto sobre el tono vascular, la PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub> producen vasodilatación por unión a sus respectivos receptores específicos IP, EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub> y DP<sub>1</sub>, mediante la activación de la adenilato ciclasa que conduce a un incremento del AMPc. Además, la PGE<sub>2</sub>, la PGF<sub>2α</sub> y el TXA<sub>2</sub> por unión a sus respectivos receptores EP<sub>1</sub>, FP y TP producen contracción mediante la activación de la PLC que conduce a un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular; PGE<sub>2</sub> a través del receptor EP<sub>3</sub> produce un efecto contráctil por la inhibición de la adenilato ciclasa y la subsecuente reducción del AMPc (Bos *et al.*, 2004) (Fig. 7). Adicionalmente, los prostanoideos ejercen otros importantes efectos en la vasculatura. Así, pueden regular la agregación plaquetaria, de manera que el TXA<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub> (a través de receptores EP<sub>3</sub>) aumentan esta agregación, mientras que la PGI<sub>2</sub> y la PGD<sub>2</sub> la disminuyen (Bos *et al.*, 2004; Sorg *et al.*, 2015). Además, el TXA<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub> (a través de EP<sub>3</sub>) tienen efectos proinflamatorios, proaterogénicos y proangiogénicos (Ben-Av *et al.*, 1995; Harizi *et al.*, 2008; Kondeti *et al.*, 2015), mientras que la PGD<sub>2</sub>, su metabolito 15dPGJ<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> tienen efectos antiinflamatorios; PGI<sub>2</sub> también posee efectos antiaterogénicos (Cipollone y Fazia, 2006; Ahmed *et al.*, 2011; Seno *et al.*, 2011; Dewachter *et al.*, 2015).



**Fig. 7:** Esquema de la ruta de síntesis de los prostanoideos y su efecto sobre el tono vascular. AA: ácido araquidónico; AC: adenilato ciclasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; DP<sub>1</sub>: receptor de PGD<sub>2</sub>; EP<sub>1-4</sub>: receptores de PGE<sub>2</sub>; FP: receptor de PGF<sub>2α</sub>; IP: receptor de PGI<sub>2</sub>; PG: prostaglandina; PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>; TP: receptor de TXA<sub>2</sub>.

Hasta el momento se han identificado 3 isoformas de COX, COX-1, COX-2 y COX-3 (Botting, 2000), siendo las dos primeras las mejor conocidas. Estas dos isoformas poseen una elevada homología entre ellas (60-65%) y una actividad catalítica similar, pero su regulación es muy diferente y sus genes se encuentran en diferentes cromosomas, estando COX-1 en el 9 y COX-2 en el 1. Las dos se localizan en la membrana del retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear en proporciones iguales (Spencer *et al.*, 1998, Davidge, 2001). COX-3 parece ser una variante por *splicing* alternativo de COX-1 que no elimina el primer intrón; esta forma es más abundante en cerebro (Botting, 2000; Chandrasekharan *et al.*, 2002).

COX-1 es una proteína de 69 kDa que se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos como plaquetas (Smith y Langenbach, 2001), mucosa gástrica (Peskar, 2005),

riñones (Khan *et al.*, 1998) y en la pared vascular (Briones *et al.*, 2005). Aunque su expresión no es regulable por citoquinas ni péptidos vasoactivos, se ha descrito que puede ser inducida por estrés mecánico (Wang *et al.*, 1993; Doroudi *et al.*, 2000).

COX-2 es una proteína de 72 KDa que se considera la isoforma inducible de COX. Se induce en la mayoría de los tejidos, sobre todo por estímulos inflamatorios, aunque también se expresa constitutivamente en determinadas zonas del cerebro (Andresen *et al.*, 2006), riñón (Vane *et al.*, 1998), tejido gastrointestinal (Zimmermann *et al.*, 1998), así como en células vasculares procedentes de arterias de resistencia (Hernanz *et al.*, 2003; Briones *et al.*, 2005) y de conductancia (Alvarez *et al.*, 2005). Es la principal fuente de prostanoideos vasoactivos en presencia de mediadores proinflamatorios como las citoquinas (Briones *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2012), endotoxinas bacterianas como el lipopolisacárido bacteriano (Hernanz *et al.*, 2004), o péptidos vasoactivos como Ang II (Hu *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2007; Beltrán *et al.*, 2009) o ET-1 (Peng *et al.*, 2008). La expresión de COX-2 puede ser regulada a nivel transcripcional, postranscripcional o postraducciona. La activación de distintas rutas mediadas por MAPK, como ERK1/2 (Ohnaka *et al.*, 2000), p38 MAPK (Beltrán *et al.*, 2009) o JNK (Nieminen *et al.*, 2005), constituye un punto clave en la regulación a nivel transcripcional de la expresión de COX-2. Además, COX-2 posee en su promotor sitios de unión a factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 o NFκB (Tsatsanis *et al.*, 2006). La regulación a nivel postranscripcional también es clave en la expresión de COX-2. En el extremo 3' del ARNm de COX-2 se localizan secuencias AUUUA, denominadas secuencias ARE (elemento rico en AUs), que regulan su estabilidad. Estas secuencias son reconocidas por proteínas como AUF-1 (Cok *et al.*, 2004), HuR (Doller *et al.*, 2007; Aguado *et al.*, 2015) o β-catenina (Lee y Jeong, 2006), que modifican la estabilidad y la eficiencia traduccional del ARNm. Tanto p38 MAPK (Dean *et al.*, 1999; Duque *et al.*, 2006; Di Mari *et al.*, 2007) como PI3K y PKC (Cao *et al.*, 2007) contribuyen al incremento de la expresión de COX-2 aumentando la estabilidad de su ARNm, además de incrementando la transcripción.

Los isoprostanos, como el 8-isoprostano PGF<sub>2α</sub>, son sustancias similares a prostanoideos que se generan a partir del AA mediante la oxidación no enzimática producida por radicales libres *in vivo*; además, se ha reportado la producción de isoprostanos dependiente de COX-2

(Tomida *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2007). Estos isoprostanos poseen propiedades vasoconstrictoras (Cracowski *et al.*, 2001) debido, principalmente, a su capacidad para activar receptores TP (Audoly *et al.*, 2000).

En los vasos sanguíneos, los principales productos de la capa media y la íntima son la PGI<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub>, mientras que en plaquetas se produce principalmente TxA<sub>2</sub>; no obstante, la PGH<sub>2</sub> liberada de las plaquetas puede ser usada por las células endoteliales para producir PGI<sub>2</sub> y la liberada por las células endoteliales puede ser usada por las plaquetas para producir TxA<sub>2</sub>. En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la síntesis de prostanoïdes vasodilatadores y vasoconstrictores que participan en la modulación del tono vascular, especialmente PGI<sub>2</sub> y TxA<sub>2</sub>; sin embargo, en determinadas situaciones patológicas, se produce un desbalance con aumento en la formación de prostanoïdes vasoconstrictores (Weksler, 2015).

#### *COX-2 en hipertensión*

En pacientes con hipertensión esencial (Taddei *et al.*, 1997; Viridis *et al.*, 2013) y en distintos modelos animales como ratas SHR (García-Cohen *et al.*, 2000; Briones *et al.*, 2002; Blanco-Rivero *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2005; 2007), DOCA-Salt (Adeagbo *et al.*, 2005), Dahl "SALT sensitive" (Jaimes *et al.*, 2008) o en ratones Cx40 (Krattinger *et al.*, 2009), se ha descrito un incremento en la expresión de COX-2, así como en la producción de prostanoïdes contráctiles como TxA<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>2</sub>; además, se ha observado un aumento de PGI<sub>2</sub>, que aunque en condiciones fisiológicas posee efecto vasodilatador, cada vez existen más indicios de que en hipertensión puede producir efectos contráctiles por su unión a receptores TP (Félétoú *et al.*, 2011; Hernanz *et al.*, 2012). Los prostanoïdes y otras sustancias similares como los isoprostanos están implicados en el incremento de las respuestas vasoconstrictoras y en la disfunción endotelial que caracterizan la hipertensión (Alvarez *et al.*, 2005; Martínez-Revelles *et al.*, 2013; Hernanz *et al.*, 2014; Kida *et al.*, 2014; Avendaño *et al.*, 2016) actuando, principalmente, a través de receptores TP (Alvarez *et al.*, 2005) y EP<sub>1</sub> (Avendaño *et al.*, 2016). Además, los prostanoïdes derivados de COX-2 intervienen en las alteraciones estructurales vasculares observadas en hipertensión,

modulando la deposición de matriz extracelular a través de receptores EP<sub>1</sub> (Avendaño *et al.*, 2016) y TP (Virdis *et al.*, 2012).

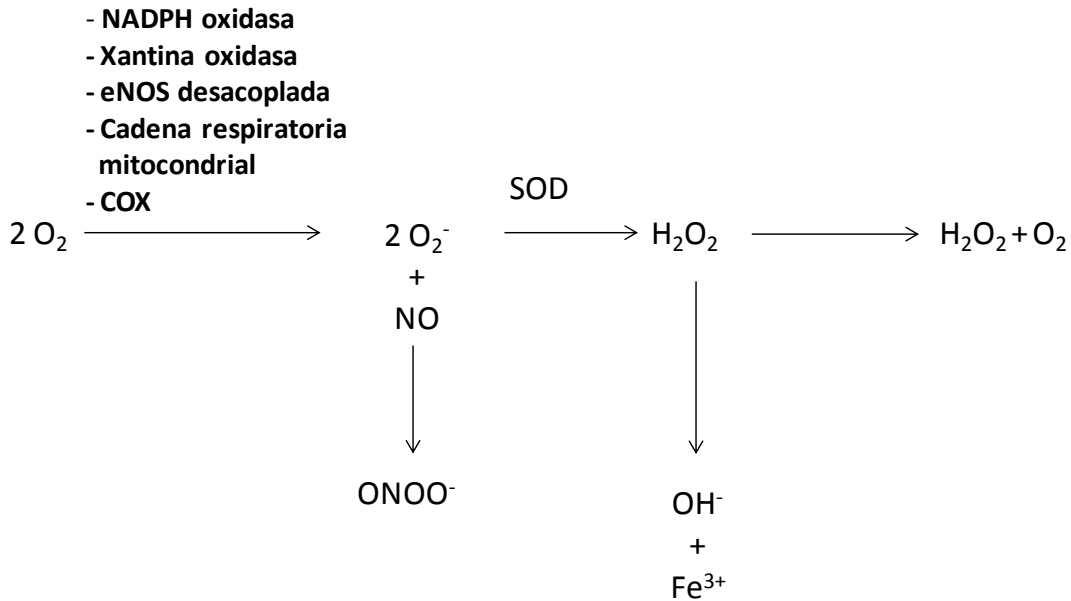
La sobreactivación del SRA en hipertensión está implicada en la aumentada expresión de COX-2, siendo ésta reducida por el tratamiento con antagonistas AT<sub>1</sub> (Alvarez *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008). Además, apoyando esta hipótesis, se ha descrito que la infusión de Ang II induce la expresión de COX-2 (Martínez-Revelles *et al.*, 2013) así como la actividad y la producción de prostanoides derivados de esta enzima (Wang *et al.*, 2008; Martínez-Revelles *et al.*, 2013; Hernanz *et al.*, 2014; Avendaño *et al.*, 2016). A pesar de ello, algunos autores han observado que ratones deficientes en COX-2 no estaban protegidos contra la hipertensión inducida por Ang II (Avendaño *et al.*, 2016). Por otra parte, ET-1 incrementa la expresión de COX-2 a través de diferentes mecanismos (Montezano *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008) y los derivados de COX-2 participan en algunos de los efectos vasculares de este péptido (Granstam *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 2007). Por lo tanto, el aumento del sistema de endotelina en hipertensión también puede guardar relación con la incrementada activación de COX-2 que se observa en esta patología. Adicionalmente, las ROS, que juegan un importante papel en los efectos inducidos por Ang II y por ET-1, también pueden aumentar la expresión y la actividad de COX-2 (Feng *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2012).

Debido a la implicación de derivados de la COX-2 en hipertensión, se ha estudiado el uso de inhibidores de estas enzimas en el tratamiento de la patología hipertensiva. Así, los inhibidores de COX-2 pueden reducir el incremento de presión arterial, tanto en SHR como en ratones infundidos con Ang II (Tian *et al.*, 2012; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). A pesar de ello, el uso de estos fármacos está desaconsejado porque interfieren con la función renal y también incrementan los eventos cardiovasculares, especialmente ictus e infarto de miocardio (Bhosale *et al.*, 2015), si bien la inhibición no selectiva de COX (antiinflamatorios no esteroideos, AINEs) también se asocia con un incremento en el riesgo cardiovascular, además de multitud de efectos secundarios deletéreos como trastornos gastrointestinales, daño renal, sangrados e inicios de asma (Antman *et al.*, 2005; Brune, 2005; Sudano *et al.*, 2012). Estos efectos pueden deberse al deterioro, tanto en la producción de prostanoides

que promueven el daño vascular, como el  $\text{TxA}_2$ , como en la de los que tienen un efecto protector, como la  $\text{PGI}_2$ . Además hay que tener en cuenta que estos fármacos, al interferir con la función renal, pueden producir un incremento en la presión arterial (Brune, 2005; Sudano *et al.*, 2012; Bhosale *et al.*, 2015).

### **Especies reactivas de oxígeno**

Las ROS son moléculas derivadas de oxígeno que se producen como resultado del metabolismo oxidativo aerobio en prácticamente todas las células, incluyendo las de la pared vascular. Tienen una vida media muy corta y son altamente reactivas, lo que las convierte en segundos mensajeros muy eficaces que participan en una gran variedad de rutas de señalización celular (Simon *et al.*, 1998; Griending *et al.*, 2000). Entre las ROS se incluyen el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y el peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ). El  $\text{O}_2^-$ , que se genera a partir del oxígeno molecular por adición de un electrón, posee un electrón desapareado, lo que le hace ser muy reactivo, inestable y tener una corta vida media. En solución acuosa se comporta como un agente oxidante que se reduce a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bien espontáneamente o por la reacción catalizada por el enzima superóxido dismutasa (SOD), o como un agente reductor, combinándose con el NO para dar lugar al  $\text{ONOO}^-$  cuando los niveles de NO se encuentran en el rango nanomolar. El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a su vez, puede descomponerse en  $\text{H}_2\text{O}$  por acción de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, o puede ser reducido a  $\text{OH}^-$  en presencia de moléculas que contienen  $\text{Fe}^{2+}$ , mediante la reacción de Fenton (Touyz y Schiffrin, 2004) (Fig. 8).



**Fig. 8:** Esquema de la producción de especies reactivas de oxígeno. COX: ciclooxigenasa; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; NADPH oxidasa: nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidasa; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutasa.

### *Tipos de ROS*

#### Anión superóxido

El  $\text{O}_2^-$  es un importante modulador de la fisiología vascular participando en procesos de remodelado, produciendo efectos vasoconstrictores en muchos lechos vasculares y modulando las respuestas vasculares inducidas por otros agonistas (Shen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Hernanz *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2008). Además, supone uno de los mecanismos mediante los cuales se reduce la biodisponibilidad de NO, ya que este anión puede reaccionar químicamente con NO para producir  $\text{ONOO}^-$ , otra poderosa especie reactiva de oxígeno (Drummond *et al.*, 2011). El  $\text{O}_2^-$  también oxida al cofactor de la isoforma endotelial de la NOS (eNOS), la tetrahidrobiopterina (BH4), produciendo el desacoplamiento de esta enzima que deja de producir NO y produce  $\text{O}_2^-$  (Laursen *et al.*, 2001). Además, el  $\text{O}_2^-$  es un segundo mensajero muy importante en la señalización celular regulando la proliferación y migración de CMLV (Xu *et al.*, 2015), la apoptosis de células endoteliales, la expresión de moléculas de adhesión, la angiogénesis y la expresión de genes inflamatorios; además, constituye un mecanismo de defensa de diversas células del sistema inmune (Dimmeler y Zeiher, 2000; Taniyama y Griendling, 2003).  $\text{O}_2^-$  activa diversas vías de

señalización como las de MAPK o la de Akt (Lee y Yang, 2012), las cuales conducirán a la activación de factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 o NFκB (Tsai *et al.*, 2012; Lee y Yang, 2012; Rodrigo *et al.*, 2013), que a su vez activarán la transcripción de genes proinflamatorios como las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 o de quimioquinas como MCP-1 (Lee y Yang, 2012; Rodrigo *et al.*, 2013). Como se ha comentado anteriormente, uno de los mecanismos por los que  $O_2^-$  contribuye tanto a los procesos inflamatorios como a la regulación del tono vascular es actuando sobre la expresión y la actividad de COX-2 y sus derivados (Martínez-Revelles *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2015).

### Peróxido de hidrógeno

A diferencia del  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  es una especie reactiva de oxígeno muy estable; al no tener carga se le suponía capaz de atravesar las membranas biológicas, aunque hay autores que discrepan de este hecho y afirman que necesita acuoporinas para penetrar por difusión facilitada (Bienert *et al.*, 2006; Bienert y Chaumont, 2014).  $H_2O_2$  también es un segundo mensajero implicado en multitud de vías de señalización que regulan la proliferación celular, la producción de estrés oxidativo (Barchowsky *et al.*, 1995; Mendes *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006), la permeabilidad endotelial (Siflinger-Birnboim *et al.*, 1992) y la inducción de mediadores proinflamatorios como el TNFα, moléculas de adhesión y COX-2 (Lo *et al.*, 1993; Nakamura y Sakamoto, 2001; Lu y Wahl, 2005; Cao *et al.*, 2006; Nakao *et al.*, 2008; Lee y Griendling, 2008; Martín *et al.*, 2012).

En cuanto a la función vascular, la acción del  $H_2O_2$  es controvertida. Por un lado, algunos autores han encontrado que produce vasodilatación, habiendo sido identificado en algunos lechos vasculares como el EDHF (Matoba *et al.*, 2000; Yada *et al.*, 2003; Shimokawa y Matoba, 2004). Por otro lado, el  $H_2O_2$  también produce vasoconstricción; así, en condiciones basales, el  $H_2O_2$  produce contracción en aorta, arteria pulmonar, arteria mesentérica superior y cerebral de rata (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1998; Gao y Lee, 2001; Hernanz *et al.*, 2003; Santiago *et al.*, 2013). Incluso, en algunos casos, se ha descrito que  $H_2O_2$  produce una respuesta bifásica, con una fase contráctil inicial seguida de relajación (Gao *et al.*, 2003; García-Redondo *et al.*, 2009). Estos efectos vasculares son producidos a través de distintos mecanismos, entre los que destaca el incremento en la producción de

derivados de COX (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1998; Gao y Lee, 2001; Thakali *et al.*, 2007; García-Redondo *et al.*, 2009). En este sentido, se ha descrito que  $H_2O_2$  aumenta la actividad y la expresión de COX-2 (Karaa *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012).

### Otras ROS

El radical  $OH^\cdot$  es extremadamente reactivo pero no es difusible, por lo que causa daño local donde es generado. A nivel vascular está descrito que puede causar contracción (Li *et al.*, 2004) o vasodilatación a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995).

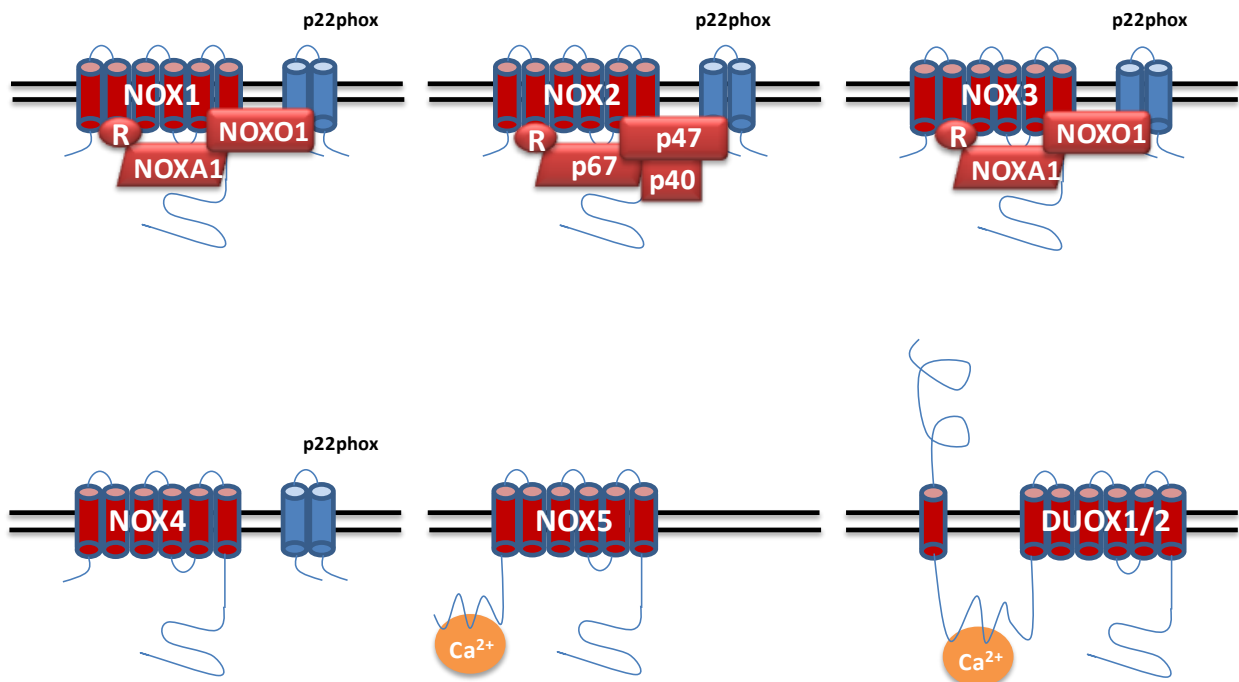
El  $ONOO^\cdot$  es una especie reactiva de oxígeno altamente tóxica cuya estabilidad a pH fisiológico le permite difundir a través de las membranas celulares hasta encontrar sus dianas. Entre los mecanismos por los que causa toxicidad se encuentran la ruptura del ADN, la peroxidación lipídica y la oxidación, nitración o nitrosilación de gran cantidad de proteínas modificando su función (Beckman y Koppenol, 1996). Ya hemos comentado que se forma por la reacción química entre el  $O_2^\cdot$  y el NO. A nivel vascular, el  $ONOO^\cdot$  produce el desacoplamiento de eNOS por dos vías, mediante la oxidación del complejo Zn tiolato (Zou *et al.*, 2002) o mediante la oxidación de BH<sub>4</sub> (Chen *et al.*, 2010); en este sentido, se ha descrito que  $ONOO^\cdot$  es mucho más potente oxidando BH<sub>4</sub> que el  $O_2^\cdot$  (Laursen *et al.*, 2001; Félétou y Vanhoutte, 2006). Además, puede inhibir la guanilato ciclasa regulando su expresión y su actividad (Münzel *et al.*, 2005), aunque también se le atribuyen acciones vasodilatadoras actuando sobre la guanilato ciclasa y mediante la liberación de un factor relajante de naturaleza desconocida (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995).

### *Fuentes de ROS*

#### NADPH oxidasa

Entre las diversas fuentes que generan ROS, la NADPH oxidasa es la única que tiene esta producción como función principal; el resto de fuentes producen ROS bien de forma secundaria a su función o bien debido a un mal funcionamiento. La NADPH oxidasa es un complejo enzimático formado por diferentes unidades, varias citosólicas, que tienen una

función reguladora, y otras transmembrana. Las unidades transmembrana son p22phox y una subunidad catalítica que puede ser de 7 tipos diferentes (NOX-1-5 y DUOX-1-2, también denominadas NOX-6-7) (Fig. 9). Las subunidades NOX transportan electrones a través de membranas biológicas para reducir el  $O_2$  a  $O_2^-$ , utilizando NADPH como donador de electrones. Se identificaron por primera vez en fagocitos, siendo NOX-2 la subunidad presente en este tipo celular (Griendling, 2004).



**Fig. 9:** Familia de NADPH oxidasas: isoformas de la subunidad catalítica y subunidades no catalítica. R: GTPasa Rac1. Adaptada de Bedard y Krause, 2007.

La subunidad p22phox se encuentra anclada a la membrana interaccionando con una subunidad catalítica, a excepción de NOX-5 y las DUOX, que no se asocian con ninguna subunidad adicional (Bedard y Krause, 2007). El resto de subunidades son reguladoras y están implicadas en el ensamblaje del complejo en la membrana [p47phox, NOXO1 (NOX organizer 1), TSK4/5 y p40phox] y en la activación del enzima [p67phox y NOXA1 (NOX activator 1)] (Lopes *et al.*, 2004; Touyz *et al.*, 2011). Además, Rac1, una GTPasa, actúa como activador de algunas subunidades de NOX (Bedard y Krause, 2007).

Las subunidades catalíticas NOX-1, NOX-2, NOX-4 y NOX-5 se expresan en células endoteliales y CMLV de la pared vascular; además, en fibroblastos adventiciales se

encuentran NOX-4 y NOX-2, y esta última subunidad también se expresa en fagocitos (Griendling, 2004; Drummond *et al.*, 2011). Estas subunidades producen  $O_2^-$ , a excepción de NOX-4, que produce preferentemente  $H_2O_2$  (Dikalov *et al.*, 2008). La producción de ROS por estas enzimas se regula, en algunos casos, a nivel de expresión; así, la expresión de NOX-1 y NOX-2 es incrementada por gran variedad de estímulos como estrés mecánico, Ang II, ET-1 o aldosterona (Laplante *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2010; Touyz *et al.*, 2011), muchos de los cuales están presentes en determinadas situaciones patológicas (Lassègue *et al.*, 2012). A NOX-4 se le suele atribuir la función de producir ROS de forma constitutiva (Chen *et al.*, 2012); sin embargo, se ha visto que su expresión puede ser incrementada bajo ciertos estímulos como hipoxia (Craigie *et al.*, 2011), TGF- $\beta$ 1 (Cucoranu *et al.*, 2005), Ang II (Lee *et al.*, 2013) o estrés mecánico (White *et al.*, 2011). Paradójicamente, también se ha descrito que Ang II disminuye los niveles de NOX-4, contradicción que puede deberse a diferencias en los modelos experimentales utilizados en los diferentes estudios (Touyz y Montezano, 2012). Desde hace unos años se le otorga a NOX-4 un papel protector a nivel vascular (Touyz y Montezano, 2012). En el caso de NOX-5, su actividad es regulada por la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, pues tiene 4 dominios similares a calmodulina con capacidad de unir  $Ca^{2+}$  (*EF hys*) (Drummond *et al.*, 2011).

#### Otras fuentes de ROS

La xantina oxidasa (XO) y la xantina deshidrogenasa, conocidas como xantina oxidorreductasa (XOR), catalizan secuencialmente la oxidación de hipoxantina a xantina y posteriormente de ésta a ácido úrico, mediante la reducción de  $NAD^+$  (deshidrogenasa) o de oxígeno molecular (oxidasa); cuando utiliza el oxígeno como aceptor produce la liberación de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Harrison, 2002; Hernanz *et al.*, 2014). Se han detectado altos niveles de actividad oxidorreductasa en algunas células endoteliales de microvasos. La enzima se encuentra en el citoplasma y en la parte externa de la membrana celular (Harrison, 2002). Tiene un papel importante en el daño producido por los procesos de isquemia-reperfusión y en otras patologías; en estas circunstancias, puede ser liberada a la circulación por hígado e intestino y se puede unir a la membrana de células endoteliales mediante glicosaminoglicanos, incrementando el daño vascular (Harrison, 2002; Cantu-Medellin y

Kelley, 2013; Hernanz *et al.*, 2014). Ang II puede incrementar los niveles de proteína de XO así como su actividad (Landmesser *et al.*, 2007).

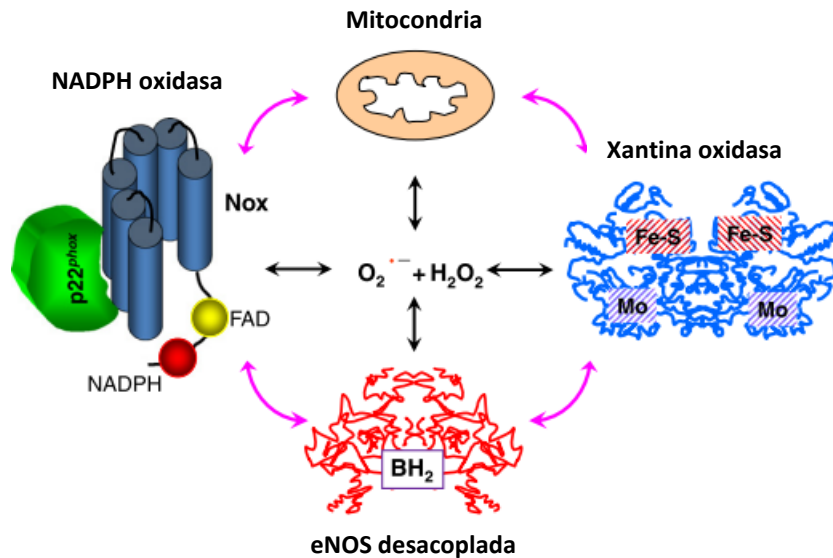
Otra de las principales fuentes de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial, donde hay varios sitios en los cuales el oxígeno puede ser reducido a  $O_2^-$ , siendo los principales los complejos I y III. Este superóxido es rápidamente dismutado a  $H_2O_2$  por la Mn-SOD y por la Cu/Zn-SOD (Dikalov, 2011; Widlansky y Gutterman, 2011). Cuando la mitocondria funciona con normalidad, la producción de  $O_2^-$  es pequeña; sin embargo, esta producción aumenta en diferentes condiciones como arteriosclerosis, isquemia/reperfusion, envejecimiento e hipertensión (Dikalova *et al.*, 2010). En este sentido, Ang II incrementa la producción de ROS mitocondrial, disminuye el potencial de membrana y reduce el control respiratorio de la célula (Dikalova *et al.*, 2010).

Aunque la función de la eNOS es producir NO mediante la conversión de L-arginina en L-citrulina, en circunstancias especiales como déficit de sustrato o del cofactor necesario  $BH_4$ , esta enzima puede producir  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Hong *et al.*, 2001; Landmesser *et al.*, 2003). La COX también puede actuar como fuente de ROS; así, a través de su función peroxidasa puede oxidar NADPH a NADP generando  $O_2^-$  al tiempo que produce prostaglandinas (Kukreja *et al.*, 1986; Wolin *et al.*, 2002). Por otra parte, los prostanoides derivados de COX como  $TXA_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  y el 8-isoprostano  $F_{2\alpha}$  pueden producir un incremento de las ROS a través de la activación de NADPH oxidasa, mientras que  $PGI_2$  puede reducir este efecto (Muzaffar *et al.*, 2004).  $PGE_2$  puede incrementar o reducir la producción de ROS, aunque el mecanismo no está claro (Hernanz *et al.*, 2014).

#### Autoperpetuación de la producción de ROS

Una de las características de la producción de ROS es que su producción desde una fuente puede activar la de otra fuente, produciendo un “círculo vicioso” que perpetúa el estrés oxidativo. Ya se ha comentado que el  $ONOO^-$  procedente del  $O_2^-$  puede desacoplar la eNOS, que se convierte así en una fuente de ROS (Laursen *et al.*, 2001; Félétou y Vanhoutte, 2006). El  $ONOO^-$  también puede incrementar la producción de ROS derivadas de la mitocondria (Doughan *et al.*, 2008). Por otra parte, la activación de la NADPH oxidasa puede

aumentar la producción de ROS por la mitocondria, y viceversa (Dikalov, 2011; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Además, la XO puede ser regulada por las ROS derivadas de la NADPH oxidasa (Villegas *et al.*, 2004) y de la mitocondria (Schulz *et al.*, 2014) (Fig. 10).



**Fig. 10:** Regulación recíproca de diferentes fuentes de ROS. Adaptada de Dikalov, 2011.

### Barredores de ROS

Los niveles de ROS están sometidos a un estricto control, no sólo regulando su producción por las distintas fuentes, sino los mecanismos encargados de eliminarlos. Entre estos mecanismos destacan las enzimas detoxificantes como la SOD, encargada de dismutar el  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ . Existen 3 tipos de SOD, que se diferencian en su localización celular y en el cofactor que utilizan. La SOD mitocondrial (Mn-SOD o SOD-2) utiliza Mn como cofactor, mientras que la citosólica (Cu/Zn-SOD o SOD-1) y la extracelular (EC-SOD o SOD-3) utilizan Cu/Zn. La catalasa, la tiorredoxina reductasa o la glutatión peroxidasa son responsables de catalizar la conversión de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y oxígeno (Ursini *et al.*, 1995; Faraci y Didion, 2004; Johnson y Giulivi, 2005; Wassman *et al.*, 2006). Existen también sistemas antioxidantes no enzimáticos como el urato, la bilirrubina, la vitamina C, los tioles, flavonoides, carotenoides y la vitamina E (Montezano *et al.*, 2015).

### *ROS en hipertensión*

Como hemos comentado, es necesario un equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS. Cuando este equilibrio se rompe y se acumulan ROS se pueden desencadenar procesos que conducen a inflamación y alteraciones que participan en el desarrollo de algunas patologías como la hipertensión. Así, se han observado incrementados niveles de ROS en plasma y en vasos de varios modelos de hipertensión como ratas SHR, ratas DOCA-salt o ratones C57 infundidos con Ang II (Alvarez *et al.*, 2007; Viel *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2009; Martínez-Revelles *et al.*, 2013), así como en pacientes (Redón *et al.*, 2003; Minuz *et al.*, 2004; Carrizzo *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2013; Kurlak *et al.*, 2014; Higashi *et al.*, 2014). Una disminución en los sistemas antioxidantes podría también explicar este incremento del estrés oxidativo (Minuz *et al.*, 2004; Higashi *et al.*, 2014). Así, un polimorfismo de glutathion transferasa se ha correlacionado con el aumento de riesgo de hipertensión esencial; estos polimorfismos también aparecen en subunidades de NADPH oxidasa y también podrían ser responsables del incremento de la presión arterial (Montezano *et al.*, 2015).

El estrés oxidativo puede contribuir a la inflamación participando en la expresión de moléculas de adhesión, de quimioquinas o de factores de transcripción proinflamatorios (Sedeek *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2013). Adicionalmente, las ROS modulan la expresión y la actividad de COX-2 (Alvarez *et al.*, 2007; Hernanz *et al.*, 2014). Además, las ROS activan rutas celulares que conducen a la proliferación y migración de las CMLV, la activación de las metaloproteasas y la generación de proteínas de matriz (Hernanz *et al.*, 2014). Así, sustancias implicadas en el desarrollo de hipertensión como Ang II o ET-1 producen sus efectos sobre el remodelado vascular a través de la producción de ROS (Touyz *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2013). Por otra parte, las ROS también participan en las alteraciones de la función vascular observadas en hipertensión. Así, la aumentada formación de  $O_2^-$  en aorta de ratas hipertensas contribuye a las respuestas vasoconstrictoras inducidas por fenilefrina y serotonina (Alvarez *et al.*, 2008). Además, la disminución de la biodisponibilidad del NO por  $O_2^-$  es uno de los mecanismos más aceptados para explicar la disfunción endotelial y la aumentada contractilidad vascular asociadas a la hipertensión (Lyle y Griendling, 2006;

Paravicini y Touyz, 2008). Por otra parte, el  $O_2^-$  inhibe la guanilato ciclasa, principal diana del NO (Münzel *et al.*, 2005), y el ONOO<sup>-</sup> desacopla la eNOS (Félétou y Vanhoutte, 2006). Todo esto contribuye al incremento de la resistencia vascular periférica en esta patología (Rajagopalan *et al.*, 1996; Zalba *et al.*, 2001b; Beswick *et al.*, 2001).

Todas las fuentes de ROS pueden desempeñar un papel en las alteraciones vasculares en hipertensión, pero parece que la NADPH oxidasa es la principal fuente de ROS tanto en situación fisiológica como patológica (Lassègue *et al.*, 2001; Dikalova *et al.*, 2005; Matsuno *et al.*, 2005; Dikalov *et al.*, 2008). Nuestro grupo ya ha descrito previamente el incremento de actividad y expresión de este complejo en modelos de hipertensión (Alvarez *et al.*, 2007; 2008; Martín *et al.*, 2012; Hernanz *et al.*, 2012; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). El hecho de que ratones que sobreexpresan las subunidades NOX-1 o gp91phox presenten mayores respuestas vasoconstrictoras a Ang II (Dikalova *et al.*, 2005), mientras que en ratones deficientes en alguna subunidad de la NADPH oxidasa éstas sean menores (Matsuno *et al.*, 2005), sugiere que el anión superóxido derivado de la NADPH oxidasa es un importante modulador del tono vascular inducido por Ang II. Además, se ha observado que una sobreactivación de NOX-2 puede producir un incremento en la presión arterial (Touyz *et al.*, 2011) y se han descrito elevados niveles de NOX-5 en enfermedad cardiovascular (Guzik *et al.*, 2008), como es el caso de hipertensión (Montezano *et al.*, 2010).

En cuanto a otras fuentes de ROS, hay evidencias que sugieren que XO está implicada en la disfunción vascular en hipertensión. En SHR, se han encontrado niveles elevados de XO endotelial e incremento de la producción de ROS, las cuales se han asociado con un incremento del tono vascular (Suzuki *et al.*, 1998). Además, la disfunción endotelial en ratas transgénicas hipertensas que sobreexpresan renina y angiotensinógeno, se ha asociado con un aumento de la actividad de la xantina oxidasa (Mervaala *et al.*, 2001). La eNOS desacoplada también es una fuente de ROS en hipertensión (Landmesser *et al.*, 2003); este hecho se ha observado en ratones hipertensos DOCA salt (Landmesser *et al.*, 2003), así como en humanos (Guzik *et al.*, 2002; Higashi *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha observado que sustancias implicadas en el desarrollo de la hipertensión como Ang II (Dikalov, 2011) o ET-1 (Callera *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008) producen un incremento de ROS derivados de la

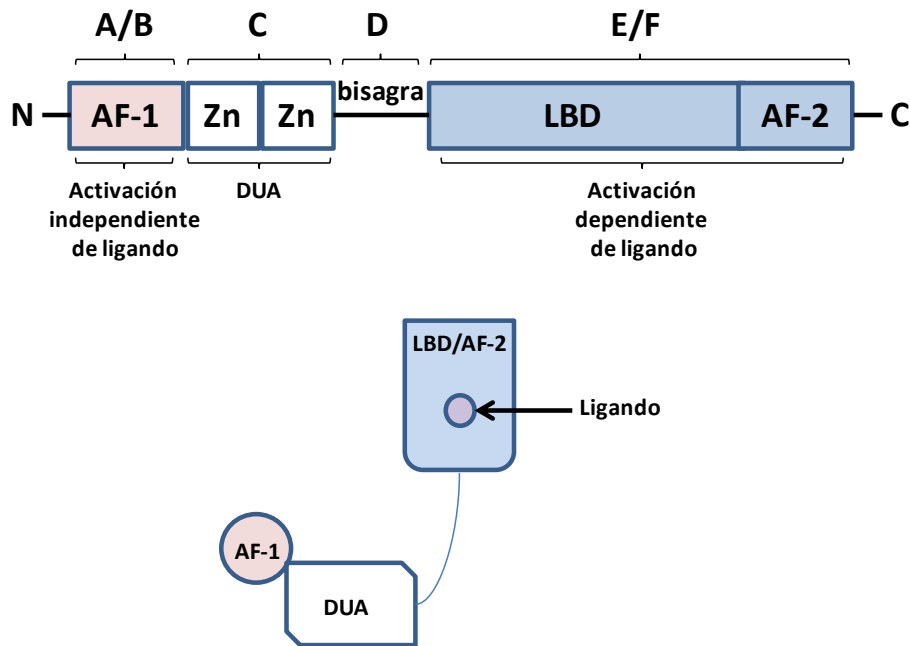
mitocondria, por lo que las ROS derivadas de esta fuente también pueden contribuir al desarrollo de la patología hipertensiva.

A pesar de que la participación de ROS en la hipertensión no es un hecho discutido, la utilización de agentes que reducen el estrés oxidativo en el tratamiento de esta patología presenta controversia. Diversos estudios epidemiológicos muestran que los individuos que toman más antioxidantes presentan una menor incidencia de riesgo cardiovascular (Moran *et al.*, 1993; Nawrot *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, las concentraciones plasmáticas de Vitamina C son inversamente proporcionales a la presión arterial tanto en personas normotensas como hipertensas (Rodrigo *et al.*, 2007b); además, la ingesta de vitamina C y E mejora la relajación dependiente de endotelio a acetilcolina (Taddei *et al.*, 1998) y reduce la presión arterial (Galley *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 1998; Rodrigo *et al.*, 2008). También se han obtenido resultados favorables al administrar antioxidantes combinados con otro tratamiento antihipertensivo (Barrios *et al.*, 2002; On *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayoría de los estudios que analizan el efecto de los antioxidantes a largo plazo no observan un efecto antihipertensivo claro (Hajjar *et al.*, 2002; Juraschek *et al.*, 2012). En este sentido, hay varios ensayos clínicos en los que vitamina C, vitamina E, coenzima Q, melatonina y N-acetilcisteína no tuvieron efecto sobre la presión arterial (para revisión ver González *et al.*, 2014). Por otra parte, Rodrigo *et al.* (2007a) hablan de la inconsistencia de algunos de los estudios llevados a cabo con antioxidantes debido a la metodología utilizada, los criterios de selección, el desconocimiento del grado de enfermedad del paciente cuando se inicia la suplementación y la ausencia de algunos aspectos científicos básicos tales como la biodisponibilidad, las propiedades farmacocinéticas y la naturaleza de los antioxidantes utilizados; por todo ello, son necesarios más estudios para comprobar la eficacia de este tipo de intervención.

### **Receptores activados por el proliferador de peroxisomas**

En 1990, Issemann y Green clonaron un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas, a través del cual un grupo de hepatocarcinógenos con actividad hipolipemiente activaba la proliferación y aumentaba el tamaño de los peroxisomas en roedores. A este receptor se le denominó receptor activado por el proliferador de

peroxisomas (PPAR). Los PPARs son factores de transcripción activados por ligando (Desvergne y Wahli, 1999) implicados en la regulación de genes que participan en el metabolismo glucídico y lipídico (Grygiel-Górniak, 2014). Existen 3 isoformas, las cuales se expresan en todos los tipos celulares de la pared vascular (Tsatsanis *et al.*, 2006; Touyz y Schiffrin, 2006; Takano y Komuro, 2009; Duan *et al.*, 2009): PPAR $\alpha$  (NR1C2), PPAR $\gamma$  (NR1C3) y PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2 o NUC-1) (Kliwer *et al.*, 1994; Braissant *et al.*, 1996; Desvergne y Wahli, 1999). Los PPAR, al igual que todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, están estructurados en 4 dominios funcionales, situándose en el extremo amino terminal el dominio A/B, regulador de la actividad del receptor; este dominio es conocido como AF-1 (*activator function-1*), puede ser fosforilado por diferentes quinasas y supone un sitio de activación independiente de ligando (Burns y Vyen Heuvel, 2007; Usuda y Kanda, 2014). A continuación se sitúa el dominio C de unión a ADN, que tiene dos motivos de “dedos de Zn” y reconoce secuencias específicas para PPAR en los promotores de los genes diana (elementos de respuesta a PPAR, PPRE). El dominio D bisagra (*hinge domain*) actúa como sitio de acoplamiento de correpresores y, finalmente, en el extremo carboxilo terminal, se encuentra el dominio E/F de unión a ligando que consta del dominio de unión a ligando (LBD) y del conocido como AF-2 (*activator function-2*) que actúa reclutando coactivadores; las tres isoformas comparten entre un 60 y un 80 % de homología en sus dominios de unión a ligando (Kliwer *et al.*, 1994; Braissant *et al.*, 1996; Desvergne y Wahli, 1999; Usuda y Kanda, 2014) (Fig. 11).



**Fig. 11:** Estructura de los PPAR. AF-1: *activator function-1*; AF-2: *activator function-2*; DUA: dominio de unión a ADN; LBD: dominio de unión a ligando.

### *Regulación de la expresión génica*

La activación de los PPAR puede dar lugar a un incremento o inhibición de la expresión de los genes diana, como se indica a continuación.

### Activación génica

Cuando PPAR está inactivo, es decir, no unido a ligando, se encuentra formando parte de complejos correpresores. Tras la activación por ligando, PPAR sufre un cambio conformacional, se separa del correpresor, dimeriza con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y recluta coactivadores; entonces, se une al PPRE en la región promotora e inicia la transcripción del gen (Kota *et al.*, 2005; Ricote y Glass, 2007). Los PPRE consisten en una repetición directa de la secuencia hexamérica AGGTCA separada por uno (DR-1) o dos nucleótidos (DR-2) (Desvergne y Wahli, 1999; Gervois *et al.*, 1999; Girnun *et al.*, 2002).

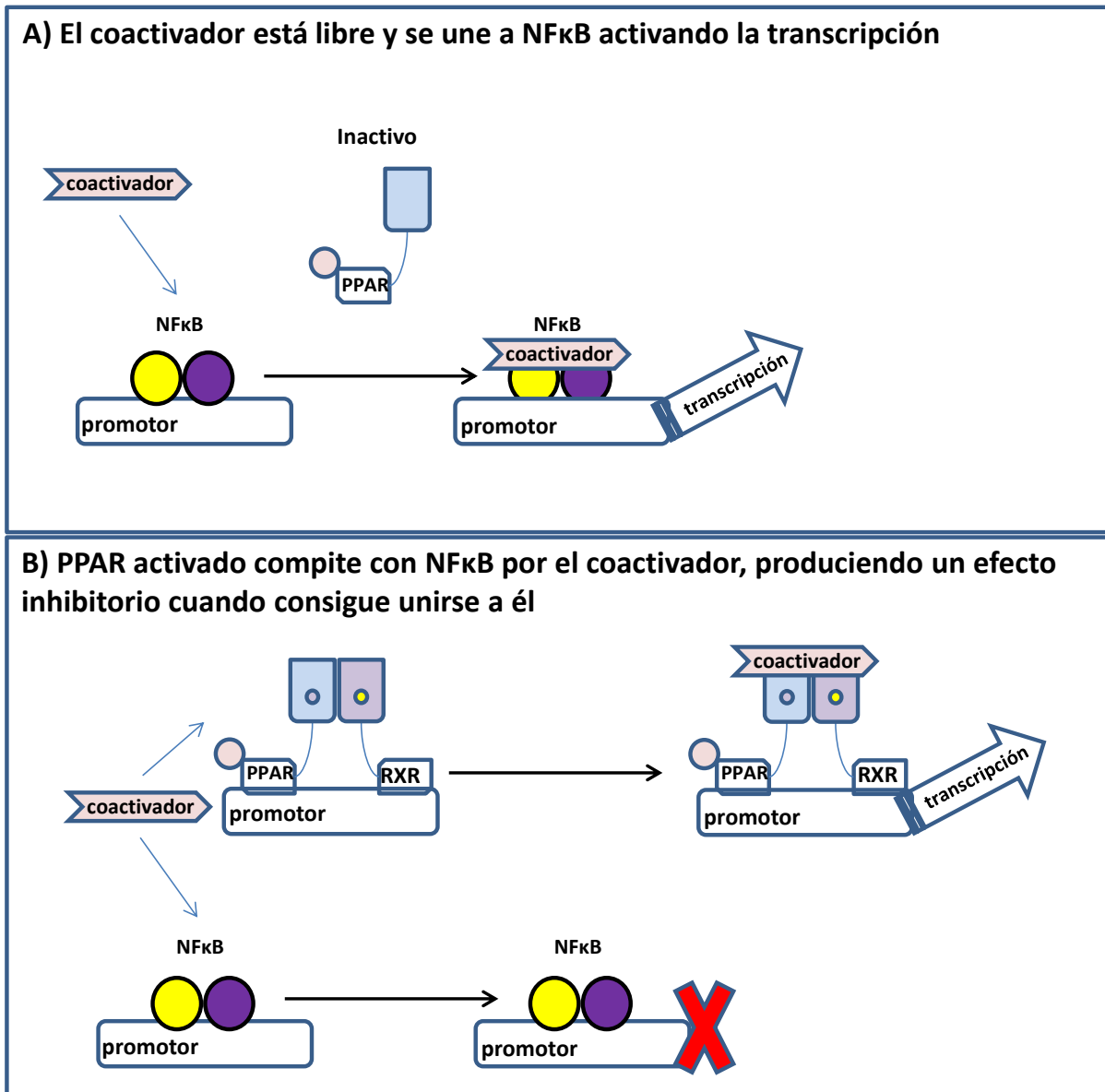
### Represión génica

Además de regular la expresión génica como un factor de transcripción clásico, PPAR también puede producir represión de la transcripción de genes de forma independiente a su unión a ADN. Esta represión génica puede ser llevada a cabo por varios mecanismos.

#### 1.- Represión génica dependiente de ligando o transrepresión

Estos mecanismos explican la mayor parte de los efectos de los PPAR sobre la respuesta inflamatoria en determinadas patologías. Puede llevarse a cabo por varias vías.

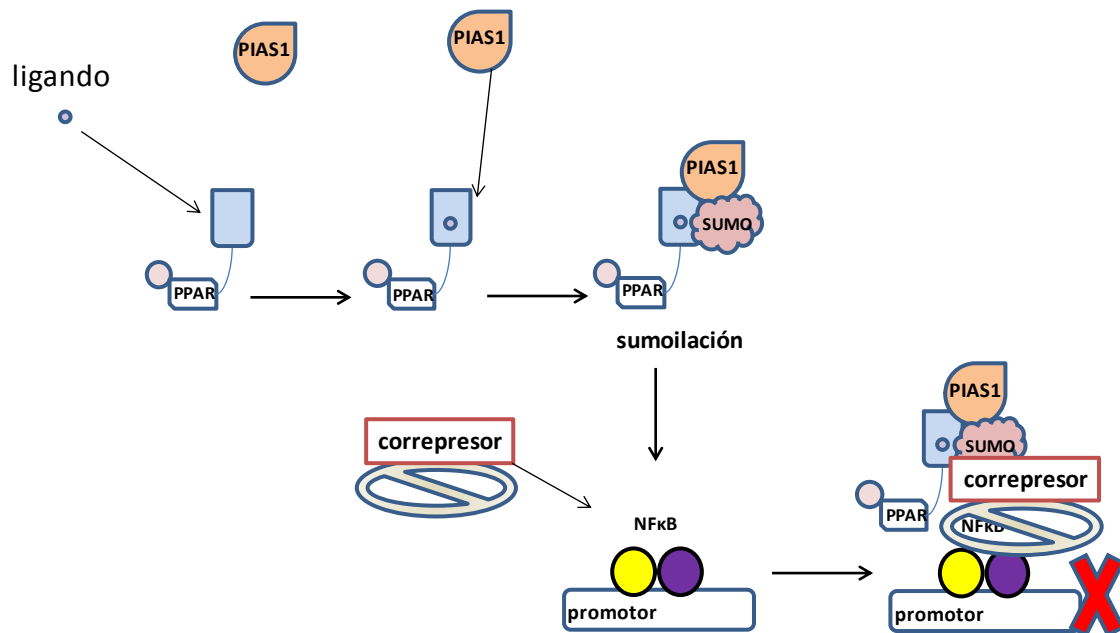
a.- Competición por coactivadores: Tras ser activado por ligando, PPAR $\gamma$  recluta coactivadores. Estos coactivadores, que están presentes en la célula a niveles limitantes, son esenciales para el funcionamiento de todos los factores de transcripción, incluidos NF $\kappa$ B, AP-1, STAT-1 o NFAT que activan la transcripción de genes proinflamatorios. Por tanto, los PPAR compiten por el reclutamiento de estos coactivadores, secuestrándolos e impidiendo la expresión de genes proinflamatorios; de este modo, reducen la respuesta inflamatoria (Fig. 12) (Ricote y Glass, 2007; Choi y Bothwell, 2012).



**Fig. 12:** Competición de los PPAR por coactivadores necesarios para la transcripción de genes. NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas; RXR: receptor X del ácido cis-retinoico.

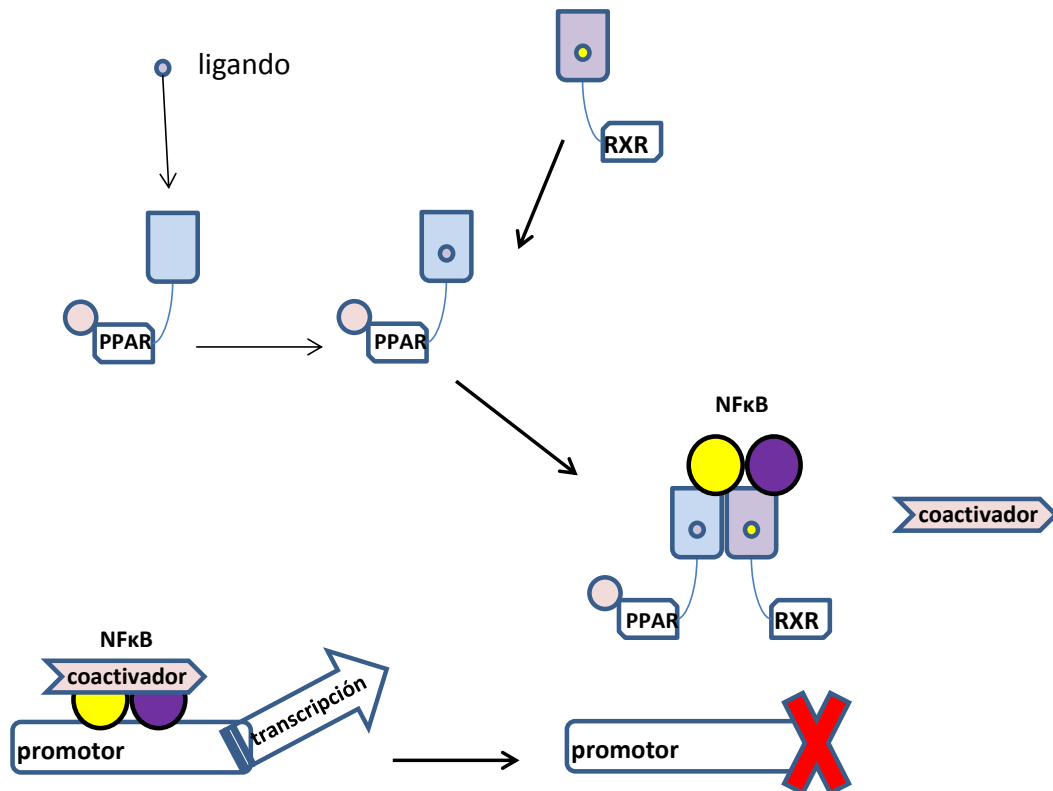
b.- Estabilización de complejos correpresores: Los complejos correpresores NCoR (correpresor nuclear) o SMRT (mediador-silenciador de los receptores de retinoide y hormona tiroidea) inhiben la activación de factores de transcripción proinflamatorios y funcionan como freno para la expresión activa de los genes bajo su control. Se ha descrito que la activación de PPARγ por ligando potencia la interacción del receptor con la proteína inhibidora de STAT1 activada (PIAS1), que adiciona un grupo SUMO (modificadores tipo ubiquitina de pequeño tamaño) al dominio de unión a ligando de PPAR. La adición covalente

de grupos SUMO a los PPAR les permite interactuar y estabilizar a los complejos correpresores y evitar, por tanto, la activación transcripcional de genes implicados en la respuesta inflamatoria (Pascual *et al.*, 2005; Step *et al.*, 2014) (Fig. 13). Parece ser que la interacción con las proteínas HMGA1 (*high-mobility group A1*) podría facilitar este proceso (Bloch *et al.*, 2012).



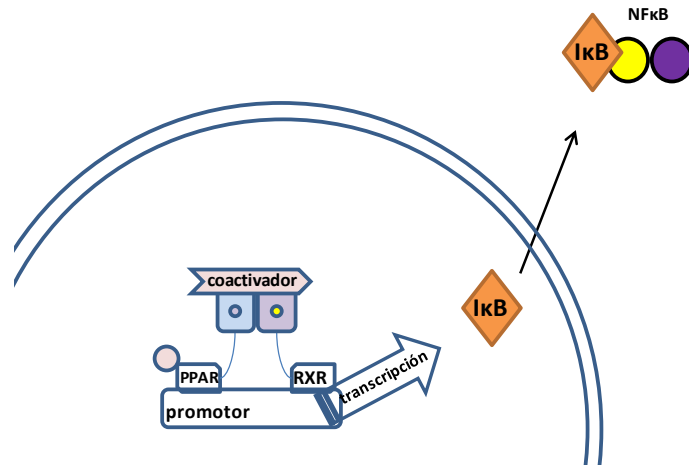
**Fig. 13:** Estabilización de complejos correpresores como NCoR por *sumoilación* de histidinas de PPAR. NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; PIAS1: proteína inhibidora de STAT1 activada; SUMO: grupo sumo; PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas; RXR: receptor X del ácido cis-retinoico.

c.- Interacción con factores de transcripción: Los dímeros PPAR-RXR tienen la capacidad de interactuar físicamente con factores de transcripción, inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios (Ricote y Glass, 2007). Este mecanismo se ha descrito en diversos tipos celulares y con varios factores de transcripción como es el caso de la subunidades p65 y/o p50 de NFκB en CMLV de aorta (Delerive *et al.*, 1999) y de arteria mesentérica de resistencia (AMR) (Montezano *et al.*, 2007) o en macrófagos (Chung *et al.*, 2000); además, también se ha descrito que ocurre con c-Jun de AP-1 en células endoteliales de aorta (Delerive *et al.*, 1999; Ryoo *et al.*, 2004) y en fibroblastos cardiacos (Hou *et al.*, 2013) (Fig. 14).



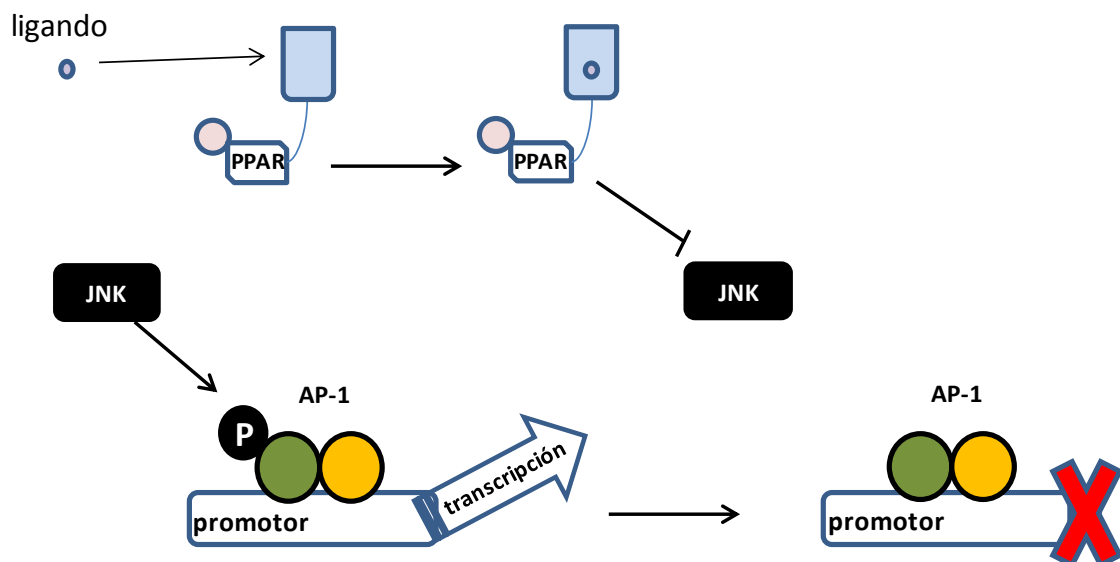
**Fig. 14:** Interacción directa entre PPAR y la subunidad p65 de NFκB. NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas; RXR: receptor X del ácido cis-retinoico.

d.- Efecto sobre las vías de señalización: Los PPAR pueden actuar sobre vías de señalización que conducen a la activación de factores de transcripción. Por ejemplo, la activación de PPAR disminuye la fosforilación de IKK (Martín *et al.*, 2012) y por consiguiente la de IκB, reduciendo así la disociación de p65-p50 del inhibidor y evitando que se trasloque al núcleo (Wang *et al.*, 2007). También puede actuar reduciendo la expresión de IKK y consecuentemente aumentando la de IκB, cuyo promotor tiene un PPRE (Straus *et al.*, 2000; Zingarelli *et al.*, 2003); de esta forma, la activación de PPAR hace que NFκB quede secuestrado en el citosol (Xu *et al.*, 2012) (Fig. 15).



**Fig. 15:** Inducción de la expresión del inhibidor de NFκB (IκB). NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas; RXR: receptor X del ácido cis-retinoico.

La activación de proteínas quinasa como las MAPK, Akt o PKC conduce al inicio de una multitud de rutas de señalización celulares que desembocan en inflamación, proliferación y migración. PPAR tiene efectos antiinflamatorios también por su capacidad para interferir con la activación de estas proteínas quinasa (Desreumaux *et al.*, 2001; Goetze *et al.*, 2002; Paumelle *et al.*, 2006; Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008) (Fig. 16).



**Fig. 16:** La activación de PPAR inhibe quinasa como JNK (quinasa del extremo N terminal de c-jun), inhibiendo así la fosforilación de c-jun y, por lo tanto, la activación del complejo AP-1 (proteína activadora-1). PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas.

## 2.- Represión génica independiente de ligando

Como ya hemos comentado, cuando PPAR no está unido a ligando se encuentra unido a los PPRE formando parte de complejos correpresores junto a RXR. Esto evita que se unan complejos coactivadores y se bloquea la transcripción de estos genes (Ricote y Glass, 2007).

### *Tipos de PPAR*

#### PPAR $\alpha$

PPAR $\alpha$  se expresa, entre otros, en músculo esquelético, riñón e hígado, donde controla la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico a través del control directo de genes implicados en la ruta de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal y mitocondrial, la asimilación de ácidos grasos y el catabolismo de triglicéridos. En este sentido, estudios preclínicos han sugerido un papel de PPAR $\alpha$  en el control del peso corporal, apoyando el uso de sus agonistas para tratar la obesidad (Lefebvre *et al.*, 2006). PPAR $\alpha$  desempeña un papel en el efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides; durante el ayuno y en situaciones de estrés físico y fisiológico, el hipotálamo libera CRH que actúa sobre la hipófisis, la cual libera ACTH que induce la liberación de glucocorticoides de la glándula adrenal y éstos, a su vez, estimulan la expresión hepática de PPAR $\alpha$  (Crisafulli *et al.*, 2009). Además, la expresión de PPAR $\alpha$  sigue un patrón de acumulación diaria según la hora en la que se comienza la ingesta (Lemberger *et al.*, 1996).

PPAR $\alpha$  también se encuentra en células endoteliales y CMLV (Braissant y Wahli, 1998). Se ha observado la capacidad de los agonistas de este receptor para reducir los marcadores proinflamatorios y la progresión de lesiones ateroscleróticas coronarias (Duez, 2002). La regulación de la inflamación por PPAR $\alpha$  se lleva a cabo mediante transrepresión de factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 o NF $\kappa$ B (Delerive *et al.*, 1999; Neve *et al.*, 2000), reduciendo la expresión de mediadores proinflamatorios como ET-1, IL-6, MCP-1, ICAM y COX-2 (Delerive *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha descrito que los ligandos de PPAR $\alpha$  reducen la presión arterial en ratones infundidos con Ang II, por un

mecanismo que implica un incremento de la excreción de  $\text{Na}^+$  a través de la regulación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependiente en el túbulo proximal (Wilson *et al.*, 2012).

Los ácidos grasos  $\Omega$ -3-insaturados como el ácido docosahexanoico (DHA) y el ácido eicosapentanoico (EPA) son agonistas naturales de  $\text{PPAR}\alpha$ . EPA puede ser oxidado, siendo este producto más potente activando  $\text{PPAR}\alpha$  en células endoteliales que el EPA nativo. Además, la oxidación de las LDL las convierte en potentes agonistas de  $\text{PPAR}\alpha$  también en células endoteliales. EPA y DHA poseen muchos efectos cardiovasculares beneficiosos tales como la reducción del riesgo de enfermedad coronaria, hipertensión e infarto (Grygiel-Górniak, 2014). Los agonistas sintéticos de este receptor son los fibratos como el clofibrato, fenofibrato y bezafibrato. Estas sustancias disminuyen las lipoproteínas ricas en triglicéridos por incrementar la expresión génica de proteínas implicadas en la  $\beta$ -oxidación y disminuir la expresión de la apolipoproteína C-III (Fruchart *et al.*, 2001). Su uso está muy extendido en farmacología como agentes hipolipemiantes, para reducir hipertrigliceridemias. Algunos metabolitos de los fibratos como clofibrato o fenofibrato son agonistas duales de  $\text{PPAR}\alpha$  y  $\text{PPAR}\gamma$ , pero con una selectividad 10 veces mayor por  $\text{PPAR}\gamma$  (Giampietro *et al.*, 2012). El bezafibrato puede activar los 3 tipos de PPAR (Grygiel-Górniak, 2014).

### PPAR $\beta/\delta$

PPAR $\beta/\delta$  está expresado en niveles bajos en una gran variedad de tejidos (Braissant y Wahli, 1998). Está implicado en procesos como la regulación de la homeostasis energética, la termogénesis y la proliferación y diferenciación de queratinocitos durante el sanado de heridas (Michalik *et al.*, 2006). En un trabajo con ratones KO para PPAR $\beta/\delta$  se observó que influye en el crecimiento, en la mielinización del sistema nervioso central y en el desarrollo del tejido adiposo (Peters *et al.*, 2000). Además, estimula la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y regula el transporte de colesterol, por lo que se le propuso como posible diana para tratar el síndrome metabólico (Schuler *et al.*, 2006; Barish *et al.*, 2006). A nivel vascular este receptor es claramente activo; sus ligandos reducen la inflamación vascular al menos por dos vías, la liberación del represor BCL-6 y la inducción de TGF- $\beta$ 1 (Bishop-Bailey, 2008). Además, se ha descrito que un agonista de PPAR $\beta/\delta$  reduce el remodelado vascular y la disfunción

endotelial de AMR, la vasoconstricción aórtica y la presión sanguínea en la hipertensión inducida por Ang II (Zarzuelo *et al.*, 2011).

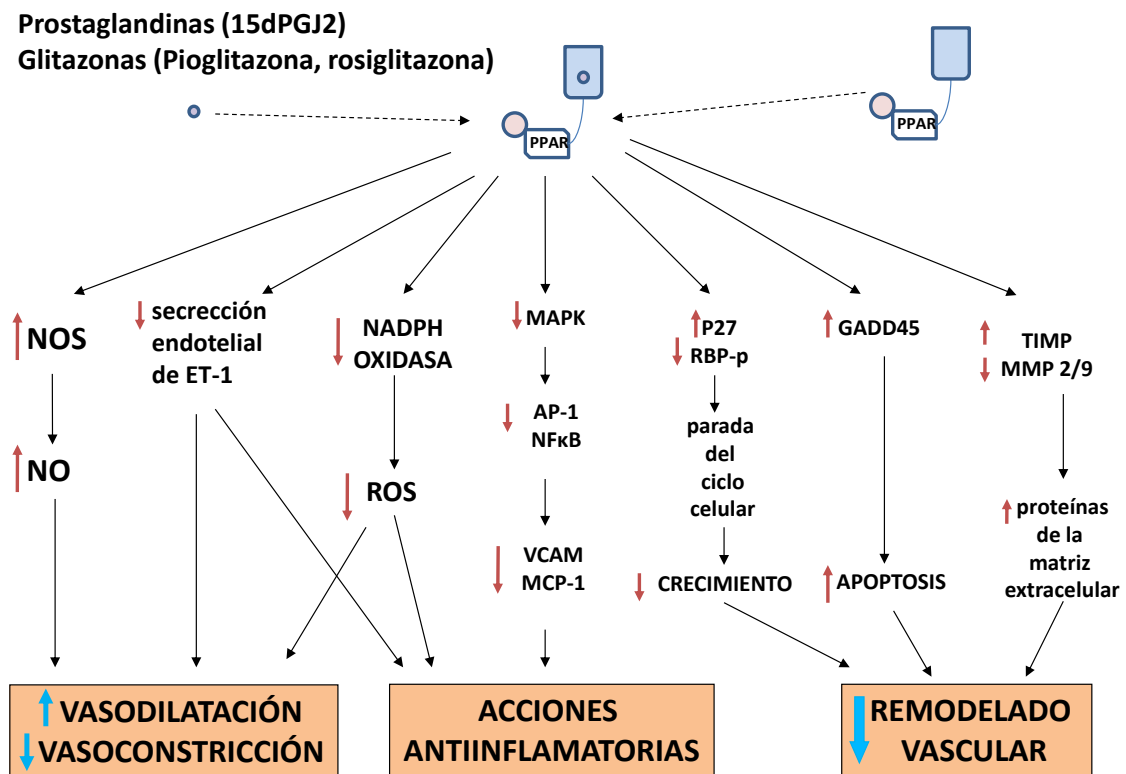
Al igual que por PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , los ácidos grasos poliinsaturados tienen una gran afinidad por PPAR $\beta/\delta$ , así como algunos prostanoides, especialmente la PGI<sub>2</sub> (Krey *et al.*, 1997). Entre los ligandos sintéticos están L-165041, GW-501516 y GW-0742. Se ha descrito que el tratamiento de primates no humanos con estos ligandos normaliza el metabolismo y reduce la adiposidad (Peraza *et al.*, 2006). La activación de PPAR $\beta/\delta$  reduce la resistencia a insulina, los niveles plasmáticos de HDL y tiene efectos antiinflamatorios (Zarzuelo *et al.*, 2011).

### PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  se expresa principalmente en tejido adiposo, aunque su expresión es detectable en una gran cantidad de tejidos incluyendo células endoteliales (Sato *et al.*, 1999), CMLV (Law *et al.*, 2000; Diep y Schiffrin, 2001) y fibroblastos adventiciales (Zhang *et al.*, 2008b). Existen 7 subtipos de PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma_{1-7}$ ) generados a partir del mismo gen por *splicing* alternativo. En todos los subtipos los dominios de unión a ADN y a ligando están muy conservados (Zhou *et al.*, 2002). PPAR $\gamma_2$  se encuentra principalmente en tejido adiposo mientras que PPAR $\gamma_1$ , además de en los adipocitos, se expresa a bajos niveles en muchos tipos celulares, incluyendo los componentes de la pared vascular (Fajas *et al.*, 1997). PPAR $\gamma_3$  es abundante en macrófagos, intestino grueso y adipocitos. PPAR $\gamma_5$ , PPAR $\gamma_6$  y PPAR $\gamma_7$  presentan elevados niveles en macrófagos, aunque PPAR $\gamma_6$  y PPAR $\gamma_7$  también se expresan en tejido adiposo (Usuda y Kanda, 2014). No se sabe demasiado sobre la distribución de PPAR $\gamma_4$ , pero un estudio lo sitúa en tejido adiposo y remarca su importancia en la adipogénesis (Al-Shali *et al.*, 2004).

Fisiológicamente, PPAR $\gamma$  juega un papel importante en la adipogénesis y la expansión del tejido adiposo, fenómeno mediante el cual PPAR $\gamma$  protege al resto de tejidos de sufrir lipotoxicidad (Medina-Gomez *et al.*, 2007). Además, regula el tejido adiposo para que libere una balanceada cantidad de adipoquinas que median efectos sobre la insulina, regulando así la sensibilidad periférica a esta hormona (Kintscher y Law, 2005). Por otra parte, se ha descrito la capacidad de los agonistas de PPAR $\gamma$  para ejercer efectos protectores

cardiovasculares como consecuencia de sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Touyz y Schiffrin, 2006). Este efecto protector se ha asociado con la inhibición de la expresión vascular de enzimas proinflamatorias como COX-2 o iNOS (Staels *et al.*, 1998; Subbaramaiah *et al.*, 2001; Simonin *et al.*, 2002) y con sus propiedades para antagonizar el daño vascular y las alteraciones funcionales inducidas por Ang II (Diep *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008b; Yang *et al.*, 2011). El mecanismo antiinflamatorio propuesto para la activación de PPAR $\gamma$  comprende la interferencia con rutas de MAPK (Desreumaux *et al.*, 2001; Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008) y/o con la activación de AP-1 y NF $\kappa$ B a través de mecanismos de transrepresión (Delerive *et al.*, 1999; Ryoo *et al.*, 2004; Montezano *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2013). En células endoteliales vasculares PPAR $\gamma$  reduce la inflamación mediante la supresión de factores de transcripción como AP-1 y NF $\kappa$ B, de PKC y del estrés oxidativo e inhibiendo la expresión de las moléculas de adhesión ICAM, VCAM y MCP-1 (Pasceri *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2002; Touyz y Schiffrin, 2006) (Fig. 17).



**Fig. 17:** Mecanismos llevados a cabo tras la unión de PPAR $\gamma$  a su ligando. AP-1: proteína activadora-1; ET-1: endotelina-1; GADD45: *growth arrest and DNA damage-inducible*; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos; MMP: metaloproteasas de matriz; NF $\kappa$ B: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera  $\kappa$  de linfocitos B; NO: óxido nítrico; NOS: NO sintasa; TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteasas; RBP: proteína del retinoblastoma; ROS: especies reactivas de oxígeno; VCAM: moléculas de adhesión vasculares. Adaptado de Touyz y Schiffrin, 2006.

PPAR $\gamma$  puede ser activado por ligandos naturales como ácidos grasos poliinsaturados derivados de COX-2 como 15-dPGJ<sub>2</sub> (15-deoxi-delta-12, 14-prostaglandina J<sub>2</sub>) o componentes de lipoproteínas de baja densidad oxidados como el 9- y el 13-HODE (ac. hidroxiocadienoico) (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1998). Además, existen ligandos sintéticos pertenecientes a la familia de las tiazolidinedionas como la troglitazona, la rosiglitazona o la pioglitazona, que se comportan como agonistas con alta afinidad por PPAR $\gamma$  (Lehmann *et al.*, 1995; Willson *et al.*, 1996; Staels y Fruchart, 2005); actualmente se utilizan en clínica para reducir la resistencia periférica a insulina en diabetes mellitus tipo II (Schroner *et al.*, 2011). Aunque la troglitazona fue retirada debido a que producía hepatotoxicidad (Smith, 2003) y la rosiglitazona porque incrementaba el riesgo de eventos cardiovasculares (Nissen y Wolski, 2010), en el año 2013 la FDA eliminó las restricciones de uso de rosiglitazona a la vista de los resultados de la reevaluación de un

ensayo clínico a largo plazo llevado a cabo en el Instituto de Investigación Clínica Duke con pacientes tratados con insulina y pacientes tratados con insulina más rosiglitazona; en este estudio no se observó un mayor riesgo cardiovascular en pacientes que tomaron rosiglitazona (Mahaffey *et al.*, 2013), hecho que fue apoyado por estudios más recientes (Lu *et al.*, 2015). El uso de pioglitazona estuvo siendo evaluado por la Agencia Europea de Medicamentos porque se le relacionó con un incremento en la incidencia de cáncer de vejiga. El estudio concluyó que el tratamiento con pioglitazona incrementaba la incidencia de un 0,07% a un 0,15% y que el balance riesgo-beneficio era positivo para el uso del fármaco (<http://bit.ly/rosiglitazone>); aún así, en Francia fue retirado.

### *PPAR $\gamma$ en hipertensión*

Hemos comentado que la hipertensión es considerada una enfermedad inflamatoria crónica, y que PPAR $\gamma$  tiene importantes acciones antiinflamatorias a nivel vascular; por lo tanto, es lógico pensar que sus agonistas puedan tener efectos beneficiosos en esta patología. Así, está descrito que el tratamiento con los agonistas de PPAR $\gamma$  reduce la presión arterial en diferentes modelos de hipertensión, como en un modelo de lupus eritematoso sistémico de ratón (Venegas-Pont *et al.*, 2009), en ratas infundidas con Ang II (Diep *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2015), en ratas Zucker obesas (Walker *et al.*, 1999), en ratones transgénicos hipertensos (Ryan *et al.*, 2004) y en ratas SHR (Zhang *et al.*, 2010). También en el estudio clínico *PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events* (PROactive Study) se observó una reducción de la presión arterial sistólica tras el tratamiento con pioglitazona (Dormandy *et al.*, 2005). Sin embargo, el efecto antihipertensivo de pioglitazona en ausencia de diabetes o síndrome metabólico es controvertido. Las glitazonas previenen el desarrollo de la hipertensión (Sarafidis y Nilsson, 2006), pero en hipertensión establecida no se encuentra efecto (Llorens *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Shinzato *et al.*, 2007; Hernanz *et al.*, 2012), salvo en casos de tratamientos muy largos (Zhang *et al.*, 2010) o cuando se utilizan grandes dosis de glitazonas (Chan *et al.*, 2010). En un trabajo previo encontramos que el tratamiento con pioglitazona no modificaba ni la respuesta a fenilefrina ni el remodelado vascular, lo que podría explicar esa falta de efecto en hipertensión establecida (Hernanz *et al.*, 2012). Por otra parte, se han observado niveles reducidos de PPAR $\gamma$  en

algunos modelos de hipertensión (Perez-Girón, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Hernanz *et al.*, 2012; Akyürek *et al.*, 2014), y en humanos la existencia de dos mutaciones dominantes negativas de PPAR $\gamma$  se asocia con hipertensión severa (Barroso *et al.*, 1999); esta reducción de la función de PPAR $\gamma$  podría contribuir el incremento de los procesos inflamatorios y al desarrollo de hipertensión.

Ya se han comentado los efectos antiinflamatorios de los agonistas PPAR $\gamma$ , lo que podría contribuir a explicar los efectos de estos compuestos en la patología hipertensiva. Así, en CMLV inhiben la proliferación y la migración por inhibir factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias; también pueden reducir la expresión de VCAM, CXCL1 y MCP-1 incrementados por TNF $\alpha$  (Park *et al.*, 2006; Montezano *et al.*, 2007). Además, PPAR $\gamma$  reduce la expresión de COX-2 incrementada por IL-1 $\beta$  y ET-1 (Montezano *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2012) y el estrés oxidativo (Martín *et al.*, 2012) en hipertensión. En este sentido, se ha descrito que PPAR $\gamma$  reduce la expresión de distintas subunidades de la NADPH oxidasa (Martín *et al.*, 2012; Hernanz *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2012; 2014) e incrementa la expresión de las defensas antioxidantes (Matsumoto *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2014). La reducción en los niveles de ROS incrementa la biodisponibilidad de NO, mejorando así la función vascular en hipertensión (Hernanz *et al.*, 2012). Además, PPAR $\gamma$  incrementa la producción de NO (Ikejima *et al.*, 2008), aumentando la actividad de la eNOS (Polikyriotis *et al.*, 2005); de hecho, ratones KO para PPAR $\gamma$  en endotelio tienen reducida su producción de NO (Kleinhenz *et al.*, 2009). Existe una retroalimentación positiva entre PPAR $\gamma$  y NO, ya que NO también puede activar PPAR $\gamma$  a través de p38 (Ptasinska *et al.*, 2007). Por otra parte, PPAR $\gamma$  modifica los niveles de los productos derivados de la COX-2 y su participación en la función vascular (Peredo *et al.*, 2008; Hernanz *et al.*, 2012).

Uno de los mecanismos descritos acerca del efecto vascular de PPAR $\gamma$  es su capacidad para regular el sistema endotelina. Así, la activación del receptor nuclear reduce los niveles de ET-1 (Delerive *et al.*, 1999; Fukunaga *et al.*, 2001; Potenza *et al.*, 2006; Venegas-Pont *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010) y regula la de sus receptores (Tian *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014); de hecho, Tian *et al.* (2010) observaron que el promotor de ET $_B$  tiene un PPRE. Su acción sobre el sistema endotelina contribuye al efecto antioxidante de los receptores PPAR $\gamma$ ,

pues, como se ha comentado anteriormente, ET-1 incrementa el estrés oxidativo (Banes-Berceli *et al.*, 2005; Callera *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2014b).

PPAR $\gamma$  también tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de los receptores AT $_1$  y sobre la señalización de Ang II *per se*, reduciendo la entrada de Ca $^{2+}$  o la activación de Rho quinasa (Sugawara *et al.*, 2001; Wakino *et al.*, 2004; Ketsawatsomkron *et al.*, 2012); esto puede conducir a una reducción de la actividad del SRA y a una disminución de la síntesis/secreción de aldosterona adrenal (Ketsawatsomkron *et al.*, 2010; Sugawara *et al.*, 2010; 2011), lo que contribuiría a la mejora de las alteraciones vasculares que se observan en la hipertensión. Por otra parte, algunos fármacos que actúan inhibiendo el SRA como el telmisartán y el irbesartán son agonistas de PPAR $\gamma$  (Yuen *et al.*, 2011; Horiuchi *et al.*, 2012); además, el metabolito del losartán EXP3179 puede activar PPAR $\gamma$  (Shad *et al.*, 2014). Por lo tanto, es posible que algunos de los efectos beneficiosos que producen estos fármacos estean mediados por la activación del receptor nuclear.

## **OBJETIVOS**



Los receptores PPAR son factores de transcripción activados por ligando pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares. Además, los PPAR también regulan la expresión génica por mecanismos independientes de su unión a ADN, interfiriendo con otras vías de señalización; estos mecanismos, conocidos como transrepresión, explican las acciones antiinflamatorias de los agonistas PPAR. PPAR $\gamma$  está presente en todas las células de la pared vascular, incluyendo células endoteliales, CMLV y monocitos/macrófagos, donde su activación tiene efectos protectores cardiovasculares que resultan de sus acciones antiinflamatorias, siendo la reducción del estrés oxidativo uno de los eventos principales.

La inflamación es una característica clave en el inicio, progreso e implicaciones clínicas de la hipertensión. Ang II, principal péptido efector del SRA, está aumentada en el plasma tanto de pacientes como de diversos modelos de hipertensión, donde contribuye activamente al estado inflamatorio crónico que se observa en esta patología. Así, Ang II induce enzimas proinflamatorias como COX-2 y aumenta el estrés oxidativo, entre otros muchos efectos. ET-1, el péptido más abundante de la familia de las endotelinas, es producida en células endoteliales y también en CMLV en respuesta a estímulos inflamatorios tales como Ang II. Además de participar en la regulación del tono vascular, ET-1 también actúa como mediador de la respuesta inflamatoria, de manera que se ha propuesto que puede mediar algunos de los efectos cardiovasculares deletéreos de Ang II.

El objetivo general de esta tesis es analizar la modulación por PPAR $\gamma$  de la participación de ET-1 en la aumentada expresión de COX-2 en hipertensión, así como del efecto de ET-1 sobre la contractilidad vascular.

**Objetivos específicos:**

1.- Estudiar el efecto de la activación de PPAR $\gamma$  sobre los niveles vasculares de COX-2, ET-1 y el estrés oxidativo en hipertensión.

2.- Estudiar la participación de ET-1 en la inducción de COX-2 por Ang II.

3.- Estudiar los mecanismos implicados en la inducción de ET-1 y COX-2 por Ang II en hipertensión.

4.- Estudiar los mecanismos implicados en la inducción de COX-2 por ET-1 en hipertensión.

5.- Estudiar el efecto de la activación de PPAR $\gamma$  en los mecanismos por los que ET-1 participa en la expresión de COX-2 inducida por Ang II.

6.- Estudiar la modulación por PPAR $\gamma$  del efecto de ET-1 sobre la contractilidad vascular en hipertensión.

Para ello hemos utilizado aorta de ratas normotensas (WKY), hipertensas (SHR) y SHR tratadas con pioglitazona donde se ha estudiado la expresión de COX-2, de ET-1 y de sus receptores, y de varias subunidades de la NADPH oxidasa así como la actividad de esta enzima. En aorta de ratas SHR tratadas con el antagonista de receptores AT<sub>1</sub> losartán se ha analizado la expresión de ET-1 y de sus receptores.

En arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con pioglitazona hemos analizado el efecto de ET-1 sobre la contracción inducida por fenilefrina, así como la participación de derivados de COX y NO en dicho efecto.

En CMLV de aorta de ratas WKY y SHR hemos analizado:

- La expresión de COX-2 inducida por Ang II y ET-1 en ausencia y en presencia de pioglitazona.
- La participación de ET-1 en la inducción de COX-2 por Ang II.
- Los niveles de ROS y la expresión y actividad de la NADPH oxidasa tras la estimulación con Ang II y ET-1 en ausencia y en presencia de pioglitazona.
- La activación de NF $\kappa$ B y AP-1 tras la estimulación con Ang II y ET-1 en ausencia y presencia de pioglitazona.
- La participación de ROS, NF $\kappa$ B y AP-1 en la expresión de ET-1 y COX-2 inducidas por Ang II y en la de COX-2 inducida por ET-1.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### **Material biológico**

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratas SHR macho y su control normotenso WKY (Wistar Kyoto) de 5-6 meses de edad, criadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (número de registro EX021U), donde se mantuvieron bajo las normas institucionales establecidas (temperatura constante; ciclo de luz/oscuridad de 12 h y acceso libre a comida y agua). Para una parte de este trabajo se han utilizado SHR tratadas durante 28 días con el activador de PPAR $\gamma$  pioglitazona (2,5 mg/Kg x día) y SHR tratadas durante 12 semanas con el antagonista de receptores AT $_1$  losartán (15 mg/Kg x día). Ambos tratamientos se realizaron por vía oral; losartán se disolvió en agua de bebida y pioglitazona se disolvió en agua de bebida con 0,5% de carboximetilcelulosa.

Se midió la presión arterial de los animales mediante pletismografía de la arteria caudal, como se describió en Hernanz *et al.* (2012). De acuerdo con resultados obtenidos previamente, el tratamiento con pioglitazona no modificó la presión arterial (Hernanz *et al.*, 2012) mientras que el tratamiento con losartán la redujo (Alvarez *et al.*, 2007).

Al finalizar el tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación y desangrados. Todos los experimentos cumplieron los requisitos de las leyes españolas y europeas (RD 223/88 MAPA y 609/86). Tras el sacrificio, se obtuvieron segmentos de aorta o arterias mesentéricas de resistencia (AMR) de cada grupo de animales para posteriores determinaciones.

Para los estudios de función vascular se utilizaron terceras ramas de la arteria mesentérica procedentes de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con pioglitazona. El día del experimento los animales fueron sacrificados y una vez extraído el mesenterio, se introdujo en una solución de Krebs-Henseleit (KHS) burbujeada con una mezcla de 95% de O $_2$  y 5% de CO $_2$  (pH=7,4) y mantenida a 4° C. Las AMR fueron cuidadosamente disecadas y limpiadas de la grasa adyacente y tejido conectivo e introducidas en la misma solución de KHS. La composición de KHS fue la siguiente (en mM): NaCl 115,0; KCl 4,6; CaCl $_2$  2,5; KH $_2$ PO $_4$  1,2; MgSO $_4$ ·7H $_2$ O 1,2; NaHCO $_3$  25,0; glucosa 11,1; Na $_2$ EDTA 0,01 a pH=7,4. En estas arterias se

estudió el efecto de ET-1 sobre la respuesta contráctil inducida por fenilefrina como se describe posteriormente.

En segmentos de aorta de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con pioglitazona se determinaron los niveles de ARNm de COX-2, pre-pro-ET-1, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>, NOX-1, NOX-4 y p47phox, así como la actividad NADPH oxidasa. Además, en segmentos de aorta de ratas SHR tratadas con losartán se estudiaron los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 y de ET<sub>A</sub>. En algunos experimentos se utilizaron segmentos de aorta de ratas SHR tratados *ex vivo* con ET-1 en ausencia o presencia de pioglitazona donde se analizó la actividad NADPH oxidasa y la producción de NO.

En cultivos de CMLVs se analizó el efecto de la estimulación con Ang II sobre la expresión de COX-2. La participación de ET-1 se estudió analizando el efecto de los antagonistas de receptores de ET-1 sobre la expresión de COX-2 inducida por Ang II, la producción de ET-1 inducida por Ang II y la expresión de COX-2 tras la estimulación con ET-1. A continuación se analizó si la inducción de COX-2 por Ang II y ET-1 se produce a través del aumento de los niveles de ROS derivados de NADPH oxidasa, para lo cual se estudió: 1) la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> tras la estimulación con AngII y ET-1; 2) el efecto de ambos estímulos sobre la expresión de diversas subunidades de la NADPH oxidasa así como sobre la actividad de esta enzima; 3) el efecto de diversos antioxidantes sobre la expresión de COX-2 inducida por Ang II y ET-1. Para determinar el papel del factor nuclear redox-sensible NFκB, se analizó la expresión nuclear de la subunidad p65 y la expresión de p-IKK; la participación de AP-1 se estudió mediante la determinación de la fosforilación de JNK, los niveles de ARNm de c-jun y la expresión nuclear de p-c-jun; además, se analizó el efecto de los inhibidores de ambas vías sobre la expresión de COX-2 y el estrés oxidativo inducidos por Ang II y ET-1. El efecto de la activación de PPARγ se comprobó mediante el tratamiento previo al estímulo de las células con pioglitazona.

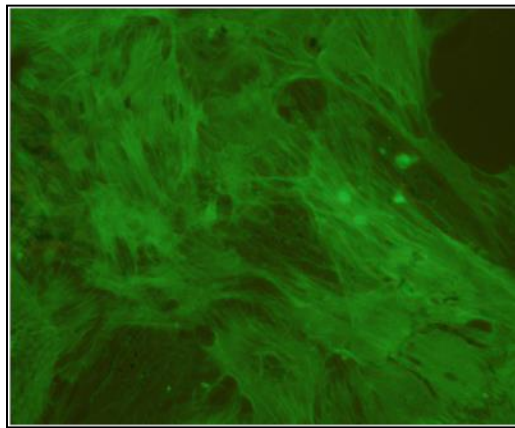
### **Cultivos celulares**

Se obtuvieron cultivos de CMLV de aorta torácica de ratas WKY y SHR de 5 meses de edad mediante explante tisular inmediato al sacrificio del animal, como se describe a continuación. Cada cultivo celular se obtuvo con la aorta de dos-tres animales.

El día previo al sacrificio, se autoclavó todo el material necesario para la extracción del vaso y el aislamiento de los cultivos primarios. Tras sacrificar al animal, se extrajo la aorta y se colocó en una placa de petri inmersa en una mezcla de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), colagenasa de tipo 2 (2 mg/ml), penicilina (200 U/ml), estreptomicina (200 µg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA, 0,1%) a 37° C durante 30 min. A continuación, se eliminó la capa adventicia mecánicamente bajo la lupa con unas pinzas y la capa media se dividió en varios trozos que se colocaron en una placa de 6 pocillos con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado (FBS), penicilina (200 U/ml) y estreptomicina (200 µg/ml). Los explantes se mantuvieron en cultivo reemplazando periódicamente el medio hasta detectarse la formación de colonias de células, momento en que se desecharon dichos explantes. Una vez alcanzado aproximadamente un 50% de confluencia, las células se levantaron con tripsina y se crecieron en una placa de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (F-25). El medio de cultivo usado fue DMEM suplementado con 10% FBS, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células se mantuvieron en un incubador (NuAIRE 425-300E clase 2, NuAIRE, Plymouth, MN, USA) a 37° C, en ambiente húmedo, con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire atmosférico. Durante el periodo de crecimiento del cultivo, el medio se cambió rutinariamente a intervalos de 48-72 h según el grado de metabolización indicado por el viraje a naranja del indicador rojo fenol incluido en el DMEM. Para los experimentos se utilizaron cultivos entre los pases 3 y 8.

Las CMLV en cultivo se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía óptica de contraste de fase (Microscopio Invertido Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemania). Durante su crecimiento, las células formaron varias monocapas que se solapaban, originando una estructura morfológica típica del músculo liso cultivado, denominada estructura en “colinas y valles” (*hills and valleys*). Las células mantuvieron la morfología de músculo liso a lo largo de su crecimiento en todos los subcultivos utilizados para los distintos experimentos.

El fenotipo de las CMLV en cultivo se determinó mediante técnicas de inmunofluorescencia, analizándose la presencia de  $\alpha$ -actina, ya que es la primera proteína que se expresa en las células musculares lisas. Para ello, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti  $\alpha$ -actina procedente de ratón (dilución 1:200, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), seguido de incubación con el anticuerpo secundario fluorescente anti-ratón FITC diluido 1:10 (Ex 494 nm; Em 518 nm; Invitrogen-Gibco Life Technologies, Paisley, UK). La fluorescencia se visualizó mediante un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), utilizando un objetivo de 63x<sub>aceite</sub> (zoom 2x) (Fig. 18).



**Fig. 18:** Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -actina de CMLV de aorta de rata.

Antes de realizar los tratamientos, las CMLV se sembraron en placas de 6 pocillos y se ayunaron durante 24 h en DMEM suplementado con 0,2% FBS, penicilina (200 U/ml) y estreptomycin (200  $\mu$ g/ml) con el objetivo de ralentizar su crecimiento celular. A continuación, las CMLV se estimularon con Ang II (100 nM) durante 1 o 2 h y con ET-1 (100 nM) durante 1 h para comprobar su efecto sobre la expresión de COX-2 y pre-pro-ET-1 así como sobre el estrés oxidativo. La expresión de COX-2 se estudió mediante western blot y los niveles de ARNm de COX-2 y pre-pro-ET-1 mediante qRT-PCR. Para analizar el estrés oxidativo se cuantificó la producción de anión superóxido mediante fluorescencia, la actividad NADPH oxidasa mediante el ensayo de lucigenina y los niveles de ARNm de NOX-1 y NOX-4 mediante qRT-PCR.

Además, se estudió la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP-1. Para ello, se incubaron los cultivos con Ang II y ET-1 (a los tiempos indicados en la sección de

resultados) y se cuantificaron la expresión de p65 y p-c-jun en núcleo por western blot e inmunofluorescencia, los niveles de ARNm de c-jun así como la activación de JNK y de IKK detectando la expresión de las formas fosforiladas mediante western blot.

Para analizar la participación de las distintas vías estudiadas algunos cultivos fueron tratados, a los tiempos y concentraciones que se indican en la sección de resultados, con los siguientes fármacos: el inhibidor de JNK1/2 SP600125, el inhibidor del proteasoma lactacistina, el inhibidor de NADPH oxidasa apocinina, el inhibidor de la subunidad catalítica de NADPH oxidasa NOX-1 ML171, el barredor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalasa, el antagonista de receptor ET<sub>A</sub> de ET-1 BQ123 y el antagonista de receptor ET<sub>B</sub> de ET-1 BQ788. El efecto de la activación de PPAR $\gamma$  sobre la expresión de COX-2 y ET-1 inducida por Ang II se estudió mediante la incubación previa de los cultivos con pioglitazona (10  $\mu$ M) durante 18 h.

### **Western Blot**

La expresión proteica se analizó por técnicas de western blot en lisados celulares conteniendo extractos totales (20-25  $\mu$ g) o fracciones nucleares y citosólicas (15  $\mu$ g). Para obtener los extractos totales se lavaron los cultivos 2 veces con PBS frío y se añadieron 100  $\mu$ l de tampón RIPA [*Radio immunoprecipitation assay buffer*: 30 mM Tris-HCl pH=7,4, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 1% deoxicolato sódico y 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS)], se rasparon las células y se recogieron los lisados celulares en tubos eppendorf de 1,5 ml; estos lisados se incubaron durante 30 min a 4° C en agitación orbital y después se centrifugaron a 20.000xg para eliminar el material insoluble, guardando el sobrenadante y desechando el precipitado.

Para obtener los extractos nucleares y citosólicos, se lavaron las células con 1 ml de PBS a 4°C, se rasparon en 100  $\mu$ l de un tampón hipotónico (tampón A: 0,02 M HEPES pH=8, 0,01 M KCl, 0,15 mM EDTA pH=8, 0,15 mM EGTA pH=8), se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 1.500xg durante 5 min a 4° C. El sobrenadante (fracción citosólica) se almacenó para posteriores análisis y el precipitado se resuspendió en un tampón hipertónico (tampón B: 0,02 M HEPES pH=8, 0,450 M NaCl, 25% de glicerol, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM EDTA pH=8, 0,15 mM EGTA pH=8) y se incubó en agitación orbital a 4° C durante

30 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 25.000xg durante 5 min a 4° C para eliminar el material insoluble. El sobrenadante (fracción nuclear) se guardó a -80° C hasta su análisis.

Tanto el tampón RIPA como los tampones usados para realizar los extractos nucleares y citosólicos se suplementaron con una mezcla de inhibidores de proteasas cOplete (Roche Diagnostics, Barcelona, España) y con distintos inhibidores de fosfatasas incluyendo 50 mM NaF (inhibidor de tirosin fosfatasas), 1 mM ortovanadato sódico (inhibidor de serin-treonin fosfatasas) y 20 mM  $\beta$ -glicerofosfato (falso sustrato para fosfatasas).

La concentración de proteína fue determinada usando el reactivo de Bradford y midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placa (SPECTRA Fluor Plus, Tecan Ibérica, Barcelona, España). A la absorbancia de las muestras se le sustrajo la absorbancia de sus respectivos tampones (RIPA en el caso de extractos totales, tampón A en el caso de extractos citosólicos y tampón B en el caso de extractos nucleares). Los valores de absorbancia medidos se interpolaron en una recta patrón construida a partir de diluciones de concentración conocida de BSA. Se calculó el volumen de muestra necesario en función de la cantidad de proteína que se deseaba cargar y se mezcló con el volumen necesario de solución de tampón de carga o tampón Laemmli 5X [300 mM Tris-HCl, pH=6,8; 10% SDS; 25%  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,5% (p/v) azul de bromofenol; 50% glicerol]. La mezcla se incubó a 95° C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas.

En un sistema de electroforesis Mini-Protean® 3 Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), se polimerizaron dos geles SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), gel 1 o gel separador (7,5, 10 ó 15% acrilamida, dependiendo de la proteína a estudiar; 4,6% Tris-HCl pH=8,8; 0,1% SDS; 0,038% persulfato amónico; 0,033% temed; 3,4% glicerol) y gel 2 o gel concentrador (3% acrilamida; 1,49% Tris-HCl pH=6,8; 0,1% SDS; 0,98% persulfato amónico; 0,053% temed), en los cuales se separaron las proteínas en condiciones desnaturalizantes. El gel separador se hizo al 7,5% de acrilamida para COX-2 y p-IKK/IKK, al 10% para p-JNK/JNK y p-c-Jun y al 15% para p65 TBP. Los geles se introdujeron en una cubeta llena de tampón de electroforesis (25 mM Tris; 200 mM glicina; 1% SDS) y las muestras se cargaron en el gel concentrador junto con el marcador de peso molecular de

amplio rango pre-teñido (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). A continuación se llevó a cabo la electroforesis aplicando un voltaje constante de 80-100 mV, haciendo que las muestras pasasen por el gel concentrador primero y por el gel separador después. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (*Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting* 0,2 µm, BioRad Laboratories) previamente activadas con metanol. Para ello, el gel, la membrana y varias láminas de papel Whatman se colocaron en un sistema “sandwich” dentro de un sistema de transferencia (*Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell*, BioRad Laboratories), inmersos en una solución de transferencia (25 mM Tris; 190 mM glicina; 0,05% SDS; 20% metanol). La transferencia se realizó a 100 V a 4° C durante 1 h.

Una vez transferidas las proteínas, las membranas se trataron durante 1-2 h a temperatura ambiente en agitación continua con solución de bloqueo [5% leche desnatada o 5% BSA disueltos en solución de lavado (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20)], para evitar uniones inespecíficas. A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4° C con anticuerpos primarios para COX-2 (1:150, anticuerpo policlonal de conejo, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), p65 (1:1.000, anticuerpo policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Alemania), p-c-Jun (1:500, anticuerpo policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology Inc), p-JNK (1:2.000, anticuerpo monoclonal de conejo, Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA) y p-IKK (1:200, anticuerpo policlonal de cabra, Santa Cruz Biotechnology Inc). Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados sucesivos de 15 min con solución de lavado para eliminar los restos de anticuerpo primario que no se habían unido. A continuación, las membranas fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, correspondiente a cada hospedador (1:5.000, BioRad Laboratories). Se volvieron a realizar tres lavados de las membranas y se incubaron con un sustrato comercial (*Amersham ECF Western Blotting Reagent Pack*, GE Healthcare, Little Chalfont, UK); la fosfatasa alcalina rompe este sustrato haciendo que emita fluorescencia. Las bandas se visualizaron empleando el scanner de fluorescencia Typhoon 9210 (GE Healthcare) determinándose la intensidad de las bandas mediante el software Imagequant TL (GE Healthcare). La misma membrana se usó para

determinar en extractos totales la expresión de  $\alpha$ -actina (1:150.000, anticuerpo monoclonal de ratón, Sigma Chemical Co.), IKK (1:200, anticuerpo monoclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y JNK (1:1.000, anticuerpo monoclonal Cell Signalling Technology, Inc.) y en extractos nucleares la de TBP (1:2.000, anticuerpo policlonal, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Todos los anticuerpos fueron diluidos en solución de lavado con 5% de leche desnatada en polvo.

### **Inmunofluorescencia**

Para comprobar la localización celular de p65 tras el estímulo con Ang II y ET-1 con o sin tratamientos, se cultivaron CMLV de SHR en cristales colocados en el interior de placas de 24 pocillos (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Alemania) a una densidad de  $6 \times 10^4$  células/pocillo. Al alcanzar un 60% de confluencia, las células se ayunaron añadiendo medio DMEM con 0,2% de FBS durante 24 h. Las células fueron tratadas o no con pioglitazona (10  $\mu$ M) durante 18 h y después se estimularon con Ang II (100 nM) durante 45 min o ET-1 (100 nM) durante 40 min. Tras realizar distintos lavados con PBS, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 10 min y se permeabilizaron con una solución de PBS conteniendo 0,2% BSA y 0,5% Tritón X-100. Tras varios lavados, se procedió al bloqueo de posibles reacciones inespecíficas incubando durante 1 h con una solución PBS con 5% BSA y 0,05% Tritón X-100. A continuación, se añadió el anticuerpo primario anti-p65 de conejo (1:200 en la solución de bloqueo previamente mencionada) y se incubó toda la noche a 4° C en una cámara húmeda. Después se realizaron varios lavados con PBS con 0,2% de BSA y 0,05% de Tritón X-100, tras los cuales se añadió el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo (H+L) (1:2.000; Invitrogen Life Technologies) preservándolo de la luz. Se incluyeron controles que se incubaron con anticuerpo secundario en ausencia de anticuerpo primario. Tras sucesivos lavados, las células se incubaron durante 15 min con DAPI (1:10.000; Invitrogen Life Technologies) para teñir el núcleo. A continuación, se procedió al montaje en los portaobjetos empleando *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen Life Technologies), y se dejó secar completamente en la oscuridad hasta el día siguiente. La inmunofluorescencia de las células teñidas se observó con un microscopio de fluorescencia (Nikon, C1 plus, Nikon Instruments Europe, Surrey, UK).

### **Cuantificación de ARNm**

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 CMLV y en segmentos de aorta de rata congelados inmediatamente después de la extracción y conservados a -80° C hasta su utilización. Para ello, se obtuvo ARN total usando TRIreagent, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El TRIreagent, buffer específico para la extracción y preservación de ARN total en un solo paso, produce la ruptura de las células al disolver lípidos y precipitar proteínas.

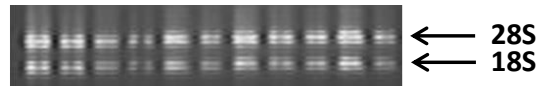
En el caso de los cultivos celulares, una vez finalizados los distintos tratamientos a los que se sometieron, se retiró el medio de ayuno y se realizaron tres lavados con PBS previamente refrigerado y se añadió en cada pocillo 1 ml de TRIreagent. Las células se homogeneizaron pipeteando arriba y abajo varias veces con una micropipeta y se pasaron a microtubos estériles de 1,5 ml, donde se añadió 200 µl de cloroformo a cada muestra. Se taparon bien los tubos y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos, dejándolos después en reposo durante 5 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se centrifugó a 12.000xg durante 15 min a 4° C, obteniéndose 3 fases: una fase roja en la parte inferior del tubo (contiene proteínas), una interfase blanca (contiene ADN) y una fase superior incolora (contiene ARN); esta última se transfirió a un microtubo al que se añadieron 500 µl de isopropanol y 10 µg de glucógeno, que forma complejos con los ácidos nucleicos permitiendo la formación de precipitados visibles y fácilmente manipulables; se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000xg durante 10 min a 4° C, produciéndose la precipitación del ARN. Se eliminó el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol al 75% al precipitado y se centrifugó a 12.000xg, durante 5 min a 4° C. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire. Por último, se resuspendió el precipitado en 10 µl de agua libre de nucleasas.

En el caso de los segmentos aórticos, previo a la extracción del ARN total, se preparó y esterilizó el material, para evitar contaminación con ARNasas. Para ello, el vástago del politrón a utilizar se introdujo durante 4 h en un horno (Heraeus T5050, Hanau, Alemania) a 200° C y se mantuvo durante 6 h en una solución 50 mM de NaOH preparada en agua

bidestilada autoclavada y tratada durante toda la noche anterior con 0,01% de dietilpircarbonato (DEPC), un inhibidor de ARNasas. A continuación, se autoclavó el vástago y se mantuvo en condiciones estériles hasta su utilización. Los tubos en los cuales se iba a llevar a cabo la homogenización se introdujeron durante la noche anterior al procesamiento del tejido en una solución de NaOH 50 mM preparada con agua tratada con DEPC. Una hora antes del comienzo de la extracción, se eliminó por completo el NaOH de los tubos, lavando repetidas veces cada tubo con agua tratada con DEPC para evitar alteraciones en el pH que pudieran afectar a la extracción.

Los segmentos aórticos fueron homogenizadas en frío con un Politrón (PT-2010, Kinematica AG, Lucerna, Suiza) en 1 ml de TRIreagent, según el método modificado de Chomczynski y Sacchi (1987). A continuación las muestras se centrifugaron a 10.000xg y se recogieron los sobrenadantes, con los que se siguió el mismo protocolo especificado para células.

El ARN procedente de CMLV y de segmentos de aorta se cuantificó en un sistema Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, USA), el cual determina su absorbancia a 260 nm. Además, se midieron las absorbancias a 230 y 280 nm para determinar las relaciones obtenidas entre 260 y 280 nm y 260 y 230 nm y comprobar que estaban dentro de los rangos establecidos que determinan la calidad del mismo. Una vez cuantificado el ARN total obtenido, se comprobó el estado de los distintos ARNs por la visualización de los ARNr 18S y 28S en gel de agarosa (1%) (Fig. 19). Para ello se mezcló 1 µg de ARN con tampón de carga de ARN desnaturalizante compuesto de formaldehído al 18,5%, formamida al 50%, MOPS 40 mM, Ficoll al 4% y azul de bromofenol como marcador del frente de la electroforesis. A esta mezcla se le añadió 0,1 µg/µl de bromuro de etidio y se calentó a 95° C con el fin de desnaturalizar el ARN. La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% disuelta en tampón MOPS y formaldehído 0,6 M en condiciones desnaturalizantes.



**Fig. 19:** Visualización de ARN 18S y 28S en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.

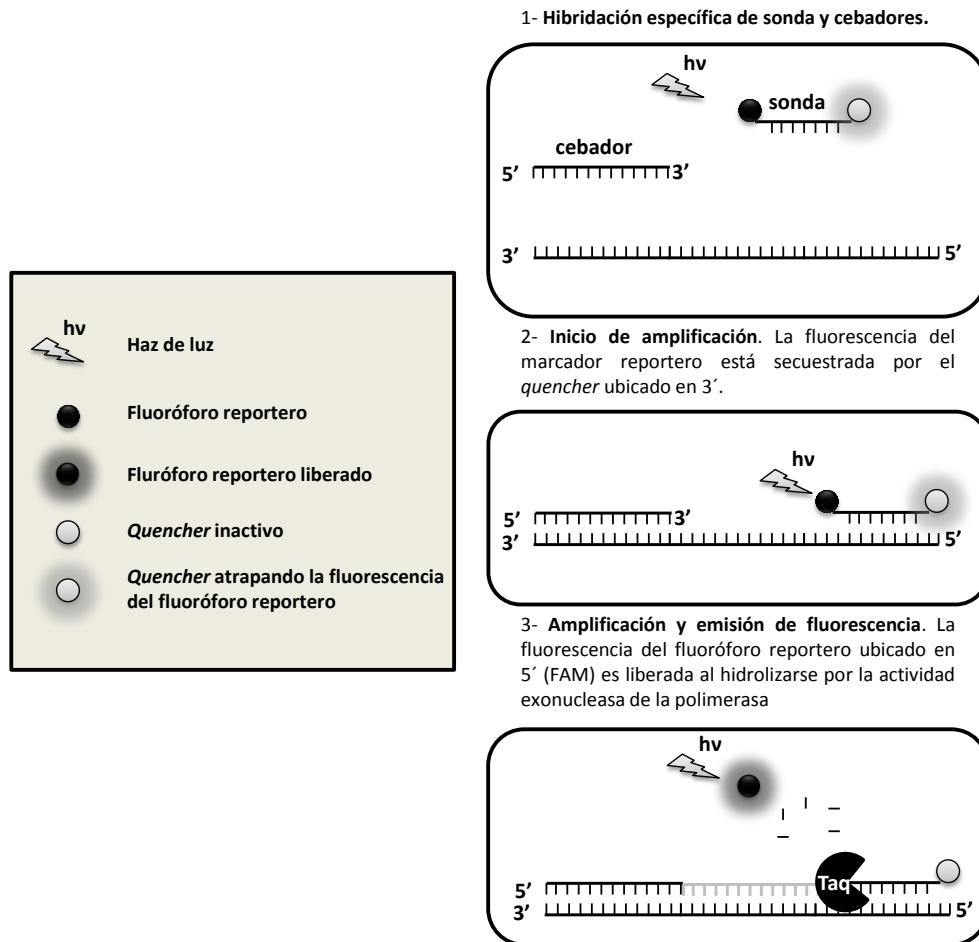
A continuación se procedió a la retrotranscripción de 1  $\mu$ g de ARN a ADN complementario (ADNc) usando el *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en 10  $\mu$ l de reacción. Los ARNs se mezclaron con los reactivos del kit y se introdujeron en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) donde se llevó a cabo la reacción, definiendo un único ciclo con los siguientes pasos: 10 min a 25° C y 2 h a 37° C. Se añadió un último paso a 85° C durante 5 min para inactivar la retrotranscriptasa. Finalizada la retrotranscripción, y asumida un 100% de eficacia en la conversión del ARN total a ADNc, los ADNc se almacenaron a -20° C hasta su posterior utilización.

#### *qRT-PCR*

La PCR a tiempo real se llevó a cabo mediante sondas Taqman MGB (*minor Groove binder*) de 18-22 pb, marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo reportero. En situación de no amplificación, no se detecta fluorescencia debido a que este fluoróforo permanece neutralizado por una molécula situada en el extremo 3' (*quencher*) que inhibe esta señal por medio de Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET). Este *quencher*, a su vez, puede emitir fluorescencia o no; en este trabajo se han usado sondas marcadas con *quencher* no fluorescente (NFQ, *non fluorescence quencher*).

Una vez iniciada la PCR, los cebadores hibridan con sus secuencias diana en los ADNc y la polimerasa comienza a amplificar. Una vez alcanzada la zona de hibridación de la sonda Taqman, y debido a la capacidad 5' exonucleasa de la polimerasa usada, se hidrolizará el fluoróforo reportero fijado a la sonda y se liberará fluorescencia, la cual será registrada como se indica posteriormente por un sistema de detección (Fig. 20). Por lo tanto, se necesita la hibridación específica tanto de los cebadores como de las sondas para la correcta amplificación y detección del producto.

Las sondas utilizadas fueron de diseño comercial (*Taqman gene expression assays*, Applied Biosystems Hispania, Alcobendas, España) y constan de una pareja de cebadores de alta eficiencia (cuyas regiones complementarias están ubicadas en distintos exones del ARNm a analizar), y de la sonda Taqman marcada con FAM como fluoróforo reportero (cuyo máximo de emisión está a la longitud de onda de 535 nm), la cual hibrida con un segmento interior de la secuencia a analizar que comprende a los dos exones en cuyos extremos se sitúan los cebadores. De este modo, la construcción permite amplificar productos pequeños, entre 60-200 pb, con muy alta especificidad y sensibilidad; además, al ser estrictamente necesario el procesamiento intrónico para la hibridación tanto del par de cebadores como de la sonda taqman, se minimiza la posibilidad de detección de ADN genómico.



**Fig. 20:** Esquema mostrando los distintos pasos de la PCR a tiempo real y el principio que permite relacionar la emisión de fluorescencia con la cantidad de producto amplificado. Adaptado de Pérez-Girón, 2009.

Las reacciones se prepararon en placas de 96 pocillos (*MicroAmp optical 96 well reaction plate*, Applied Biosystems Hispania), analizándose cada muestra por duplicado o triplicado en el caso de genes de menor expresión. Cada reacción se preparó en una campana de flujo laminar (Mini-V / PCR, Telstar, Madrid, España), previamente esterilizada por luz ultravioleta, en un volumen final de 10  $\mu$ l conteniendo:

- 4,5  $\mu$ l de ADNc diluido con agua libre de nucleasas, a una concentración determinada previamente por curvas de concentración específicas para el ADNc de cada gen a amplificar; para estas curvas se utilizó una mezcla de ADNc de todas las situaciones experimentales a analizar.
- 5,5  $\mu$ l de mezcla de reacción que consta de 5  $\mu$ l de *Taqman Universal PCR Mastermix 2X* con ROX como fluorocromo para control de carga de la mezcla (Applied Biosystems Hispania) y 0,5  $\mu$ l de mezcla 20X de Sonda Taqman y del par de cebadores específicos para cada gen (Tabla 4).

ARNm a analizar	Referencia (Applied Biosystems)
COX-2	Rn00568225_m1
c-jun	Rn00440945_m1
NOX-1	Rn00586652_m1
Pre-pro-ET-1	Rn00561129_m1
$\beta_2$ -microglobulina	Rn00560865_m1
Ciclofilina D	Rn01458749_g1

**Tabla 4:** Sondas *taqman* usadas en la PCR a tiempo real

Una vez preparadas las reacciones, las placas se sellaron con papel adhesivo óptico (*MicroAmpFast 96 Well*, Applied Biosystems Hispania), el cual no interfiere con la emisión de fluorescencia pero si evita la evaporación durante los periodos de desnaturalización.

Las distintas cinéticas de amplificación se registraron empleando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) perteneciente al CAT (Centro de Apoyo Tecnológico) de la Universidad Rey Juan Carlos, usando las siguientes condiciones: 30 segundos 95° C y 40 ciclos (15 segundos a 95° C, 1 min

a 60° C). Para normalizar se usaron  $\beta_2$ -microglobulina o ciclofilina D como controles endógenos. Para calcular la expresión relativa usamos el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

### **Cuantificación de la producción de anión superóxido**

Los niveles de anión superóxido “*in situ*” fueron determinados por medio del análisis de la emisión de fluorescencia en imágenes obtenidas por microscopía confocal, usando el método del dihidroetidio (DHE), como previamente se ha descrito (Jiménez-Altayó *et al.*, 2006). La hidroetidina es capaz de atravesar libremente las membranas celulares y oxidarse en presencia de  $O_2^-$  transformándose en oxietidio, el cual queda atrapado en el interior celular debido a su capacidad para intercalarse en el ADN. El oxietidio se excita a 535 nm de longitud de onda y emite una fluorescencia roja a 610 nm.

Para llevar a cabo la detección de anión superóxido en CMLV, éstas se sembraron y crecieron sobre cristales situados en el interior de placas de 6 pocillos. Alcanzada una confluencia del 60-80%, las células fueron ayunadas durante 24 h con DMEM suplementado con 0,2% de FBS y posteriormente estimuladas con Ang II (100 nM) durante 2 h o ET-1 (100 nM) durante 1 h en presencia y ausencia de la preincubación durante 18 h con pioglitazona (10  $\mu$ M). Como situación control se utilizaron cultivos celulares no estimulados. Transcurrido el periodo de tratamiento, las CMLV se incubaron con DHE (10  $\mu$ M) disuelto en medio DMEM con 0,1% de BSA durante 30 min a 37° C. La fluorescencia fue detectada usando un objetivo de inmersión de 40X en un microscopio confocal Leica TCS SP5, equipado con un láser kriptón/argón (Leica Microsystems).

Se cuantificaron los valores de la intensidad de fluorescencia de 10-15 núcleos por experimento e imagen usando el software de análisis de imagen Metamorph para PC. Se asignó el valor 100 a la fluorescencia en ausencia de estímulo (control), representándose el resto de situaciones como incremento respecto al control.

### **Actividad NADPH oxidasa**

La actividad de la NADPH oxidasa se determinó mediante quimioluminiscencia emitida por la reacción entre la lucigenina y  $O_2^-$ , de acuerdo con el procedimiento descrito por San José *et al.* (2009), con ligeras modificaciones. La lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina) es un compuesto aromático que es reducido por el  $O_2^-$  produciendo emisión de luz que puede ser detectada en un luminómetro.

Para analizar la actividad NADPH oxidasa en CMLV, tras los tratamientos con pioglitazona e inhibidores se estimularon los cultivos con Ang II (100 nM, 1 h) o ET-1 (100 nM, 1 h), tras lo cual fueron lavados dos veces con PBS frío y las CMLV raspadas usando un tampón fosfato (50 mM  $KH_2PO_4$ , 1 mM EGTA y 150 mM sacarosa). La actividad NADPH oxidasa en la pared vascular se analizó en segmentos de aorta de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con pioglitazona. En otro grupo de experimentos se incubaron 3 segmentos de aorta de SHR a 37° C con PBS; uno de los segmentos se usó como control y los otros dos se incubaron *ex vivo* con ET-1 (1 nM, 90 min) tratados o no previamente con pioglitazona (10  $\mu$ M, 18 h). A continuación los segmentos se almacenaron a -80° C hasta su utilización. Los segmentos fueron homogeneizados en tampón fosfato usando un tubo y un émbolo de cristal. Los homogenizados de CMLV y aorta fueron colocados por duplicado (50  $\mu$ l) en placas de 96 pocillos (U96 PP-0.5 ML White, Thermo Fisher Scientific Inc). A cada pocillo se le añadieron 175  $\mu$ l de tampón fosfato y 1,25  $\mu$ l de lucigenina. La luminiscencia fue medida a 750 nm con un luminómetro de placas (Berthold modelo Orion II, Titertek-Berthold, Pforzheim, Alemania) cada 1,8 segundos durante 3 min obteniendo así un registro basal de los niveles de especies reactivas de oxígeno. A continuación, se añadieron a cada pocillo 25  $\mu$ l de NADPH, cofactor del complejo enzimático, y se midió de nuevo la luminiscencia cada 1,8 segundos durante 3 min, obteniendo así un registro de especies reactivas de oxígeno producidas por NADPH oxidasa. A estos valores se les restaron los basales y el resultado fue normalizado con la concentración de proteína. Se asignó el valor de 100 a la luminiscencia en ausencia de estímulo (control), representándose el resto de situaciones como incremento respecto al control.

### **Determinación de los niveles de NO**

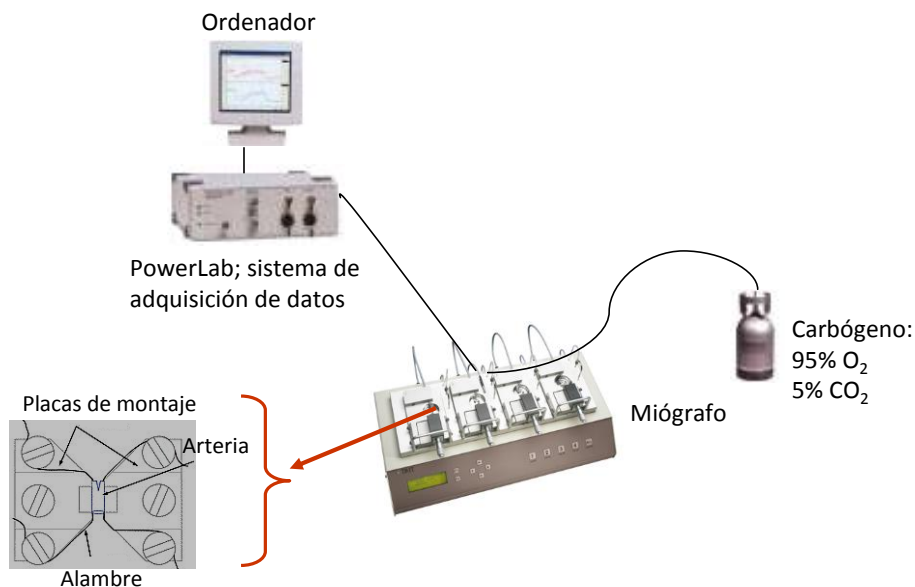
La producción de NO fue determinada en 3 segmentos aórticos de SHR, uno de ellos se usó como control y los otros dos se incubaron con ET-1 (1 nM, 90 min) previamente tratados o no con pioglitazona (10  $\mu$ M, 18 h). En primer lugar se estabilizaron los segmentos aórticos con HEPES durante 30-45 min a 37° C. Posteriormente se incubaron con la sonda fluorescente 4,5- diaminofluoresceína (DAF-2) (20  $\mu$ M en tampón HEPES, pH 7,4) durante 45 min a 37° C (Martínez-Revelles *et al.*, 2013). A continuación, los segmentos aórticos fueron permeabilizados con tritón 0,05 % durante 3 min y se midieron los niveles de NO en el medio utilizando un espectrofluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Al finalizar el protocolo experimental, los segmentos aórticos fueron pesados. 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. La cantidad de NO liberado fue expresado en unidades arbitrarias por mg de tejido.

### **Reactividad vascular**

Los estudios de reactividad en AMR se realizaron según el método descrito por Mulvany y Halpern (1977). Para ello, segmentos arteriales de aproximadamente 2 mm de longitud 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  $\mu$ m de diámetro por la luz de la arteria (Fig. 21).

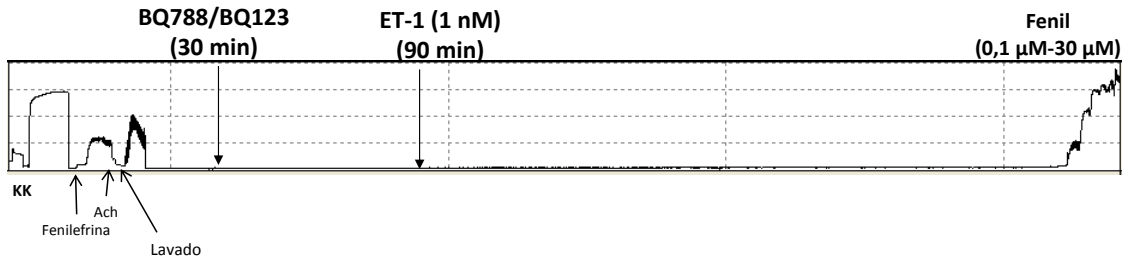
Después de un periodo de estabilización de 30 min en KHS oxigenada a 37° C y pH 7,4 las arterias se estiraron gradualmente hasta conseguir la tensión óptima en función de su diámetro. Para ello, en cada segmento arterial se determinó la relación entre la tensión de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso y, a partir de ella, la circunferencia interna correspondiente a una presión transmural de 100 mm Hg para un vaso relajado *in situ* ( $L_{100}$ ). Para la realización de los experimentos, las arterias se situaron con una circunferencia interna  $L_1$ , siendo  $L_1 = 0,9 \times L_{100}$ , circunferencia a la cual el desarrollo de tensión es máximo. El diámetro de las arterias se determinó como  $l_1 = L_1/\pi$ . Una vez

finalizado el proceso de normalización, los segmentos arteriales se lavaron 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) la cual es idéntica a KHS excepto que NaCl fue reemplazado por KCl a una concentración equimolar.



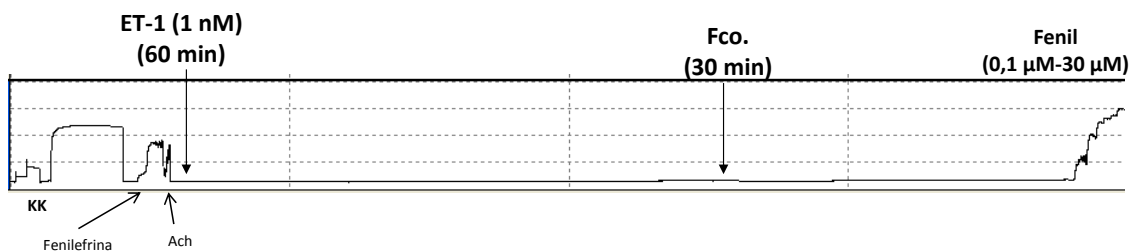
**Fig. 21:** Esquema representativo del miógrafo de alambres donde se realizaron los experimentos de reactividad vascular.

En primer lugar se determinó la presencia de endotelio funcional por la capacidad de 10  $\mu$ M de acetilcolina (ACh) de producir relajación en arterias previamente contraídas con el agonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos fenilefrina a una concentración tal que induce, aproximadamente, el 50% de la contracción producida por  $K^+$ -KHS. Se consideraron segmentos con endotelio funcional aquellos que relajaban con ACh más de un 80% del tono previo en ratas WKY y más de un 60% en las ratas SHR. A continuación, se procedió al lavado de las preparaciones arteriales y tras 90 min de incubación con ET-1 (1 nM), se realizó una curva concentración-respuesta a fenilefrina (0,1-30  $\mu$ M). En algunos experimentos se analizó la participación de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en el efecto de ET-1, para lo cual se incubaron los segmentos arteriales con sus respectivos antagonistas, BQ123 y BQ788, 30 min antes de la administración de ET-1 (Fig. 22).



**Fig. 22:** Esquema representativo del protocolo experimental realizado en los experimentos de reactividad vascular en AMR de ratas WKY y SHR usando los antagonistas de los receptores de ET-1. ACh: acetilcolina.

La participación de los derivados de COX en la contracción inducida por fenilefrina en presencia de ET-1 se analizó utilizando el inhibidor no selectivo indometacina (10  $\mu$ M); para comprobar el papel de derivados de la COX-2 se usó el inhibidor selectivo NS 398 (1  $\mu$ M); también se analizó el efecto de SQ29,548 (1  $\mu$ M) y de SC 19220 (10  $\mu$ M) para comprobar la participación de los receptores TP y EP1/EP3, respectivamente, sobre la respuesta a fenilefrina. Para analizar el papel del NO en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina se estudió el efecto producido por L-NAME, (100  $\mu$ M), inhibidor no selectivo de la eNOS, sobre dicha respuesta. Estos fármacos se administraron 30 min antes de iniciar la curva concentración-respuesta a fenilefrina (Fig. 23).



**Fig. 23:** Esquema general representativo del protocolo experimental realizado en los experimentos de reactividad vascular en AMR de ratas WKY y SHR. ACh: acetilcolina; Fco: fármacos.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  error estándar (ES). n hace referencia al número de animales utilizados en el caso de segmentos arteriales o al número de cultivos usados en el caso de las CMLV. Los análisis estadísticos que se llevaron a cabo fueron *t* de Student pareada o no pareada y ANOVA de una o dos vías seguido de

Bonferroni. Los valores se consideraron significativos cuando la probabilidad era menor del 5% ( $p < 0,05$ ).

### **Soluciones y fármacos utilizados**

Los fármacos se prepararon como soluciones concentradas (10 o 100 mM) disueltas en agua milli-Q y mantenidas en el congelador a  $-20^{\circ}$  C. Los fármacos no disueltos en agua fueron: SC19220, SP600125, NS398, indometacina y pioglitazona que se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) y SQ29,548 que se disuelve en etanol. Se realizaron pruebas para comprobar que este solvente no modificaba la función vascular, la expresión de proteínas o el ARNm en nuestros experimentos. Cada día del experimento se preparaban las diluciones necesarias a partir de las concentradas.

#### *Listado de fármacos utilizados*

- Acetilcolina, hidrocloreuro (Sigma Chemical Co)
- Ácido etilendiamintetraacético (EDTA) (Sigma Chemical Co)
- Ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) (Sigma Chemical Co)
- Ácido tiobarbitúrico (4-6-Dihidroxipirimidina-2-tiol) (Sigma Chemical Co)
- Acrilamida (N, N'- metilen-bis-acrilamida 30%, solución 29:1, 3,3% C) (BioRad Laboratories)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma Chemical Co)
- Agarosa (Sigma Chemical Co)
- Agua libre de nucleasas (Sigma Chemical Co)
- Angiotensina II (Sigma Chemical Co)
- Apocinina (4'-Hidroxi-3'-metoxiacetofenona) (Fluka, Sigma Chemical Co)
- Azul de bromofenol (3'3'', 5'5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódica) (Sigma Chemical Co)
- BQ123 (Sigma Chemical Co)
- BQ788 (Sigma Chemical Co)
- Bromuro de etidio (Sigma Chemical Co)
- Buffer Salino Fosfato (PBS) con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma Chemical Co)
- Buffer Salino Fosfato (PBS) sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma Chemical Co)

Carboximetilcelulosa, sal sódica (Sigma Chemical Co)  
Catalasa (Sigma Chemical Co)  
Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania)  
Colagenasa Tipo 2 (Invitrogen-Gibco Life Technologies)  
Deoxicolato de sódio (Sigma Chemical Co)  
Dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma Chemical Co)  
Dihidroetidio (Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies)  
Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)  
DMEM con glutamina, piruvato y 1 g/L de glucosa (Sigma Chemical Co)  
Dodecilsulfato sódico (SDS) (BioRad Laboratories)  
Endotelina-1 (Sigma Chemical Co)  
Etanol (96% volumen/volumen, Merck)  
Fenilefrina (Sigma Chemical Co)  
Ficoll (GE Healthcare)  
Fluoruro de sodio (NaF) (Sigma Chemical Co)  
Glicerol (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España)  
Glicina (Sigma Chemical Co)  
Glucógeno (Sigma Chemical Co)  
Glucosa (Sigma Chemical Co)  
Hepes (Sigma Chemical Co)  
Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac)  
Igepal (Sigma Chemical Co)  
Indometacina (ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1-H-indol-3-acético) (Sigma Chemical Co)  
Isopropanol (Merck)  
Lactacistina (Sigma Chemical Co)  
Leche desnatada (Sveltesse, Nestlé, Vevey, Suiza)  
L-NAME (N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginina metil éster) (Sigma Chemical Co)  
Losartán (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA)  
Lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina) (Sigma Chemical Co)  
Metanol (Sigma Chemical Co)

ML171 (Merck)

NADPH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, sal tetrasódica) (Sigma Chemical Co)

NS398 (N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Calbiochem)

Ortovanadato sódico (Sigma Chemical Co)

Paraformaldehído (Panreac)

Penicilina/Estreptomina (Sigma Chemical Co)

Persulfato amónico (APS) (Sigma Chemical Co)

Pioglitazona (generosamente suministrado por Lilly Spain y Takeda)

Polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween 20) (BioRad)

Reactivo de Bradford (Sigma Chemical Co)

Sacarosa (Merck)

SC19220 (ácido 2-Acetilhidrazida 10(11H)-carboxílico) (Sigma Chemical Co)

SQ29,548 ([ácido 1S-[1. $\alpha$ .,2. $\alpha$ .(Z),3. $\alpha$ .,4. $\alpha$ .]]-7-[3-[[2-[(fenilamino) carbonil] hidrazino] metil] -7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-5- heptenoico) (ICN Ibérica S.A., Barcelona, España)

SP600125 (1,9-Pirazoloantrona) (Merk)

Suero fetal bovino (FBS) (Reactiva)

Temed (N,N,N',N'-tetra-metil-etilenodiamina) (Sigma Chemical Co)

Tripsina-EDTA (Sigma Chemical Co)

Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (Sigma Chemical Co)

Tritón X100 (Sigma Chemical Co)

TriReagent (Sigma Chemical Co)

$\beta$ -glicerofosfato(Sigma Chemical Co)

$\beta$ -mercaptoetanol (BioRad)



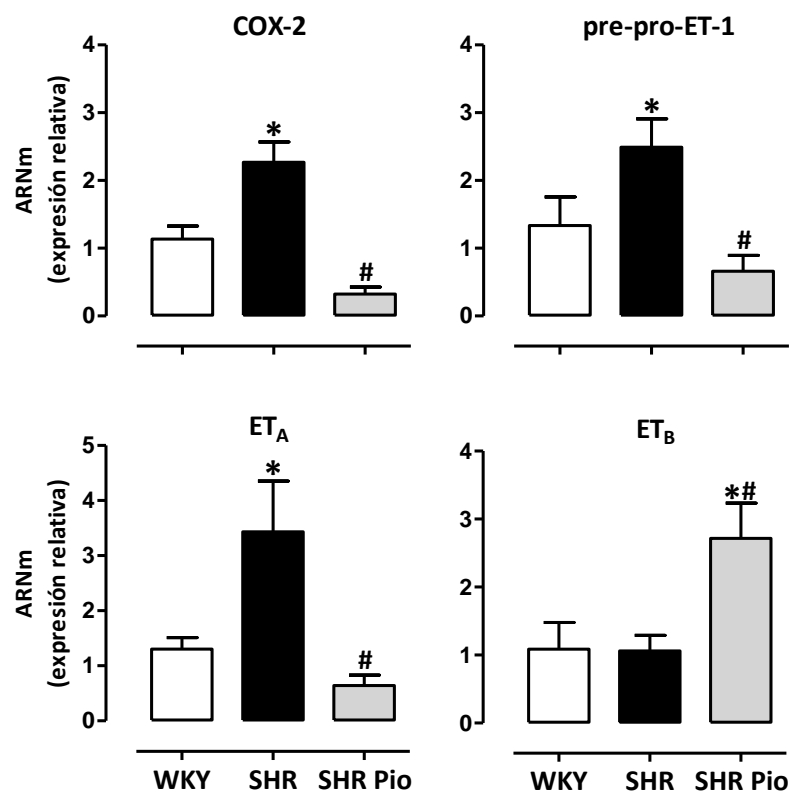
## **RESULTADOS**



**Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por Ang II mediante la inhibición de la producción de ROS y ET-1 en CMLV de ratas hipertensas**

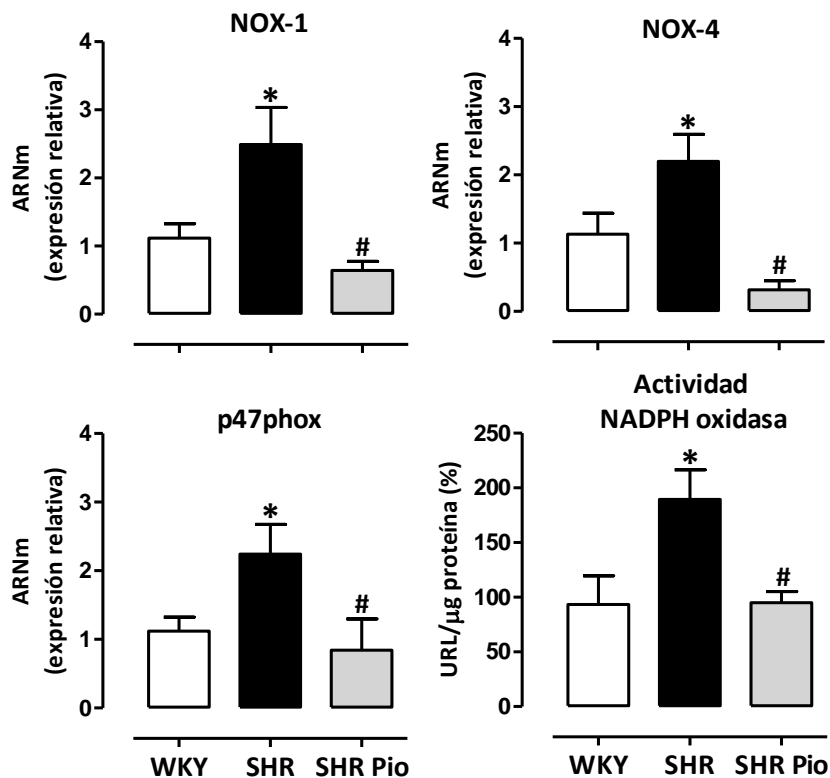
*Pioglitazona reduce la incrementada expresión vascular de COX-2, ET-1 y el estrés oxidativo asociados al sistema renina-angiotensina en hipertensión*

En primer lugar analizamos los niveles de ARNm de COX-2, pre-pro-ET-1 y de sus receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en segmentos vasculares de animales normotensos e hipertensos. Dichos niveles fueron superiores en aorta de ratas SHR que en WKY, a excepción de los del receptor ET<sub>B</sub> que fueron similares (Fig. 24). A continuación, comprobamos que el tratamiento de SHR con el agonista PPAR $\gamma$  pioglitazona redujo los niveles de ARNm de COX-2, pre-pro-ET-1 y ET<sub>A</sub>; sin embargo, dicho tratamiento aumentó los niveles del receptor ET<sub>B</sub> (Fig. 24).



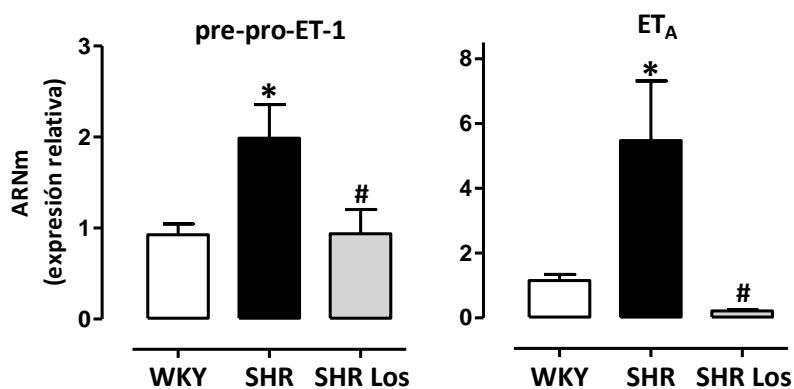
**Fig. 24:** Niveles de ARNm de COX-2, pre-pro-ET-1 y de los receptores de ET-1 ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en aorta de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con pioglitazona (SHR Pio: 2,5 mg/Kg x día, 4 semanas). Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. \*  $p < 0,05$  respecto a WKY, #  $p < 0,05$  respecto a SHR, mediante  $t$  de Student no pareada.  $n = 5-8$ .

Nuestro grupo ha descrito previamente un aumento del estrés oxidativo en ratas hipertensas (Álvarez *et al.*, 2007). Confirmando estos resultados, ahora observamos en aorta de ratas SHR elevados niveles de ARNm de las subunidades del complejo enzimático NADPH oxidasa NOX-1, NOX-4 y p47phox, así como de la actividad de dicha enzima. El tratamiento de SHR con pioglitazona redujo la expresión de las distintas subunidades y normalizó la actividad de la enzima (Fig. 25).



**Fig. 25:** Niveles de ARNm de las subunidades de la NADPH oxidasa NOX-1, NOX-4 y p47phox y actividad NADPH oxidasa, determinada mediante el ensayo de lucigenina, en aorta de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con pioglitazona (SHR Pio: 2,5 mg/Kg x día, 4 semanas). Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como valores relativos respecto a WKY. \*  $p < 0,05$  respecto a WKY, #  $p < 0,05$  respecto a SHR, mediante *t* de Student no pareada.  $n = 4-7$ .

En un trabajo previo de nuestro grupo se ha descrito el papel del SRA en la incrementada expresión de COX-2 y del estrés oxidativo que se observa en SHR (Álvarez *et al.*, 2007). Para comprobar si el SRA también está involucrado en la mayor expresión de ET-1 observada en SHR, se trataron estas ratas con losartán, antagonista de receptores de Ang II AT<sub>1</sub>. Como puede observarse en la figura 26, el tratamiento de SHR con losartán (15 mg/Kg x día, 12 semanas) redujo los aumentados niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 y de su receptor ET<sub>A</sub> en aorta, apoyando el papel del SRA en este aumento.

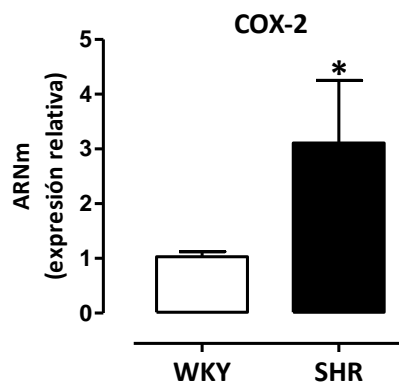


**Fig. 26:** Niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 y del receptor de ET-1 ET<sub>A</sub> en segmentos de aorta de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con losartán (SHR Los, 15 mg/Kg x día, 12 semanas). Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. \* p < 0,05 respecto a WKY, # p < 0,05 respecto a SHR, mediante *t* de Student no pareada. n= 6-8.

*Ang II induce la expresión de COX-2 en CMLV de ratas WKY y SHR*

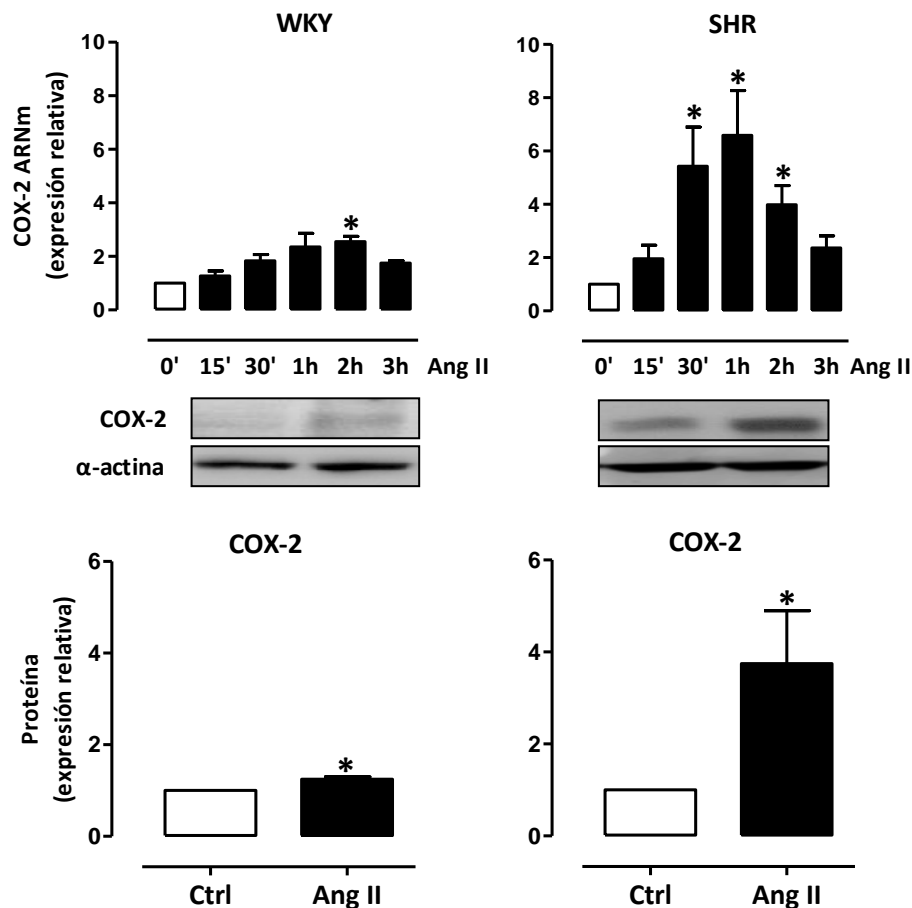
Para tratar de clarificar los mecanismos por los cuales pioglitazona reduce la incrementada transcripción de COX-2 y ET-1 así como el estrés oxidativo observado en ratas hipertensas, los siguientes experimentos se llevaron a cabo usando cultivos de CMLV.

De forma análoga a lo observado en segmentos aórticos, los niveles de ARNm de COX-2 fueron mayores en CMLV de aorta de ratas SHR que en las de WKY (Fig. 27).



**Fig. 27:** Niveles de ARNm de COX-2 en CMLV de ratas WKY y SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. \*  $p < 0,05$  respecto a WKY, mediante *t* de Student no pareada.  $n = 6-8$ .

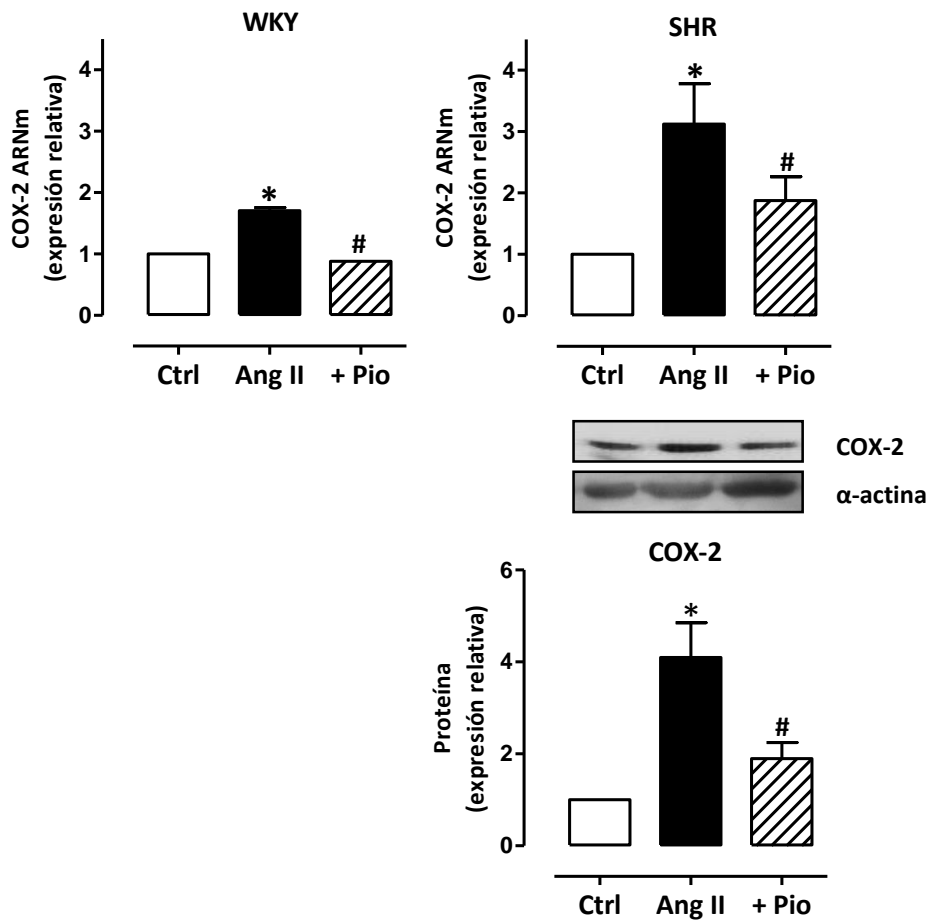
Ang II (100 nM) aumentó los niveles de ARNm de COX-2 de forma tiempo-dependiente en CMLV de aorta de ambas cepas (Fig. 28). En la figura 28 también se muestra el aumento de expresión proteica de COX-2 tras 2 horas de incubación con Ang II; dicho aumento fue mayor en cultivos procedentes de ratas SHR que en los de ratas WKY (WKY:  $1,25 \pm 0,05$ ; SHR:  $3,75 \pm 1,15$ ,  $p < 0,05$ , mediante *t* de Student no pareada).



**Fig. 28:** Inducción dependiente del tiempo de ARNm de COX-2 producida por Ang II (100 nM, 15' -3 h) en CMLV de aorta de ratas WKY y SHR. Efecto del tratamiento de CMLV de aorta de ratas WKY y SHR con Ang II (100 nM, 2 h); sobre los histogramas de expresión proteica se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl o 0'). \*  $p < 0,05$  respecto al control, mediante ANOVA de medidas repetidas de una vía seguido de Bonferroni o *t* de Student pareada.  $n = 4-8$ .

*Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por Ang II en CMLV de WKY y SHR*

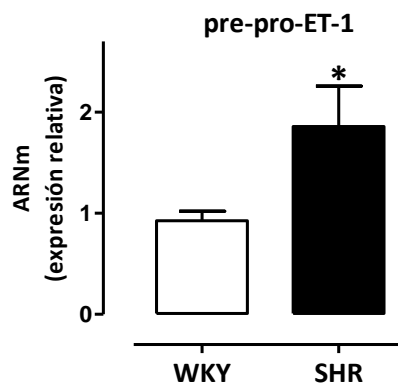
El tratamiento con el agonista de PPAR $\gamma$  pioglitazona (10  $\mu$ M, 18 h) redujo los niveles de ARNm de COX-2 inducidos por Ang II (100 nM, 2 h) en CMLV de WKY y de SHR. El tratamiento también redujo la expresión proteica de COX-2 en SHR (Fig. 29); en ratas WKY no se evaluó el efecto de pioglitazona sobre la expresión de COX-2 debido al escaso incremento producido por Ang II (ver figura 28).



**Fig. 29:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18h) sobre los niveles de ARNm y proteína de COX-2 en CMLV de aorta de ratas SHR y de WKY estimuladas con Ang II (100 nM, 2 h). 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 (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante t de Student pareada.  $n = 5-8$ .

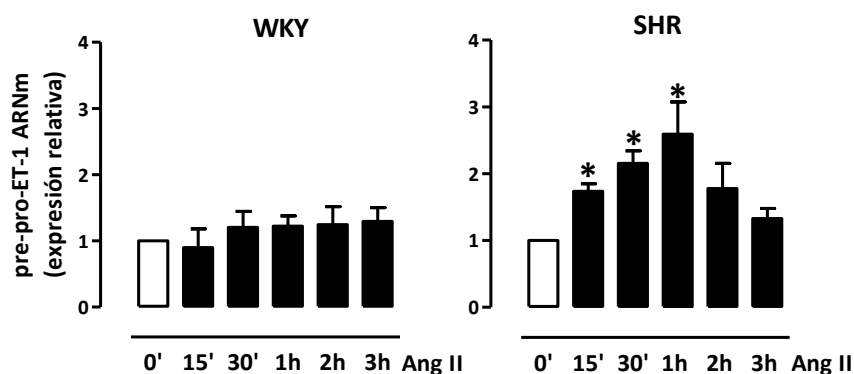
*ET-1 contribuye a la inducción de COX-2 por Ang II en CMLV de SHR*

En primer lugar analizamos los niveles de ET-1 en CMLV de aorta de animales normotensos e hipertensos. Al igual que ocurría en segmentos de aorta, los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 fueron mayores en CMLV de ratas SHR que en las de WKY (Fig. 30).



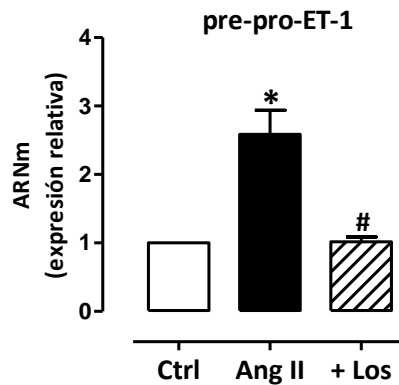
**Fig. 30:** Niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 en CMLV de ratas WKY y SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. \*  $p < 0,05$  respecto a WKY, mediante *t* de Student no pareada.  $n = 6-7$ .

La incubación con Ang II (100 nM, 15' -3 h) incrementó los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 en CMLV de SHR de forma tiempo-dependiente. Sin embargo, en CMLV de WKY no se observó efecto de Ang II sobre los niveles de ET-1 (Fig. 31), razón por la que continuamos nuestro estudio en CMLV de SHR.



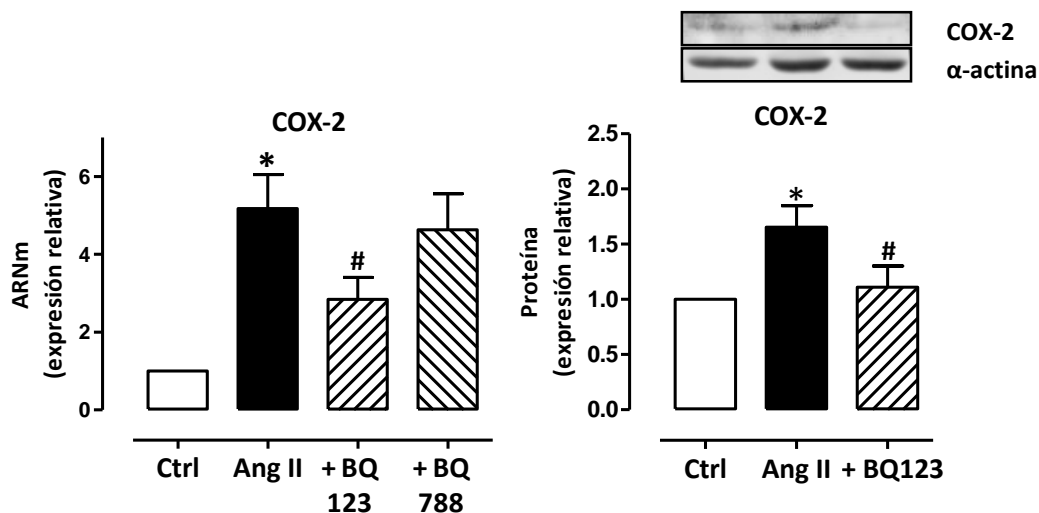
**Fig. 31:** Inducción dependiente del tiempo de ARNm de pre-pro-ET-1 producida por Ang II (100 nM, 15' -3 h) en CMLV de ratas WKY y SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (0'). \*  $p < 0,05$  respecto al control, mediante ANOVA de medidas repetidas de una vía seguido de Bonferroni.  $n = 4-7$ .

Como se ha comentado anteriormente, el aumento de los niveles de pre-pro-ET-1 en segmentos aórticos de SHR es dependiente de la activación de receptores  $AT_1$  por Ang II. En CMLV de SHR, el tratamiento con losartán ( $10 \mu\text{M}$ ) inhibió el efecto de Ang II sobre los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1, confirmando la participación del receptor  $AT_1$  en este efecto (Fig. 32).



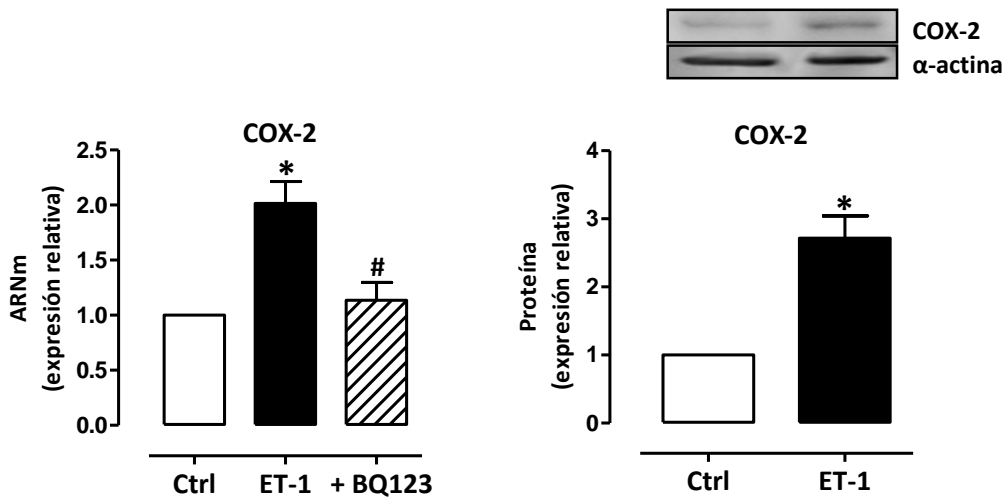
**Fig. 32:** Efecto de losartán (Los,  $10 \mu\text{M}$ , 1 h) sobre los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 en CMLV de aorta de ratas SHR estimuladas con Ang II ( $100 \text{ nM}$ , 1 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-8$ .

Para analizar el papel de ET-1 en el incremento de COX-2 producido por Ang II, incubamos las células con el antagonista de receptores ET<sub>A</sub> de ET-1 BQ123 y con el de receptores ET<sub>B</sub> BQ788. BQ123 (1  $\mu$ M) redujo el incremento en los niveles de COX-2 inducido por Ang II, tanto a nivel de ARNm como de proteína; sin embargo, BQ788 (1  $\mu$ M) no tuvo ningún efecto sobre el ARNm, por lo que no se analizó su efecto sobre la expresión proteica (Fig. 33).



**Fig. 33:** Efecto de BQ123 (1  $\mu$ M, 1 h) y BQ788 (1  $\mu$ M, 1 h) sobre la inducción de ARNm y de proteína de COX-2 producida por Ang II (100 nM, 2 h) en CMLV de SHR; 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 (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-6$

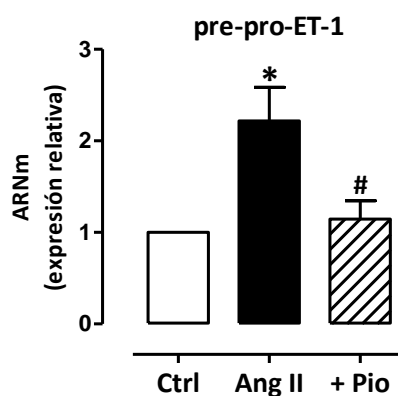
Estos resultados sugieren que ET-1, activando receptores ET<sub>A</sub>, participa en la inducción de COX-2 producida por Ang II en CMLV de aorta de ratas SHR. Para confirmar esta hipótesis, analizamos el efecto de la incubación con ET-1 (100 nM, 1 h); en estas condiciones, se observó un incremento en el ARNm y proteína de COX-2. Este efecto fue dependiente de receptores ET<sub>A</sub> ya que el tratamiento con su antagonista BQ123 (1 μM) redujo la inducción del ARNm de COX-2 por ET-1 (Fig. 34).



**Fig. 34:** Efecto de ET-1 (100 nM, 1 h) sobre los niveles de ARNm y proteína de COX-2 en CMLV de SHR; sobre el histograma de expresión proteica se muestra un blot representativo. También se muestra el efecto de BQ123 (1 μM, 1 h) sobre los niveles de ARNm. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-6$ .

*Pioglitazona reduce el incremento en la expresión de ET-1 inducida por Ang II en CMLV de SHR*

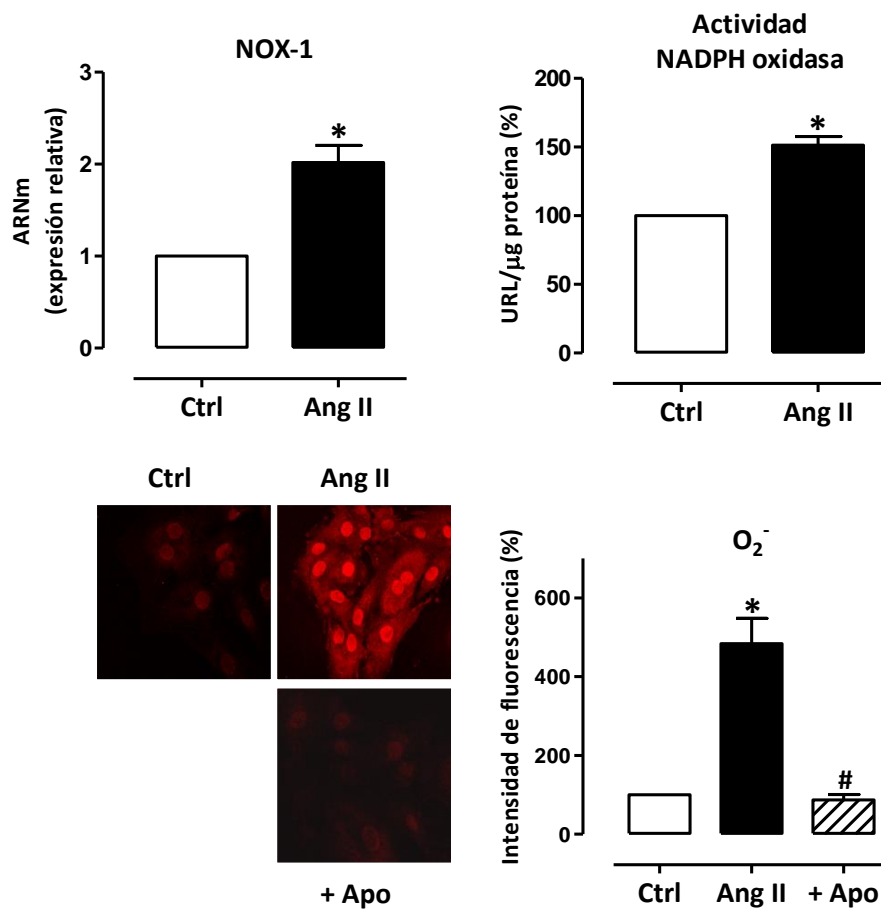
Debido a la participación de ET-1 en la expresión de COX-2 inducida por Ang II en CMLV de SHR, analizamos la posibilidad de que el efecto de pioglitazona inhibiendo la inducción de COX-2 por Ang II se deba, al menos en parte, a que afecte a la expresión de ET-1. Para comprobarlo, tratamos CMLV de SHR con el agonista de PPAR $\gamma$  y observamos que pioglitazona redujo la expresión de ET-1 producida por Ang II (Fig. 35).



**Fig. 35:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18 h) sobre los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 inducidos por Ang II (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-8$ .

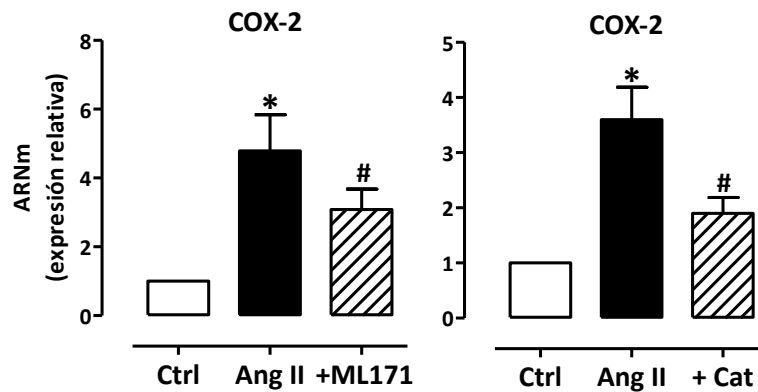
*El estrés oxidativo contribuye a la expresión de ET-1 y COX-2 inducida por Ang II*

La capacidad de Ang II para producir especies reactivas de oxígeno es un hecho bien conocido. Como ya se ha comentado, nuestro grupo había demostrado que el incremento de ROS en SHR es debido, al menos en parte, al aumento de la actividad del SRA (Álvarez *et al.*, 2007). La incubación de CMLV de SHR con Ang II incrementó los niveles de ARNm de NOX-1, la actividad del complejo enzimático NADPH oxidasa y, en consecuencia, los niveles de anión superóxido (Fig. 36).



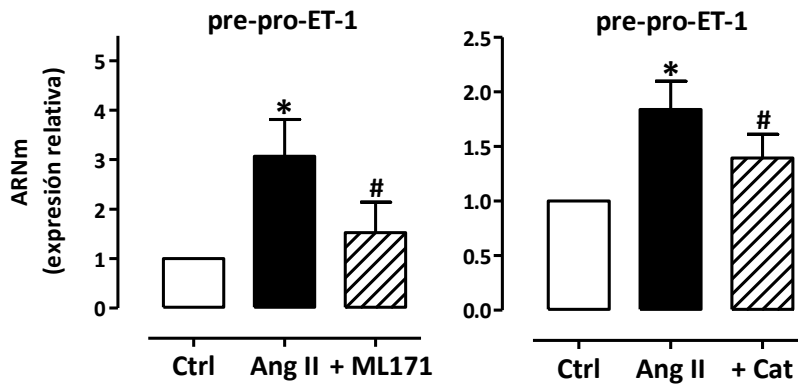
**Fig. 36:** Efecto de Ang II (100 nM, 2 h) sobre los niveles de ARNm de NOX-1, la actividad NADPH oxidasa y la producción de anión superóxido en CMLV de SHR. Las microfotografías muestran imágenes representativas de la producción de anión superóxido; se usó apocinina (Apo, 30 μM) como control negativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \* p < 0,05 respecto a Ctrl, # p < 0,05 respecto a Ang II, mediante t de Student pareada n= 5-9.

Para comprobar la participación de estas ROS en el incremento del ARNm de COX-2 inducido por Ang II, tratamos las células con el inhibidor de la subunidad catalítica NOX-1 de NADPH oxidasa ML171 (0,5  $\mu$ M) y con el barredor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalasa (1.000 U/ml); ambos fármacos redujeron los niveles de ARNm de COX-2 (Fig. 37).



**Fig. 37:** Efecto de ML171 (0,5  $\mu$ M, 1 h) y catalasa (Cat, 1.000 U/ml, 1 h) sobre los niveles de ARNm de COX-2 inducidos por Ang II (100 nM, 2 h) en CMLV de SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4-5$ .

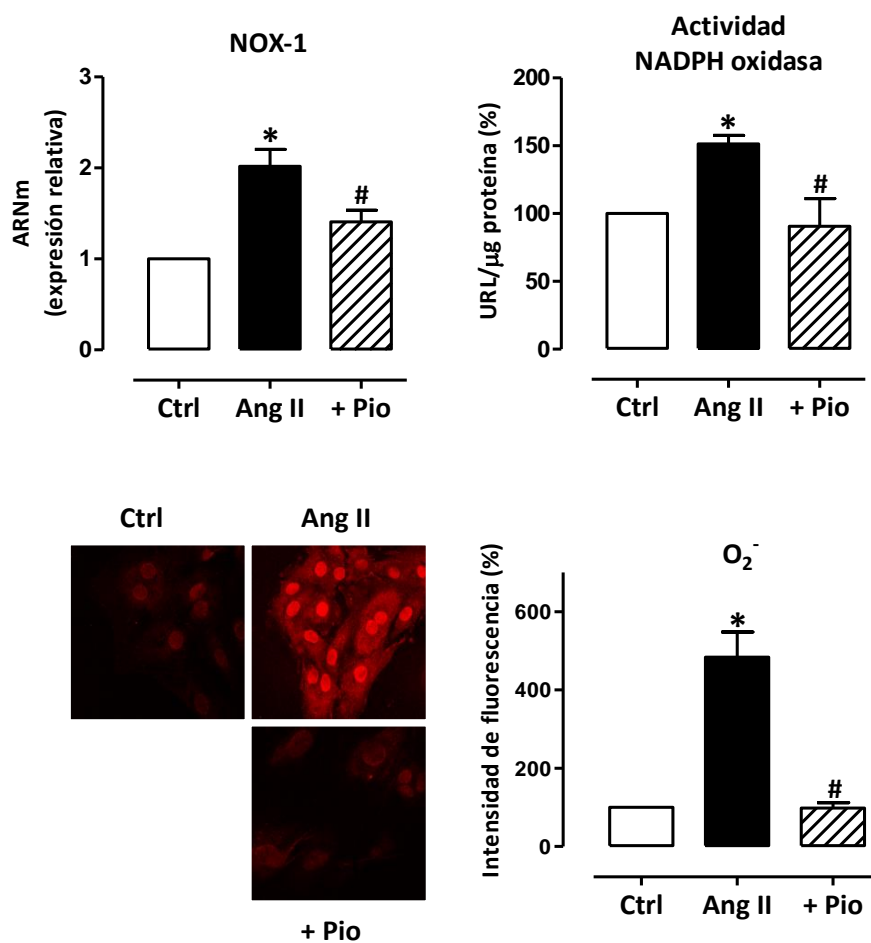
Puesto que, como hemos visto, ET-1 está implicada en la expresión de COX-2 inducida por Ang II, quisimos comprobar si las ROS también participan en la inducción de ET-1 producida por Ang II. Ambos fármacos, ML171 y catalasa, también redujeron el incremento en los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 inducidos por Ang II (Fig. 38).



**Fig. 38:** Efecto de ML171 (0,5  $\mu$ M, 1 h) y catalasa (Cat 1.000 U/ml, 1 h) sobre los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 inducidos por Ang II (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5$ .

*Pioglitazona reduce el estrés oxidativo inducido por Ang II en CMLV de SHR*

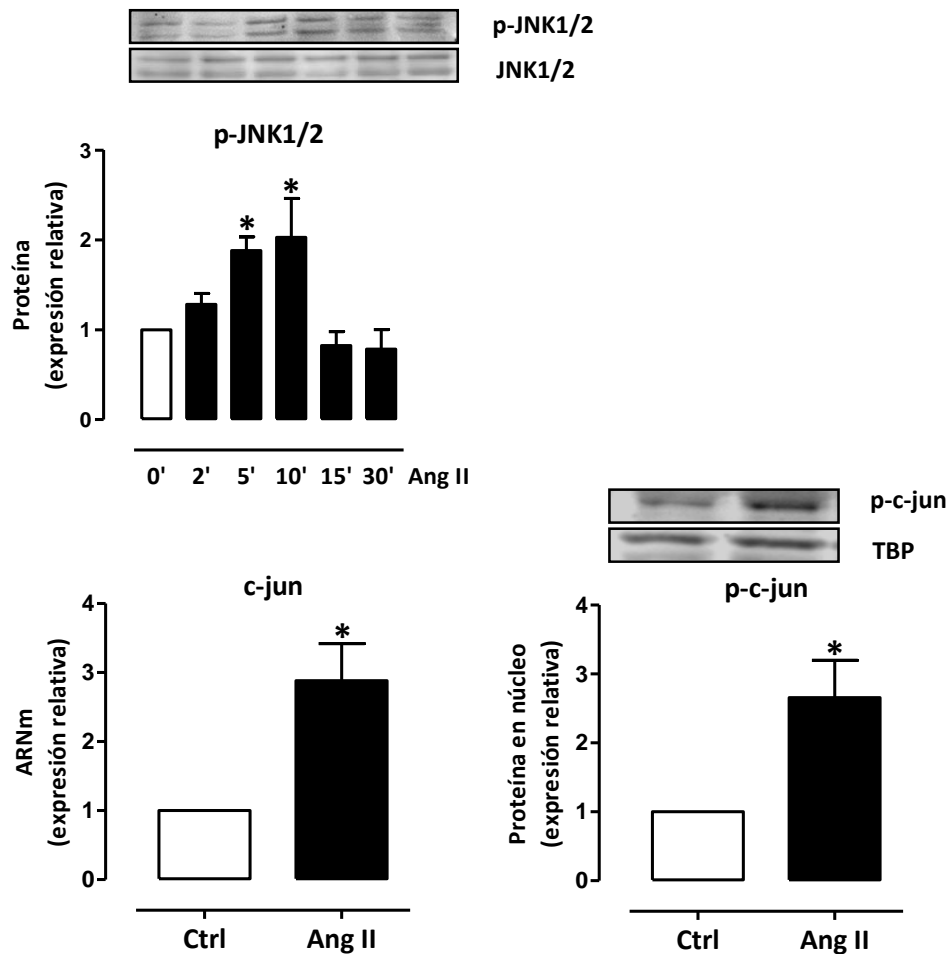
El tratamiento de los cultivos celulares con pioglitazona redujo tanto la expresión de NOX-1 como la actividad NADPH oxidasa y la producción de anión superóxido inducidos por Ang II (Fig. 39). Puesto que el estrés oxidativo participa en la inducción de ET-1 y COX-2 producida por Ang II, estos resultados sugieren que pioglitazona reduce la expresión tanto de ET-1 como de COX-2, al menos en parte, por mecanismos dependientes de la reducción de ROS.



**Fig. 39:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM, 18 h) sobre los niveles de ARNm de NOX-1, la actividad NADPH oxidasa y la producción de anión superóxido inducidos por Ang II (100 nM, 2 h) en CMLV de SHR. Las microfotografías muestran imágenes representativas de la producción de anión superóxido. Los resultados (media ± ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante *t* de Student pareada.  $n = 5-9$ .

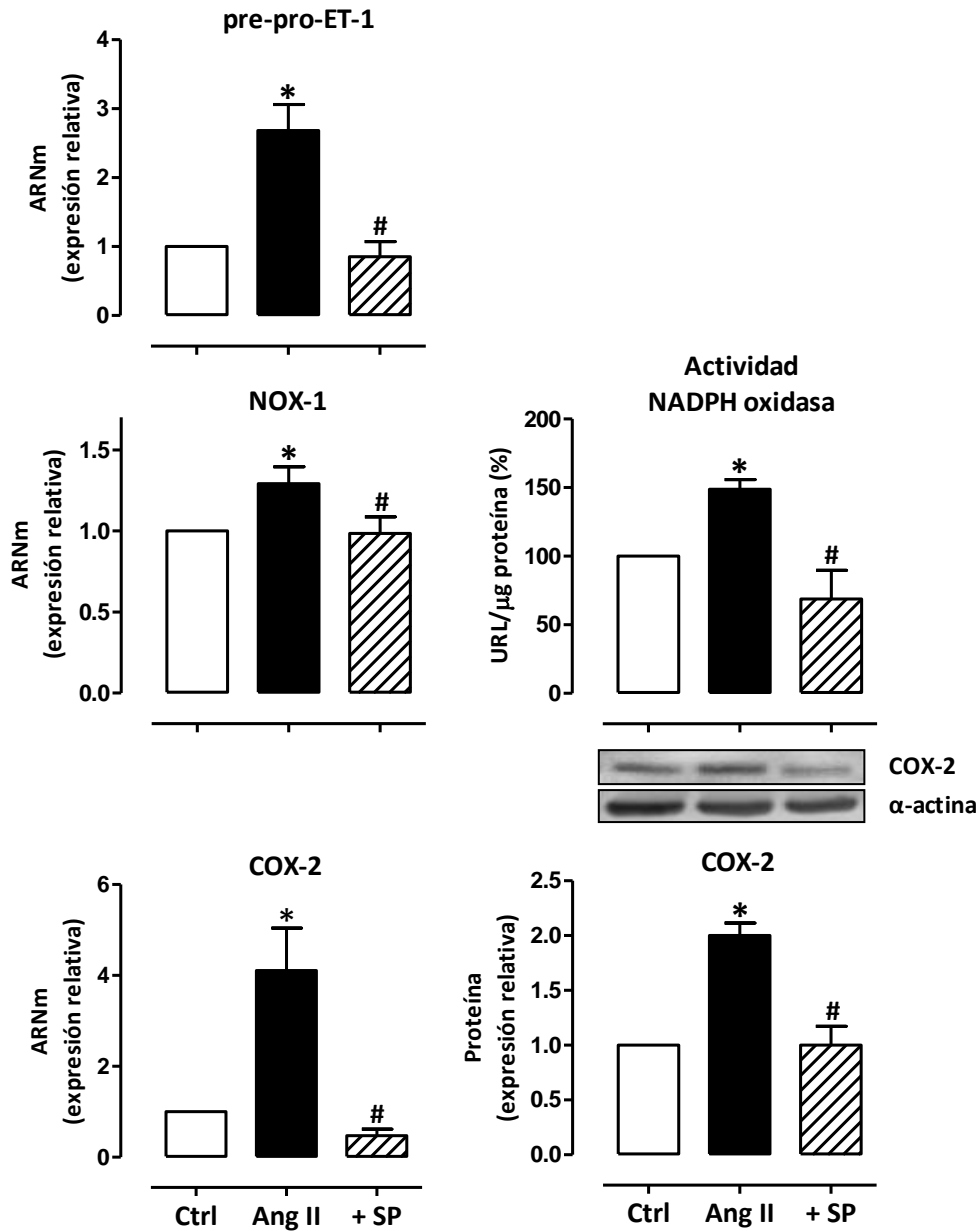
*AP-1 contribuye a la aumentada expresión de COX-2, ET-1 y el estrés oxidativo inducido por Ang II en CMLV de SHR*

Se ha descrito que los genes de ET-1, COX-2 y NOX-1 tienen sitios regulatorios en sus promotores donde se une el factor de transcripción proinflamatorio AP-1 (Tsatsanis *et al.*, 2006; Cevik *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010). Por esto, se analizó la participación de este factor de transcripción en la expresión de NOX-1 y ET-1, así como su contribución al aumento de la expresión de COX-2 inducido por Ang II. En primer lugar observamos que Ang II aumentó la fosforilación de JNK1/2 (MAPK que fosforila c-jun en su extremo N-terminal, promoviendo su homodimerización o su heterodimerización con c-fos, activando así AP-1). Asimismo, Ang II incrementó los niveles de c-jun y la expresión nuclear de p-c-jun (Fig. 40).



**Fig. 40:** Inducción dependiente del tiempo de la expresión de la forma fosforilada de JNK1/2 (p-JNK1/2) producida por Ang II (100 nM, 2-30') en CMLV de SHR. Efecto de Ang II (100 nM, 1 h) sobre los niveles de ARNm de c-jun y la expresión nuclear de la forma fosforilada de c-jun (p-c-jun). Sobre los histogramas de expresión proteica se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl o 0'). \*  $p < 0,05$  respecto al control, mediante ANOVA de medidas repetidas de una vía seguido de Bonferroni o *t* de Student pareada.  $n = 4-5$ .

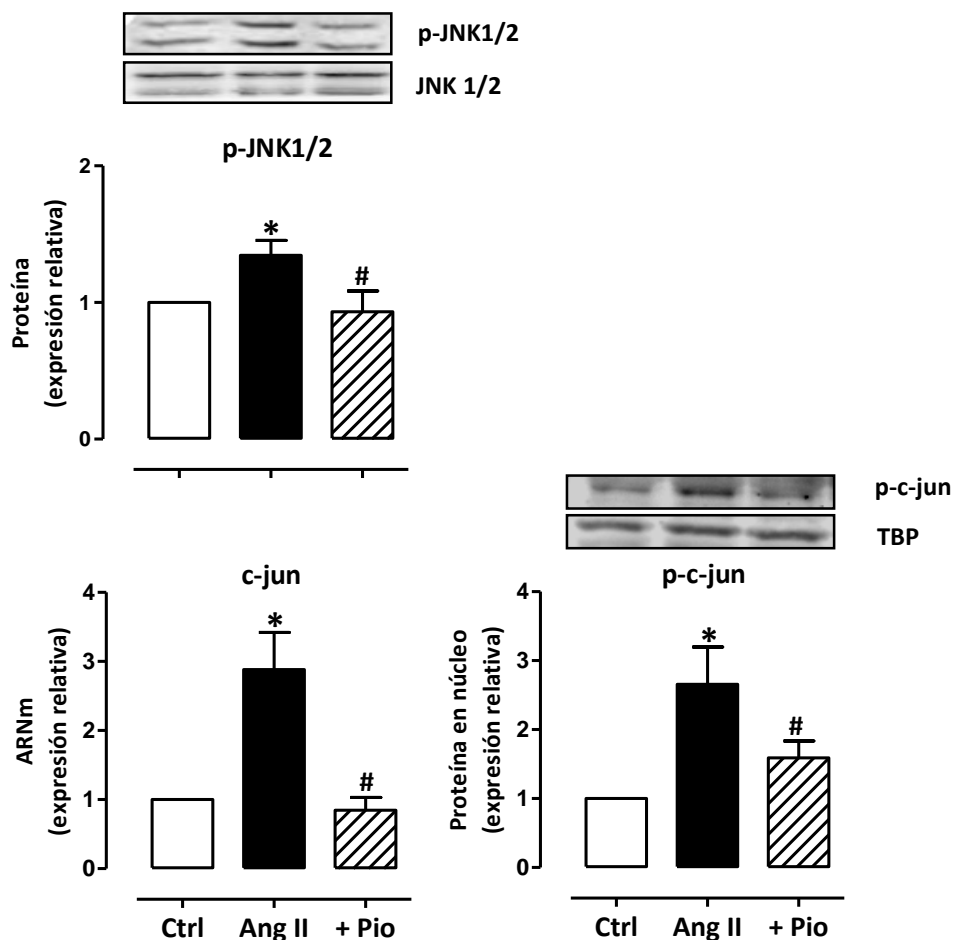
El tratamiento de CMLV de aorta de ratas SHR con el inhibidor de JNK SP600125 (20  $\mu$ M) redujo el incremento de los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 y de NOX-1, así como de la actividad NADPH oxidasa producidos por Ang II (Fig. 41). Además, y de acuerdo con los resultados anteriores que sugieren la participación de ROS y ET-1 en la expresión de COX-2 inducida por Ang II, se observó que esta expresión también fue reducida por el inhibidor de JNK (Fig. 41).



**Fig. 41:** Efecto de SP600125 (SP, 20  $\mu$ M, 30') sobre los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 y NOX-1, la actividad NADPH oxidasa, así como sobre los niveles de ARNm y la expresión proteica de COX-2 producidos por Ang II (100 nM, 2 h) en CMLV de SHR. Sobre el histograma de expresión proteica se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-9$ .

*Pioglitazona inhibe la activación de AP-1 inducida por Ang II en CMLV de SHR*

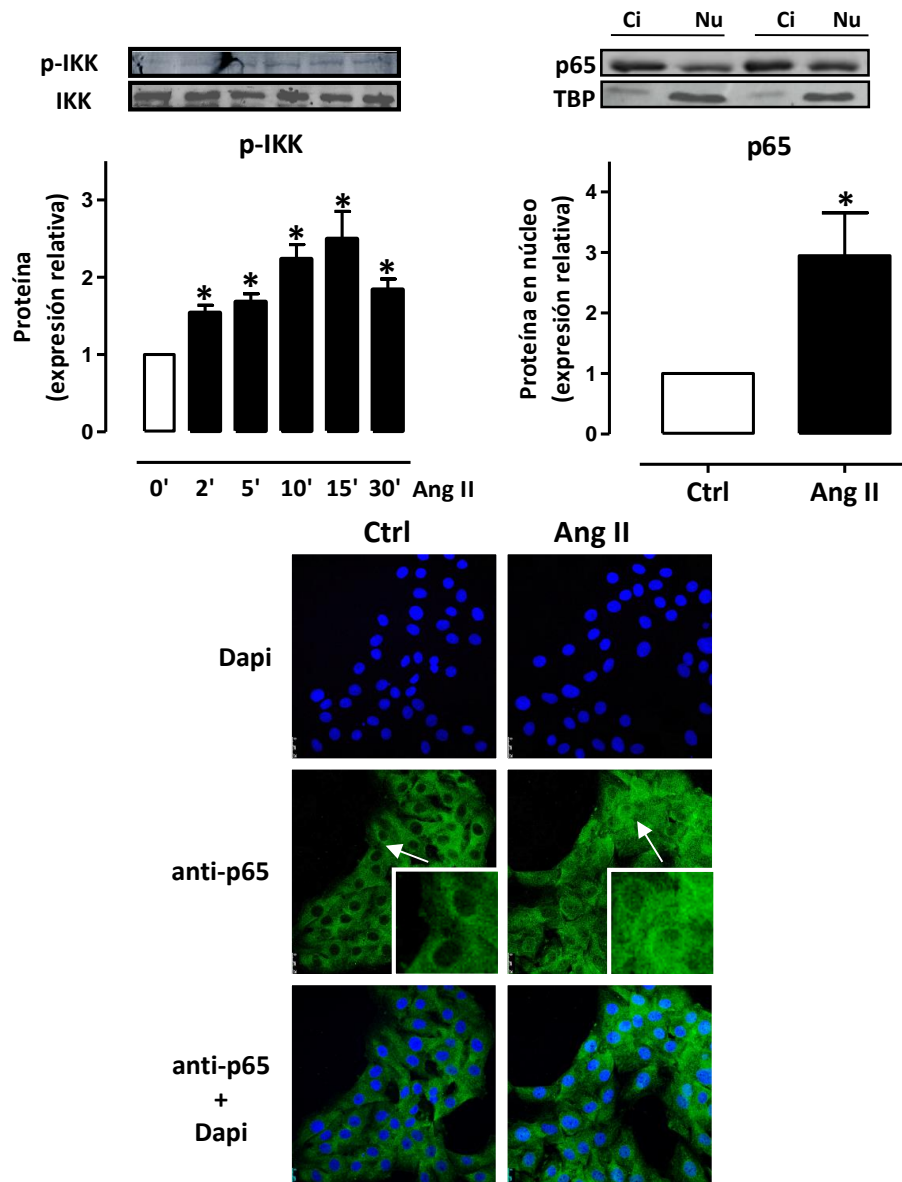
Es ampliamente conocido que PPAR $\gamma$  puede interferir con la actividad de varios factores de transcripción mediante mecanismos de transrepresión (Ricote y Glass, 2007), por lo que analizamos si éste es el mecanismo por el que pioglitazona regula la expresión de ET-1 y COX-2. Como puede observarse en la figura 42, pioglitazona redujo la fosforilación de JNK1/2, los niveles de ARNm de c-jun y, en consecuencia, la presencia de fosfo-c-jun en extractos nucleares de CMLV estimulados con Ang II.



**Fig. 42:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18 h) sobre la expresión de la forma fosforilada de JNK1/2 (p-JNK1/2) inducida por Ang II (100 nM, 15'), así como sobre los niveles de ARNm de c-jun y la expresión nuclear de la forma fosforilada de c-jun (p-c-jun) inducidos por Ang II (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. Sobre los histogramas de expresión proteica se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4-5$ .

*NFκB contribuye a la aumentada expresión de COX-2 y ET-1 y al estrés oxidativo inducidos por Ang II en CMLV de SHR*

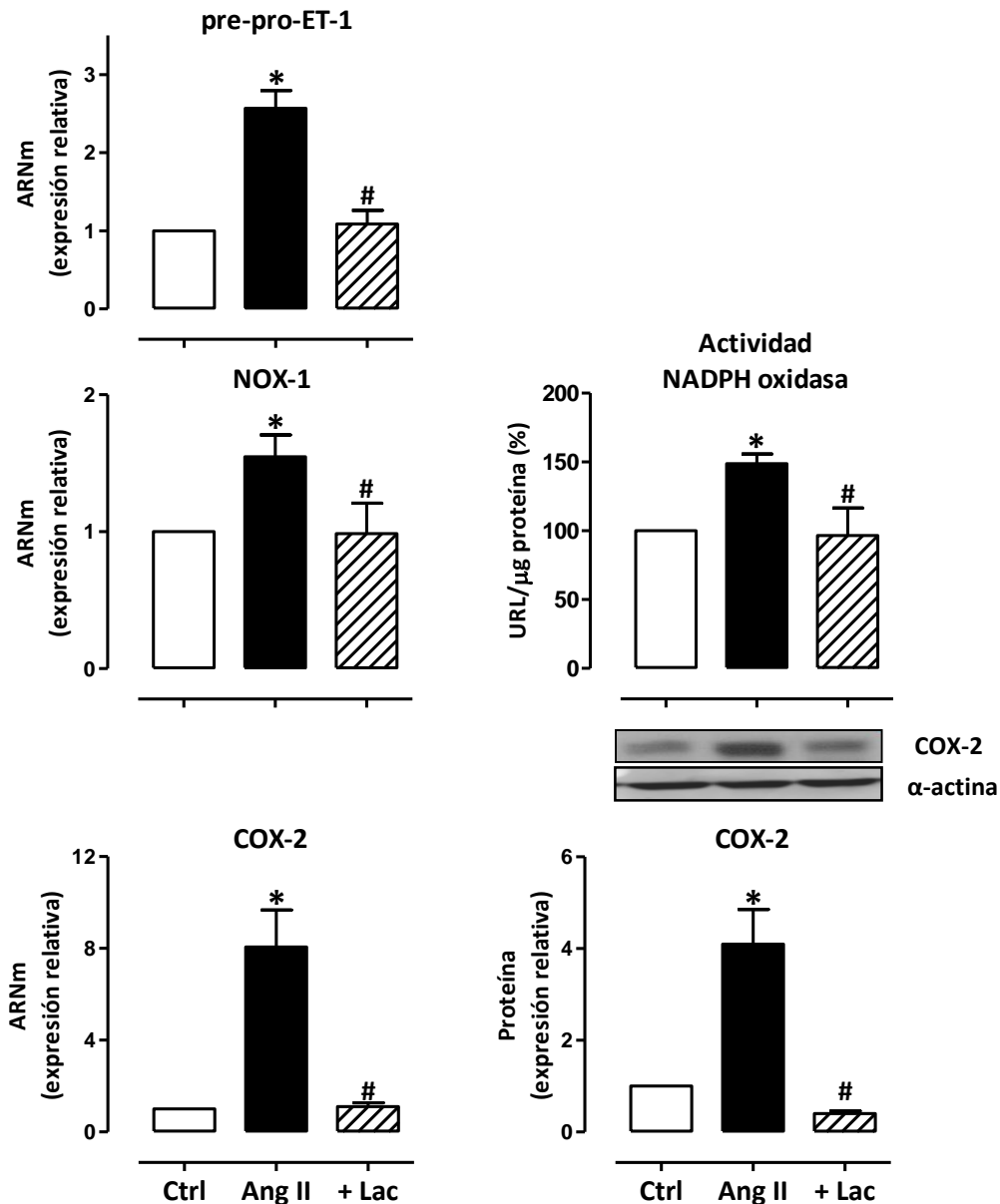
Otro factor de transcripción proinflamatorio para el cual se han encontrado sitios de regulación en el promotor de los genes de NOX-1, ET-1 y COX-2 es NFκB (Rodríguez-Pascual *et al.*, 2011; Stow *et al.*, 2011), por lo que analizamos su participación en la expresión de estos genes inducida por Ang II. Ang II aumentó la fosforilación de IKK, la quinasa del inhibidor de NFκB (IκB), que conduce a la disociación y degradación de IκB liberando NFκB, así como la expresión nuclear de la subunidad p65 del factor de transcripción. El incremento en la expresión nuclear de p65 se confirmó mediante experimentos de inmunofluorescencia (Fig. 43).



**Fig. 43:** Inducción dependiente del tiempo de la expresión de la forma fosforilada de IKK (p-IKK) producida por Ang II (100 nM, 2-30') en CMLV de SHR. Efecto de Ang II (100 nM, 45') sobre la expresión nuclear de p65; en la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en núcleo (Nu) y citosol (Ci). Abajo se muestra una imagen representativa de los experimentos de inmunofluorescencia de p65 (verde); en los cuadros se muestran imágenes magnificadas de las áreas marcadas por flechas. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl o 0'). \*  $p < 0,05$  respecto al control, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante ANOVA de medidas repetidas de una vía seguido de Bonferroni o  $t$  de Student pareada.  $n = 4-6$ .

Una vez comprobado que Ang II efectivamente activa NF $\kappa$ B, analizamos su implicación en los efectos de Ang II utilizando el inhibidor del proteasoma lactacistina. Este compuesto evita que I $\kappa$ B sea degradado en el proteasoma cuando es fosforilado por IKK, permitiendo

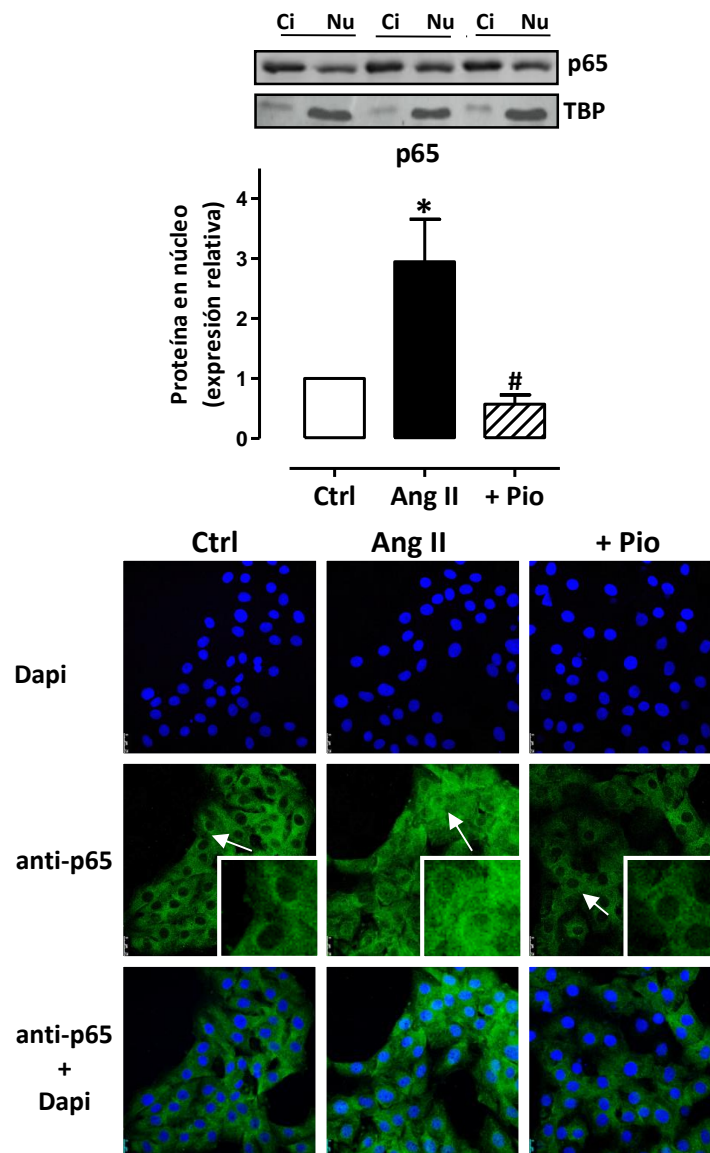
que se mantenga unido a p65 en el citosol y evitando, por lo tanto, que se trasloque al núcleo para realizar su función. Lactacistina (10  $\mu$ M) redujo el aumento en los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 y NOX-1, en la actividad NADPH oxidasa así como en los niveles de ARNm y expresión proteica de COX-2 producido por Ang II en CMLV de SHR (Fig. 44).



**Fig. 44:** Efecto de lactacistina (Lac, 10  $\mu$ M, 1 h) sobre los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 y NOX-1, la actividad NADPH oxidasa, así como los niveles de ARNm y la expresión proteica de COX-2 producidos por Ang II (100 nM, 2 h) en CMLV de SHR. Sobre el histograma de expresión proteica se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-9$ .

*Pioglitazona inhibe la activación de NFκB inducida por Ang II en CMLV de SHR*

Al igual que AP-1, NFκB también es susceptible de sufrir interferencia por PPARγ mediante transrepresión (Ricote y Glass, 2007). De acuerdo con esto, observamos que pioglitazona redujo el incremento en la expresión nuclear de p65 inducida por Ang II en CMLV de SHR, determinado tanto por western blot como por inmunofluorescencia (Fig. 45).



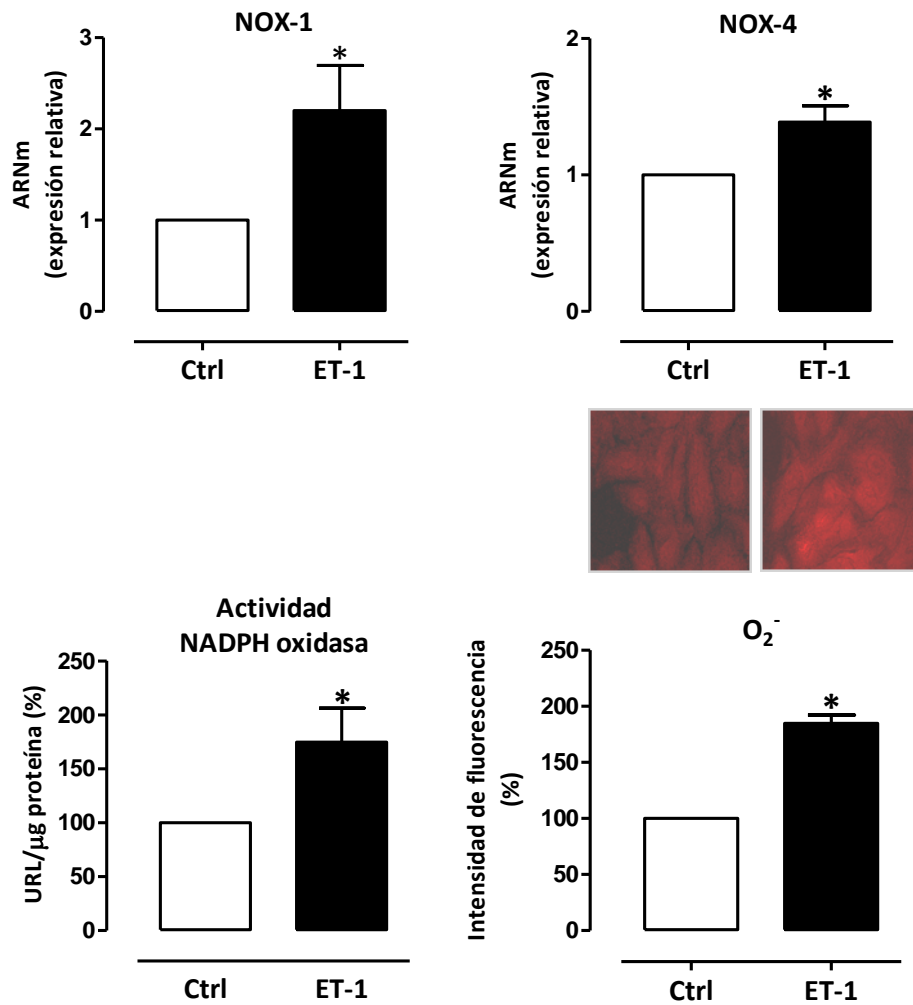
**Fig. 45:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18 h) sobre la expresión nuclear de p65 inducida por Ang II (100 nM, 45') en CMLV de SHR; en la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en núcleo (Nu) y citosol (Ci). Abajo se muestra una imagen representativa de los experimentos de inmunofluorescencia de p65 (verde); en los cuadrados se muestran imágenes magnificadas de las áreas marcadas por flechas. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a Ang II, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4-6$ .

**Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por ET-1 mediante la inhibición de la producción de ROS en CMLV de SHR.**

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que ET-1, a través de la activación de receptores ET<sub>A</sub>, está implicada en el aumento de expresión de COX-2 producido por Ang II y que pioglitazona reduce este aumento, en parte mediante la reducción de los niveles de ET-1. A continuación estudiamos los mecanismos implicados en la inducción de COX-2 por ET-1, y el efecto de pioglitazona sobre ellos en cultivos de CMLV de ratas hipertensas.

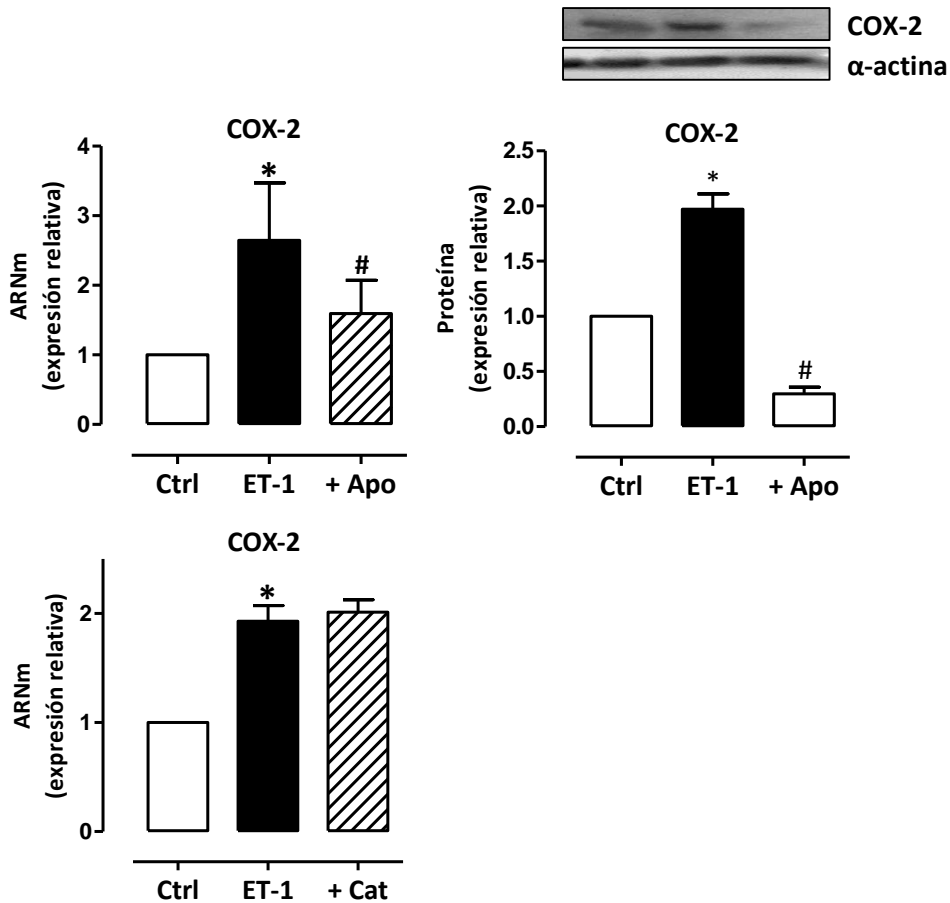
*El estrés oxidativo contribuye a la expresión de COX-2 inducida por ET-1 en CMLV de ratas SHR*

Como se ha mostrado anteriormente, la producción de ROS está implicada en el aumento de la expresión de ET-1 producido por Ang II. Además, es conocido que ET-1, a su vez, puede incrementar el estrés oxidativo (Banes-Berceli *et al.*, 2005; Callera *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2014b), por lo que quisimos comprobar esta posibilidad en nuestras condiciones experimentales. En CMLV de aorta de SHR, la incubación con ET-1 (100 nM, 1h) incrementó los niveles de ARNm de las subunidades catalíticas de la NADPH oxidasa NOX-1 y NOX-4. Este efecto fue acompañado de un aumento de la actividad del complejo enzimático y de la subsecuente producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Fig. 46).



**Fig. 46:** Efecto de ET-1 (100 nM, 1 h) sobre los niveles de ARNm de NOX-1 y NOX-4, la actividad NADPH oxidasa y la producción de anión  $O_2^-$  en CMLV de SHR. Las microfotografías muestran imágenes representativas de la producción de anión superóxido. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-7$ .

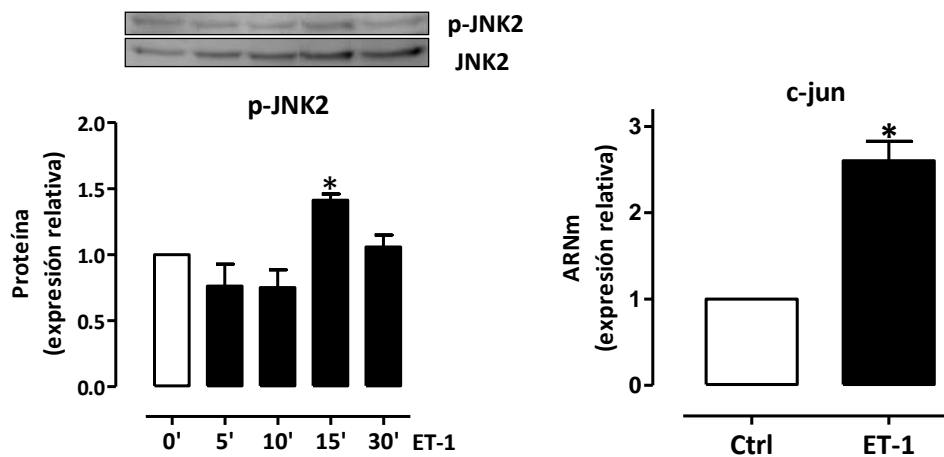
Para comprobar si el aumento en los niveles de ROS observado tras la incubación con ET-1 estaba implicado en la inducción de COX-2 producida por el péptido, utilizamos el inhibidor de NADPH oxidasa apocinina y el barredor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalasa. Apocinina (30  $\mu$ M) redujo la expresión de COX-2 inducida por ET-1; sin embargo, catalasa (1.000 U/ml) no tuvo efecto (Fig. 47). Estos resultados sugieren que ET-1 aumenta la producción de anión superóxido el cual, a su vez, participa en el incremento en la expresión de COX-2.



**Fig. 47:** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 1 h) y catalasa (Cat, 1.000 U/ml, 1 h) sobre los niveles de ARNm de COX-2 inducidos por ET-1 (100 nM, 1 h) y de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 1 h) sobre los niveles de proteína de COX-2 inducidos por ET-1 en CMLV de SHR. 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 (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a control, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4-7$ .

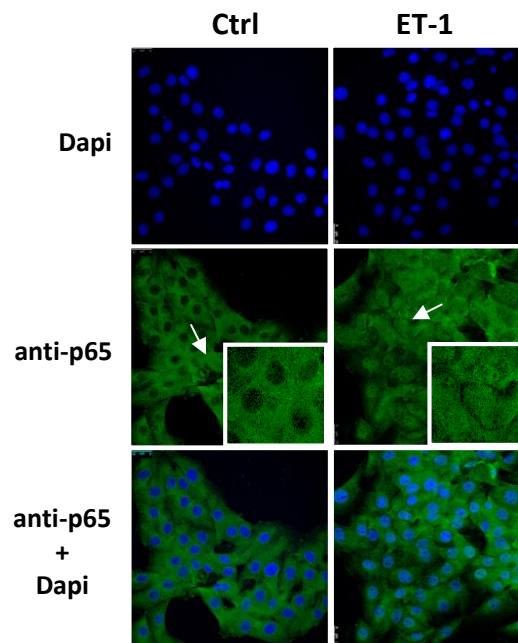
*ET-1 activa los factores de transcripción AP-1 y NFκB en CMLV de SHR*

En primer lugar estudiamos si ET-1 activa la vía de señalización de AP-1, por lo que analizamos su efecto sobre los niveles de ARNm de c-jun y la fosforilación de JNK1/2. ET-1 no incrementó la fosforilación de JNK1, aunque se observó una tendencia (resultados no mostrados); sin embargo, sí aumentó la fosforilación de JNK2, así como los niveles de ARNm de c-jun (Fig. 48).



**Fig. 48:** Inducción dependiente del tiempo de la expresión proteica de la forma fosforilada de JNK2 (p-JNK2) producida por ET-1 (100 nM, 5-30') en CMLV de SHR; en la parte superior se muestra un blot representativo. Efecto de ET-1 (100 nM, 1 h) sobre los niveles de ARNm de c-jun. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl o 0'). \*  $p < 0,05$  respecto a control, mediante ANOVA de medidas repetidas de una vía seguido de Bonferroni o  $t$  de Student pareada.  $n = 4$ .

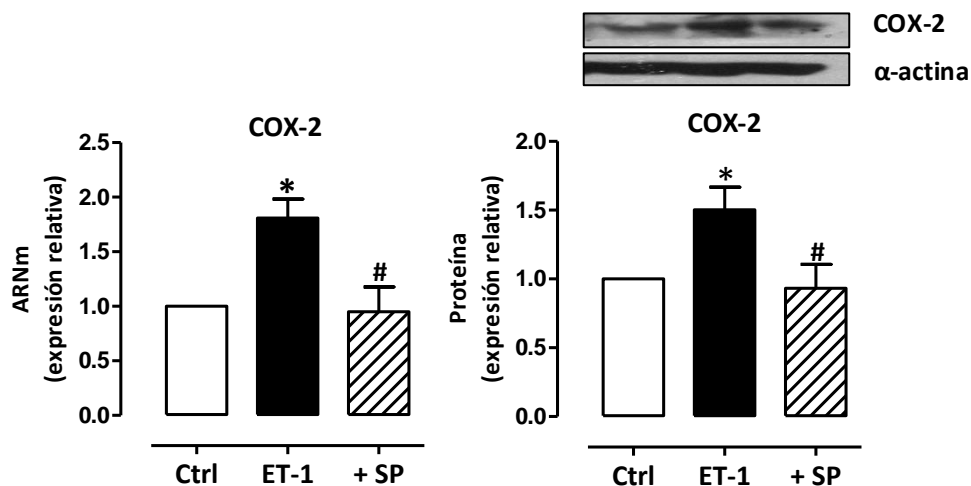
Además de AP-1, comprobamos si ET-1 activa el factor de transcripción NFκB en CMLV de aorta de SHR. Como puede observarse en la figura 49, ET-1 aumentó la localización de la subunidad p65 de NFκB en el núcleo de estas células.



**Fig. 49:** Imagen representativa del efecto de ET-1 (100 nM, 45') sobre la expresión de p65 (verde) en CMLV de SHR; en los cuadrados se muestran imágenes magnificadas de las áreas marcadas por flechas. n= 4.

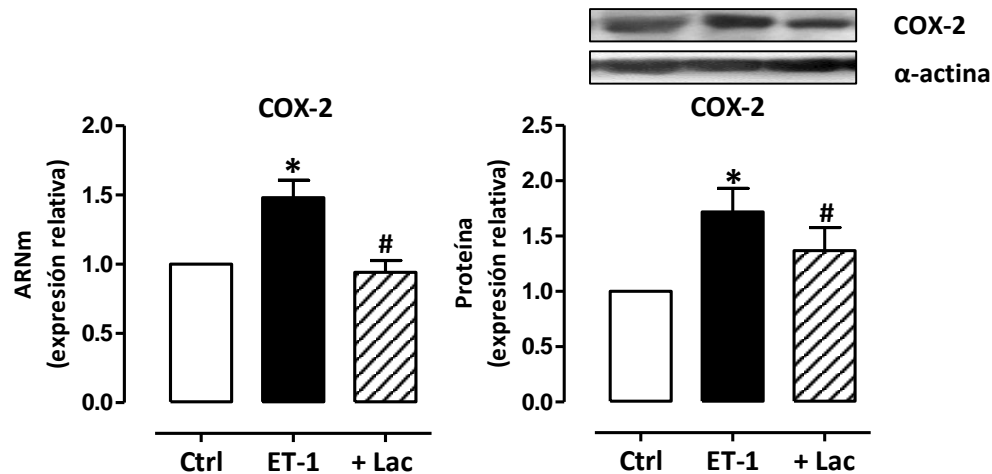
*AP-1 y NFκB contribuyen a la aumentada expresión de COX-2 producida por ET-1 en CMLV de SHR*

A continuación analizamos la participación de AP-1 en la expresión de COX-2 inducida por ET-1. Para ello usamos el inhibidor de JNK SP600125 (20 μM, 1 h) y observamos que dicho fármaco redujo el aumento en los niveles de COX-2 inducido por ET-1, tanto a nivel de mensajero como de proteína (Fig. 50).



**Fig. 50:** Efecto de SP600125 (SP, 20 μM, 1 h) sobre los niveles de ARNm y la expresión proteica de COX-2 inducidos por ET-1 (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. Sobre el histograma de expresión proteica se muestra un blot representativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5$ .

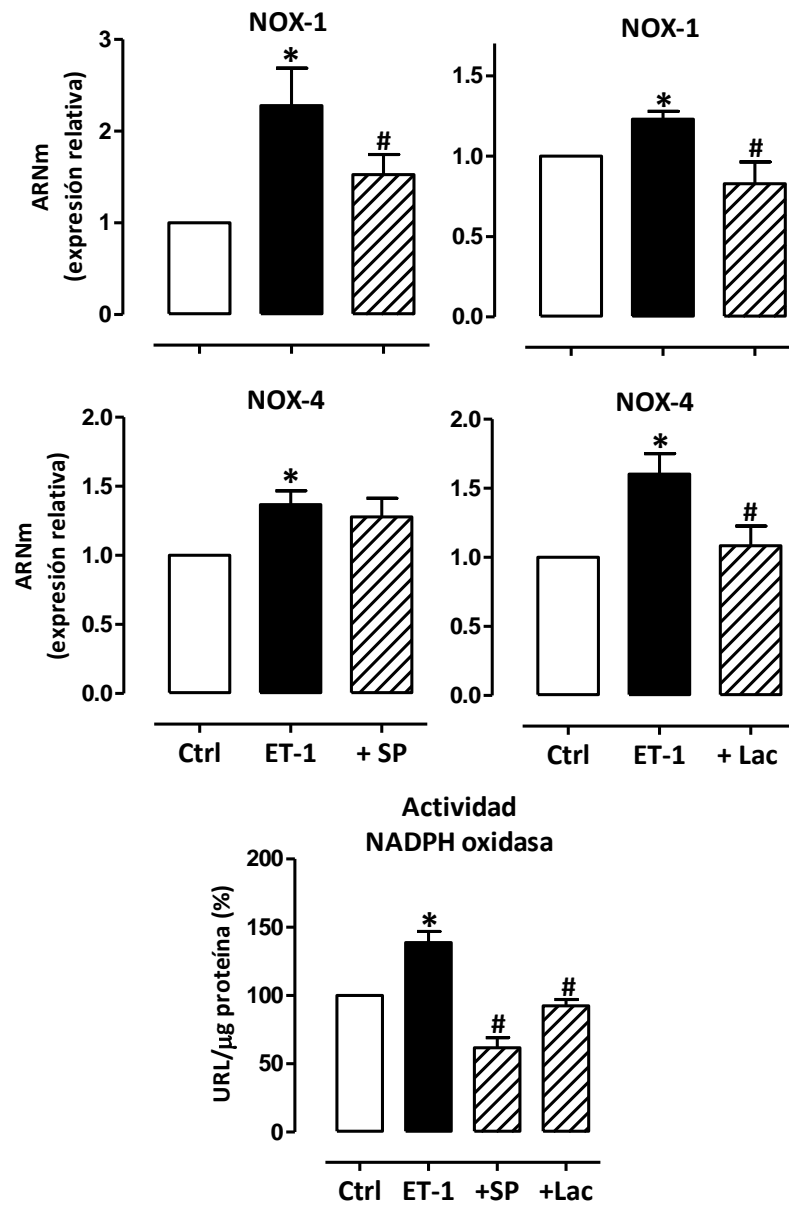
El siguiente paso fue comprobar si NFκB estaba implicado en la expresión de COX-2 inducida por ET-1; para ello se utilizó el inhibidor del proteasoma lactacistina (10 μM), el cual redujo los niveles de COX-2 inducidos por ET-1 en CMLV de SHR (Fig. 51).



**Fig. 51:** Efecto de lactacistina (Lac, 10 μM, 1 h) sobre los niveles de ARNm y la expresión proteica de COX-2 inducidos por ET-1 (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. Sobre el histograma de expresión proteica se muestra un blot representativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante *t* de Student pareada.  $n = 5$ .

#### *AP-1 y NFκB contribuyen al estrés oxidativo inducido por ET-1 en CMLV de SHR*

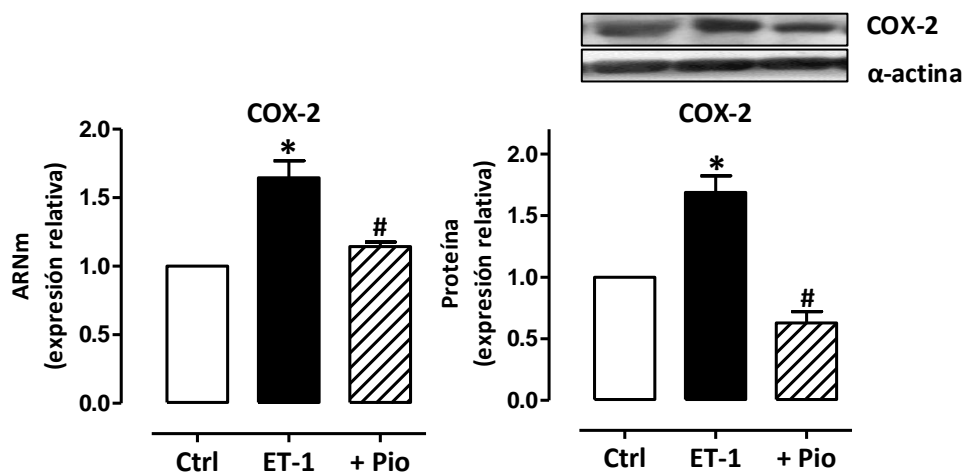
Hemos comprobado que la producción de ROS está implicada en el aumento de los niveles de COX-2 causado por ET-1, y que tanto AP-1 como NFκB participan también en este aumento. Por esta razón quisimos comprobar si ambos factores de transcripción estaban implicados en el aumento de ROS inducido por ET-1. Tanto el inhibidor de la ruta de AP-1 SP600125, como el de la ruta de NFκB lactacistina, redujeron los niveles de ARNm de la subunidad NOX-1 de la NADPH oxidasa; sin embargo, sólo lactacistina redujo los niveles de ARNm de NOX-4 (Fig. 52). Además, y de acuerdo con la reducción de los niveles de ARNm de las subunidades catalíticas del complejo enzimático, ambos inhibidores redujeron la actividad NADPH oxidasa (Fig. 52).



**Fig. 52:** Efecto de SP600125 (SP, 20  $\mu$ M, 1 h) y lactacistina (Lac, 10  $\mu$ M, 1 h) sobre los niveles de ARNm de NOX-1 y NOX-4 y la actividad NADPH oxidasa inducidos por ET-1 (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4-7$ .

*Pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por ET-1 en CMLV de SHR*

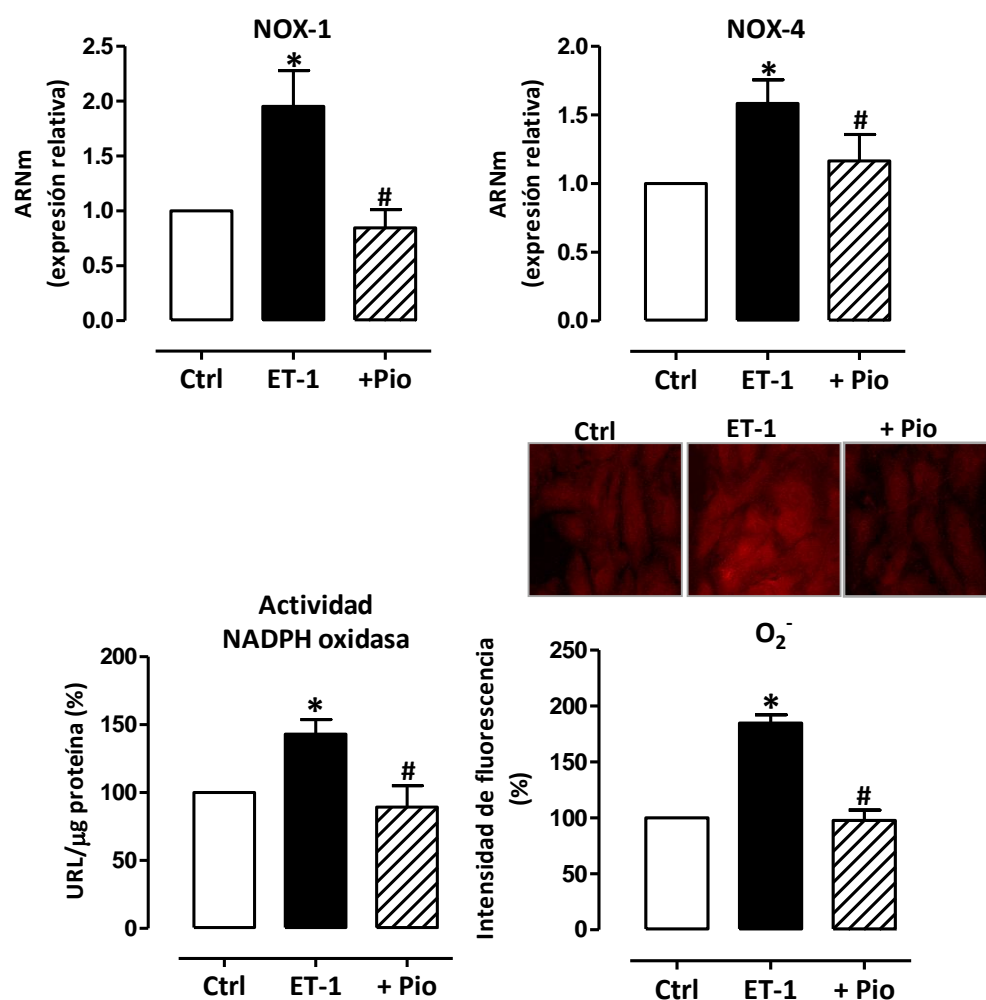
Resultados presentados en este trabajo han mostrado que pioglitazona reduce el incremento de la expresión de COX-2 inducido por Ang II en CMLV de aorta de SHR, así como la producción de ET-1, por interferir con la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB. A continuación, analizamos si pioglitazona reduce el aumento de expresión de COX-2 producido por ET-1 y los mecanismos implicados. La incubación de CMLV con el agonista de PPARγ pioglitazona previno el incremento de los niveles de ARNm y proteína de COX-2 inducido por ET-1 (Fig. 53).



**Fig. 53:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18 h) sobre los niveles de ARNm y proteína de COX-2 inducidos por ET-1 (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. 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 (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4-6$ .

*Pioglitazona reduce el estrés oxidativo inducido por ET-1 en CMLV de SHR*

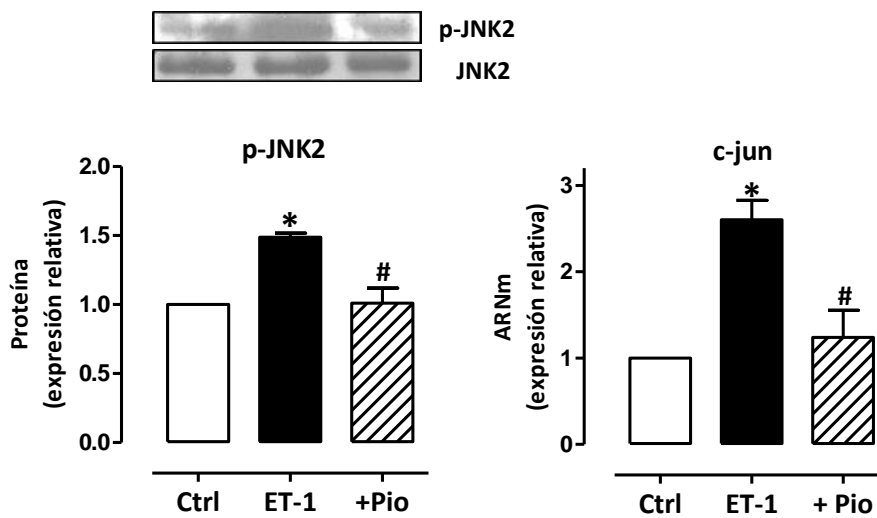
Hemos comprobado que las ROS están implicadas en el aumento de expresión de COX-2 producido por ET-1 en CMLV de SHR; por tanto, un posible mecanismo por el que pioglitazona reduce los niveles de COX-2 podría ser mediante la reducción del estrés oxidativo. Confirmando esta hipótesis, pioglitazona redujo los niveles de ARNm de NOX-1 y NOX-4, de acuerdo con esto, el agonista de PPAR $\gamma$  abolió el aumento de la actividad NADPH oxidasa y los niveles de anión superóxido inducidos por ET-1 (Fig. 54).



**Fig. 54:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18 h) sobre los niveles de ARNm de NOX-1 y NOX-4, la actividad NADPH oxidasa y la producción de anión superóxido inducidos por ET-1 (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. Las microfotografías muestran imágenes representativas de la producción de anión superóxido. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 5-8$ .

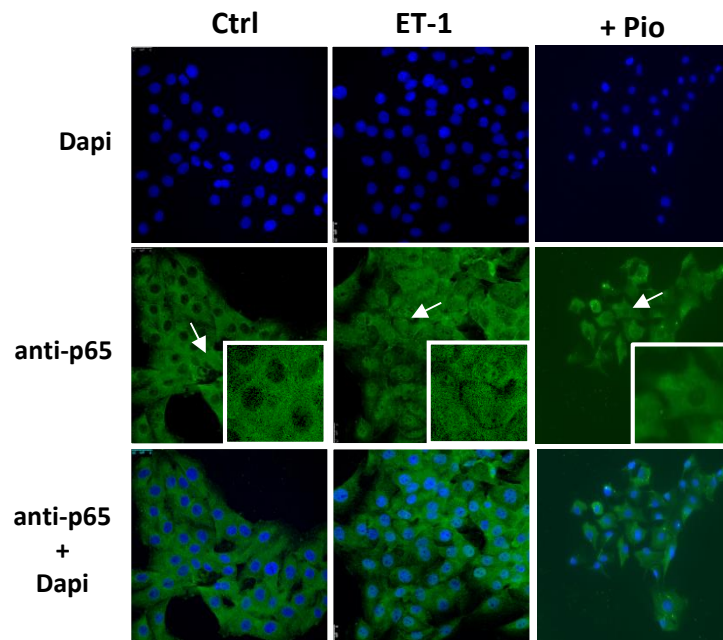
*Pioglitazona inhibe la activación de AP-1 y NFκB inducida por ET-1 en CMLV de SHR*

Como ya hemos mencionado, pioglitazona puede interferir con la activación de varios factores de transcripción proinflamatorios; por esta razón, quisimos analizar si el agonista de PPAR $\gamma$  reducía la activación de las rutas de AP-1 y NFκB por ET-1, las cuales, como habíamos comprobado, contribuyen a la expresión de COX-2 inducida por este péptido. Pioglitazona previno la activación de AP-1 producida por ET-1, como lo demuestra la reducción del incremento de la forma fosforilada de JNK2 y de los niveles de ARNm de c-jun (Fig. 55).



**Fig. 55:** Efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18 h) sobre la expresión de la forma fosforilada de JNK2 (p-JNK2) inducida por ET-1 (100 nM, 15') y sobre los niveles de ARNm de c-jun inducidos por ET-1 (100 nM, 1 h) en CMLV de SHR. 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 (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4$ .

Pioglitazona también previno la activación de NFκB ya que, como se observa en la figura 56, redujo el incremento en la expresión nuclear de p65 inducido por ET-1.



**Fig. 56:** Imagen representativa de los experimentos de inmunofluorescencia de p65 (verde) que muestran el efecto de pioglitazona (Pio, 10  $\mu$ M, 18 h) sobre la expresión nuclear de p65 inducida por ET-1 (100 nM, 45') en CMLV de SHR; en los cuadrados se muestran imágenes magnificadas de las áreas marcadas por flechas. n= 4

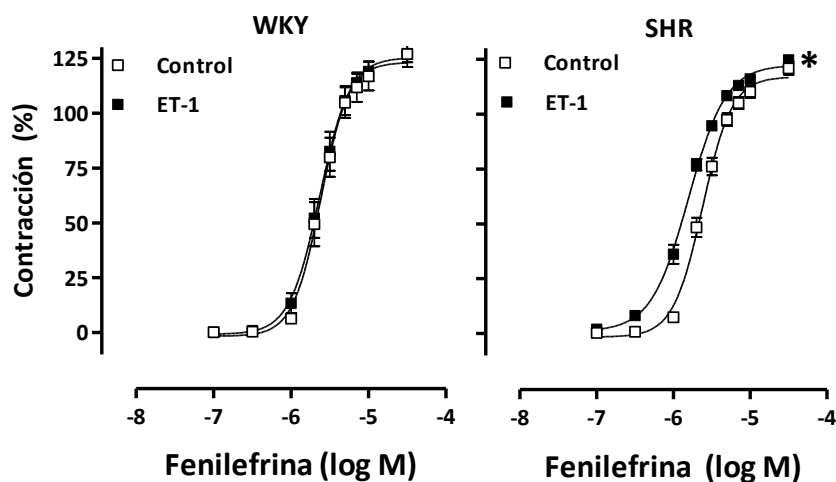
A la vista de estos resultados podemos concluir que pioglitazona regula la expresión de COX-2 inducida por ET-1 interfiriendo con la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB y causando así una reducción de la producción de ROS. Sin embargo, no se puede descartar que la interferencia con estos factores de transcripción produzca *per se* una reducción directa de la expresión de la enzima proinflamatoria.

**Pioglitazona modifica el efecto de ET-1 sobre la contracción a fenilefrina en arterias mesentéricas de resistencia de ratas hipertensas alterando la proporción de receptores  $ET_A/ET_B$**

Como ya hemos visto anteriormente, los niveles de ET-1 y de su receptor  $ET_A$  están aumentados tanto en aorta (Fig. 24) como en CMLV (Fig. 30) de ratas SHR cuando se compara con ratas WKY; además, el tratamiento de SHR con pioglitazona redujo estos niveles (Fig. 24). Por otra parte, aunque los niveles de  $ET_B$  eran similares en ratas SHR y WKY, el tratamiento de animales hipertensos con pioglitazona aumentó su expresión (Fig. 24). En el siguiente bloque de experimentos analizamos el efecto de ET-1, a una concentración que no modifica el tono vascular, sobre la contracción inducida por fenilefrina y si el tratamiento con pioglitazona lo altera. Para ello, se utilizaron AMR de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con pioglitazona (2,5 mg/Kg x día, 4 semanas) y se analizó la función vascular mediante miografía de alambres.

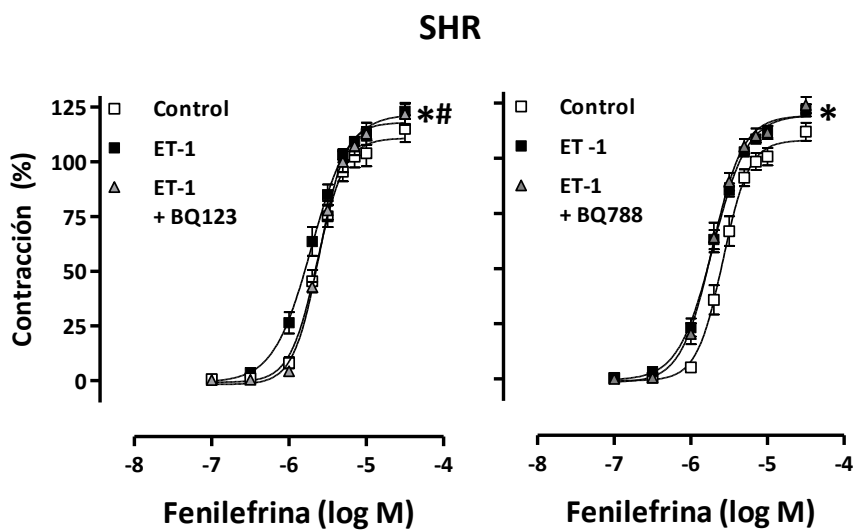
*ET-1 potencia la contracción a fenilefrina en arterias de ratas hipertensas a través de receptores  $ET_A$*

En un trabajo previo de nuestro grupo describimos que la contracción inducida por 120 mM  $K^+$ -KHS y por fenilefrina era similar en AMR de WKY y SHR; sin embargo, la relajación endotelio-dependiente inducida por acetilcolina estaba reducida en AMR de ratas hipertensas (Hernanz *et al.*, 2012). En el presente trabajo observamos que la incubación de AMR con ET-1 (1 nM) durante 1,5 h no modificó la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en arterias de ratas WKY; sin embargo, ET-1 incrementó dicha respuesta en AMR de SHR (Fig. 57).



**Fig. 57:** Efecto de ET-1 (1 nM, 1,5 h) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en AMR de ratas WKY y SHR. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a  $K^+$ -KHS. \*  $p < 0,05$  respecto a Control, mediante ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni.  $n = 9-27$ .

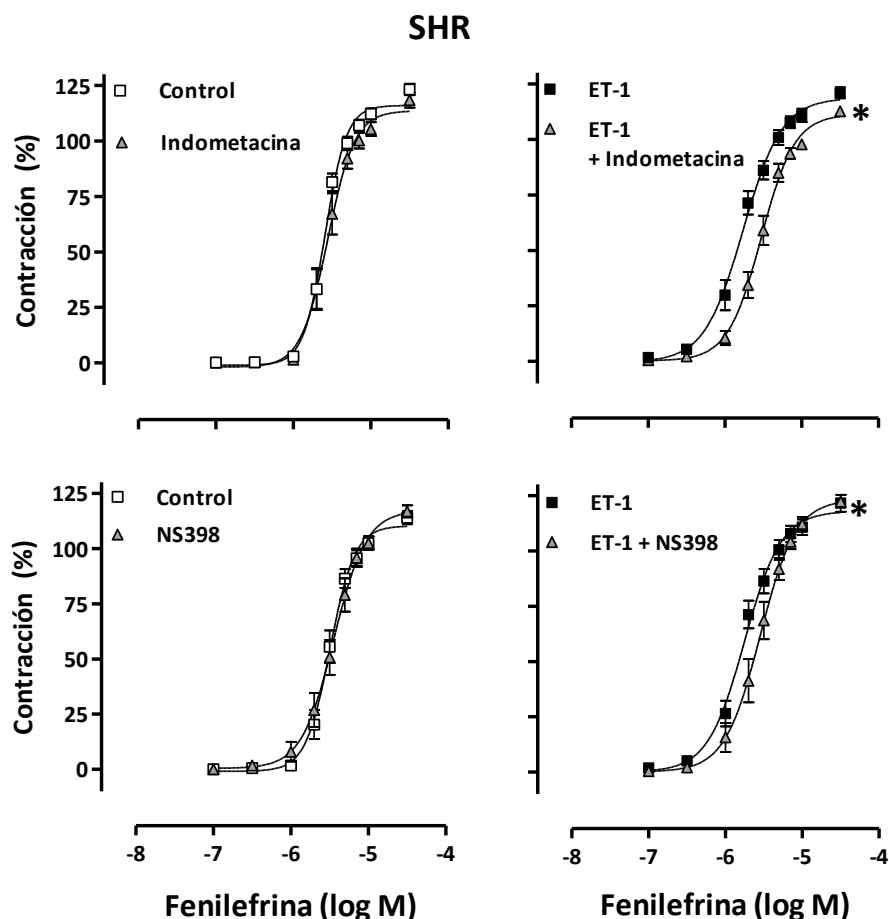
Puesto que ET-1 no modificó la contracción inducida por fenilefrina en AMR de ratas normotensas, continuamos analizando su efecto y los mecanismos implicados sólo en arterias de ratas hipertensas. En primer lugar, analizamos la participación de los receptores de ET-1 en el incremento de la contracción a fenilefrina inducido por este péptido. Como puede observarse en la figura 58, la incubación previa a la administración de ET-1 con el antagonista de receptores ET<sub>A</sub> BQ123 (1 µM), pero no el de ET<sub>B</sub> BQ788 (1 µM), previno la potenciación de la contracción a fenilefrina producida por el péptido, sugiriendo que dicho efecto se produce a través de receptores ET<sub>A</sub>.



**Fig. 58:** Efecto de ET-1 (1 nM, 1,5 h) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en AMR de ratas SHR, en ausencia y presencia del antagonista de receptores ET<sub>A</sub> de ET-1 BQ123 (1 µM, 30') o de receptores ET<sub>B</sub> BQ788 (1 µM, 30'). Los resultados (media ± ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K<sup>+</sup>-KHS. \* p < 0,05 respecto a Control; # p < 0,05 respecto a ET-1, mediante ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni. n= 5-12.

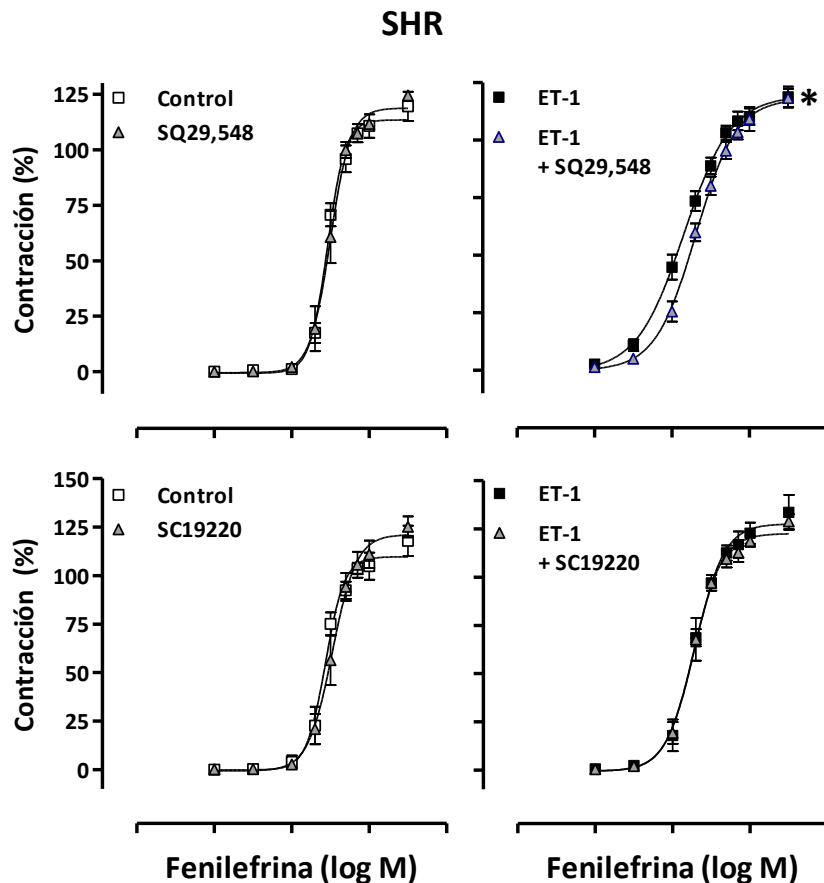
*Prostanoides contráctiles derivados de COX-2, actuando sobre receptores TP, participan en el aumento de contracción a fenilefrina inducido por ET-1 en SHR*

A continuación, analizamos si derivados de la ciclooxygenasa participan en el efecto de ET-1 sobre la contracción a fenilefrina en arterias de animales hipertensos. Para ello, se incubaron los segmentos arteriales con el inhibidor no selectivo de COX indometacina (10  $\mu$ M) y con el inhibidor selectivo de COX-2 NS 398 (1  $\mu$ M). Ambos fármacos, que no modificaron la respuesta a fenilefrina en situación control, redujeron el incremento de dicha respuesta inducido por ET-1 (Fig. 59). Estos resultados sugieren la participación de derivados contráctiles de COX-2 en el efecto de ET-1.



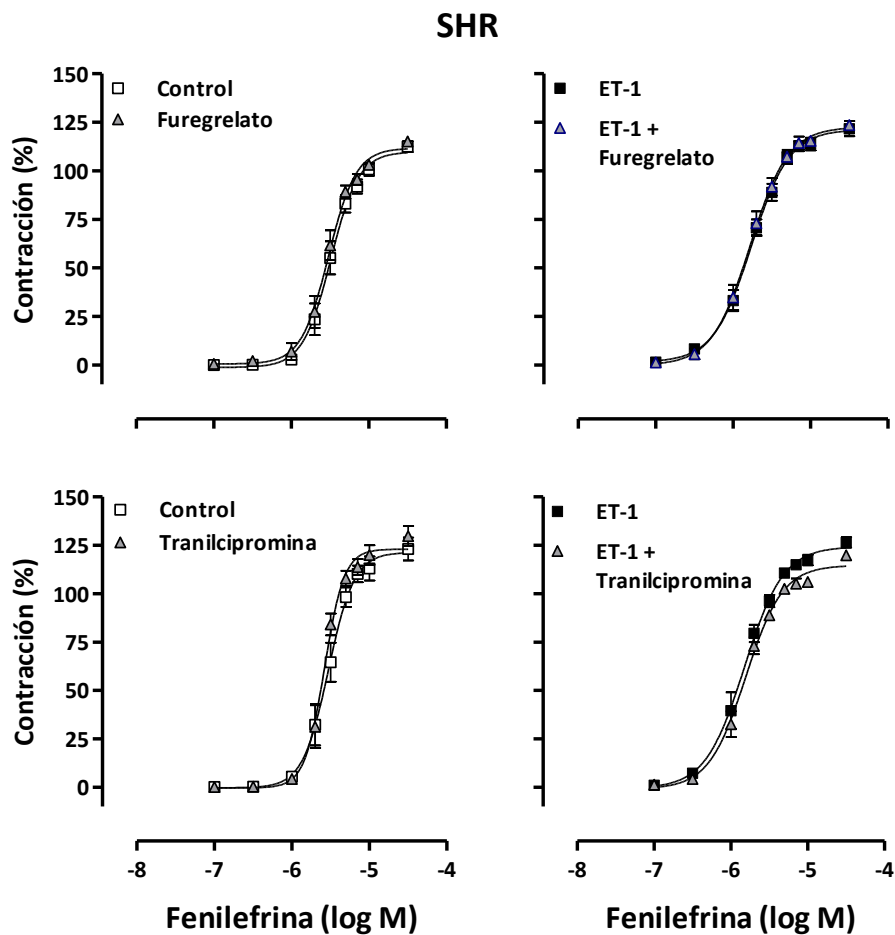
**Fig. 59:** Efecto de indometacina (10  $\mu$ M, 30') y NS398 (1  $\mu$ M, 30') sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de AMR de ratas SHR en situación control y tras la incubación con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a  $K^+$ -KHS. \*  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante ANOVA de dos vías seguido de análisis de Bonferroni.  $n = 6-8$ .

A continuación, tratamos de identificar la naturaleza del prostanoide contráctil implicado en la potenciación de la respuesta a fenilefrina producida por ET-1 en AMR de animales hipertensos. Para ello, utilizamos el antagonista del receptor TP de  $\text{TXA}_2$  SQ29,548, el antagonista de los receptores contráctiles  $\text{EP}_1/\text{EP}_3$  de la  $\text{PGE}_2$  SC19220, el inhibidor de la  $\text{TXA}_2$  sintasa furegreolato y, por último, el inhibidor de la  $\text{PGI}_2$  sintasa tranilcipromina; la prostaciclina, a pesar de ser considerada un importante prostanoide vasodilatador, puede producir vasoconstricción actuando sobre el receptor TP en arterias de animales hipertensos, como se ha descrito (Félétou *et al.*, 2009; Hernanz *et al.*, 2012). SQ29,548 (1  $\mu\text{M}$ ) redujo la potenciación de la contracción a fenilefrina causada por ET-1, mientras que SC19220 (10  $\mu\text{M}$ ) no tuvo efecto. Ninguno de los dos fármacos modificó la contracción en arterias en situación control (Fig. 60).



**Fig. 60:** Efecto de SQ29,548 (1  $\mu\text{M}$ , 30') y SC19220 (10  $\mu\text{M}$ , 30') sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de AMR de ratas SHR en situación control y tras la incubación con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por  $\text{K}^+$ -KHS. \*  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni.  $n = 4-12$ .

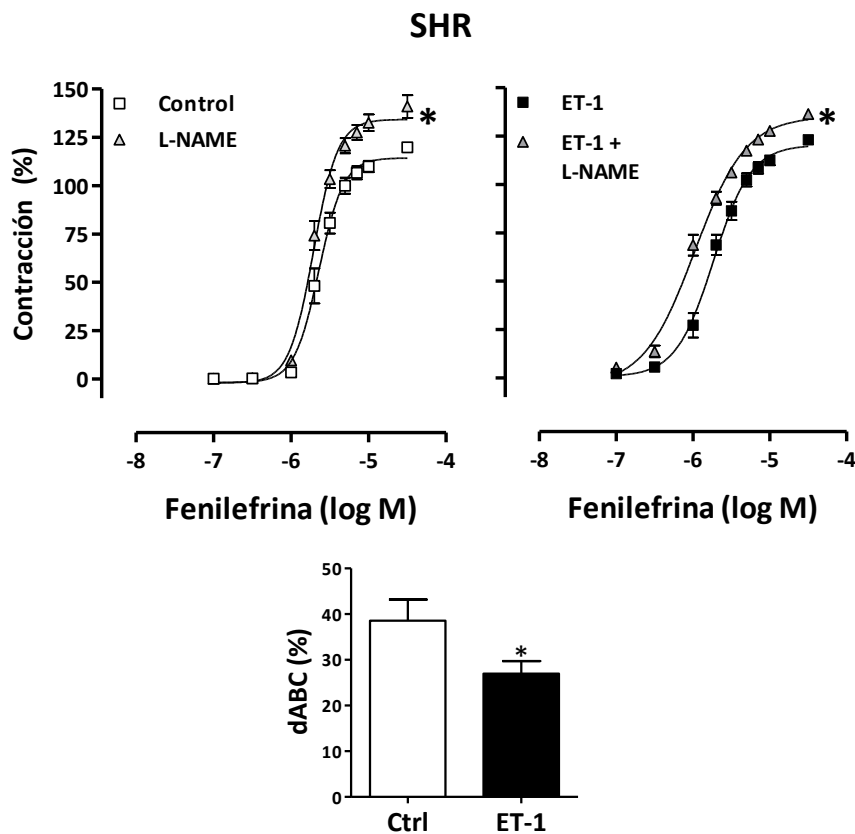
Furegrelato (1  $\mu\text{M}$ ) no modificó la contracción producida por fenilefrina ni en situación control ni tras la incubación con ET-1, descartando que sea  $\text{TXA}_2$  el mediador de los efectos de ET-1. Tranilcipromina (10  $\mu\text{M}$ ) tampoco modificó la respuesta a fenilefrina en ninguna de las dos situaciones experimentales (Fig. 61). Estos resultados sugieren que algún derivado de COX-2 distinto de  $\text{TXA}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGI}_2$ , actuando sobre receptores TP, participa en el incremento de la respuesta a fenilefrina inducido por ET-1.



**Fig. 61:** Efecto de furegrelato (1  $\mu\text{M}$ , 30') y tranilcipromina (10  $\mu\text{M}$ , 30') sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de AMR de ratas SHR en situación control y tras la incubación con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por  $\text{K}^+$ -KHS. n= 4-12.

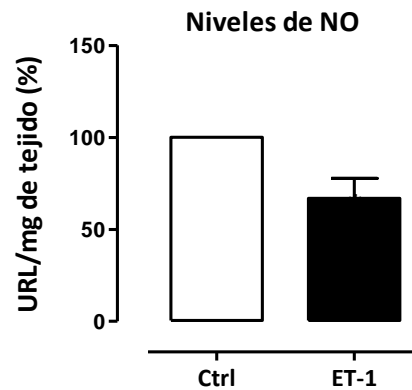
*La reducción en la biodisponibilidad de NO participa en el incremento de la contracción a fenilefrina inducido por ET-1 en SHR*

El NO es un importante modulador de las respuestas vasculares. Para analizar si el efecto inducido por ET-1 sobre la contracción a fenilefrina estaba mediado por cambios en la vía del NO, se incubaron los segmentos arteriales con el inhibidor no selectivo de la NOS, L-NAME; tanto en arterias en situación control como incubadas con ET-1, L-NAME (100  $\mu$ M) desplazó hacia la izquierda la curva concentración-respuesta a fenilefrina; sin embargo, dicho efecto fue menor tras la incubación con ET-1 que en segmentos control, como lo muestra el análisis de la diferencia del área bajo la curva concentración-respuesta (Fig. 62).



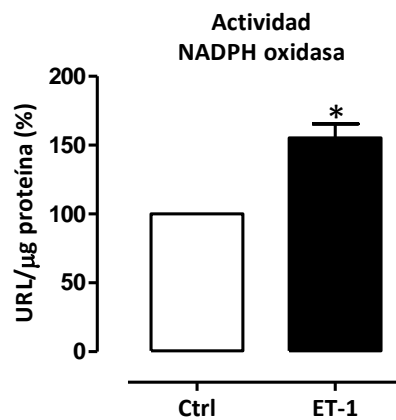
**Fig. 62:** Efecto de L-NAME (100  $\mu$ M, 30') sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de AMR de ratas SHR en situación control y tras la incubación con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por  $K^+$ -KHS. Los histogramas de la parte inferior muestran las diferencias de área bajo la curva a fenilefrina (dABC) en presencia y ausencia de L-NAME, en situación control y tras la incubación con ET-1. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como porcentaje del ABC en situación control. \*  $p < 0,05$  respecto a ET-1 o Ctrl, mediante ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni o  $t$  de Student no pareada.  $n = 5-14$ .

A continuación analizamos el efecto de ET-1 sobre la liberación de NO. Para ello, incubamos segmentos vasculares *ex vivo* con el péptido y tras dicha incubación observamos una reducción en la liberación basal de NO (Fig. 63). Estos datos sugieren que una reducción en la biodisponibilidad de NO contribuye a la potenciación de la contracción a fenilefrina producida por ET-1.



**Fig. 63:** Cuantificación de la producción de óxido nítrico (NO) en segmentos aórticos en situación control (Ctrl) o tras la incubación *ex vivo* con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, mediante *t* de Student pareada.  $n = 5-8$ .

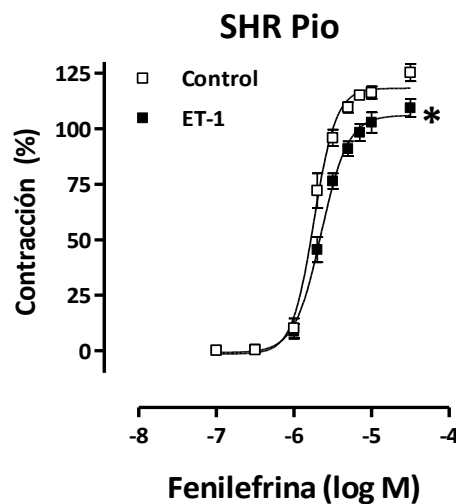
En hipertensión se ha descrito ampliamente que la incrementada producción de  $O_2^-$  reduce la biodisponibilidad de NO (Lyle y Griendling, 2006; Paravicini y Touyz, 2008; Hernanz *et al.*, 2012) como consecuencia de la reacción del  $O_2^-$  con el NO para producir  $ONOO^-$ . Para estudiar el efecto de ET-1 sobre la producción de ROS incubamos segmentos vasculares *ex vivo* con ET-1 (1 nM, 1,5 h) y medimos la actividad NADPH oxidasa. En estas condiciones se observó una mayor producción de ROS derivada de NADPH oxidasa que en los segmentos control (Fig. 64), de manera que esta mayor producción de ROS puede contribuir a la reducción en la biodisponibilidad de NO que se observa tras la incubación con ET-1.



**Fig. 64:** Efecto de la incubación *ex vivo* de segmentos aórticos de SHR con ET-1 (1 nM, 1,5 h) sobre la actividad NADPH oxidasa. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, mediante *t* de Student pareada.  $n = 4$ .

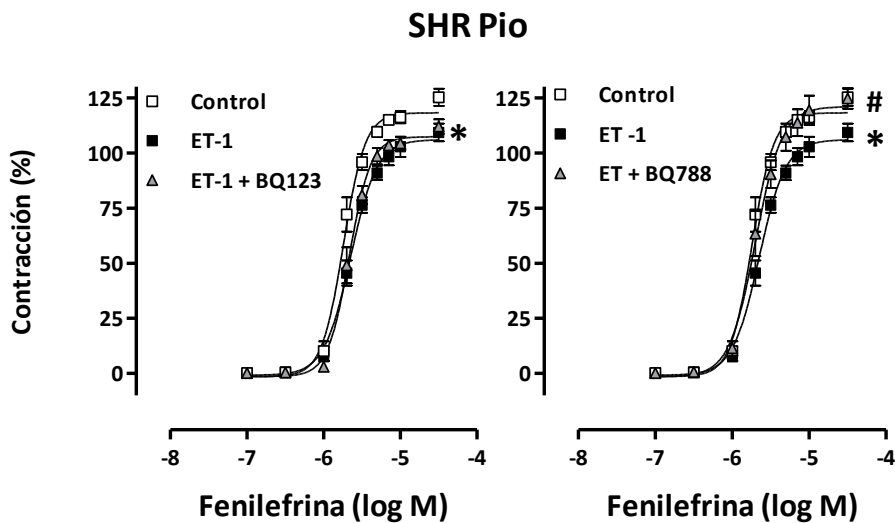
*Tras el tratamiento de ratas hipertensas con pioglitazona, ET-1, a través de receptores  $ET_B$ , aumenta la biodisponibilidad de NO reduciendo la contracción a fenilefrina*

En un trabajo previo, habíamos demostrado que el tratamiento de ratas SHR con pioglitazona no modificaba ni la contracción inducida por 120 mM  $K^+$ -KHS ni la inducida por fenilefrina; sin embargo, pioglitazona mejoraba la deteriorada relajación inducida por acetilcolina (Hernanz *et al.*, 2012). En este trabajo observamos en AMR de ratas SHR tratadas con pioglitazona que la incubación con ET-1 redujo la contracción a fenilefrina (Fig. 65), a diferencia del aumento que hemos comentado anteriormente se observaba en arterias de ratas SHR sin tratar (ver Fig. 57).



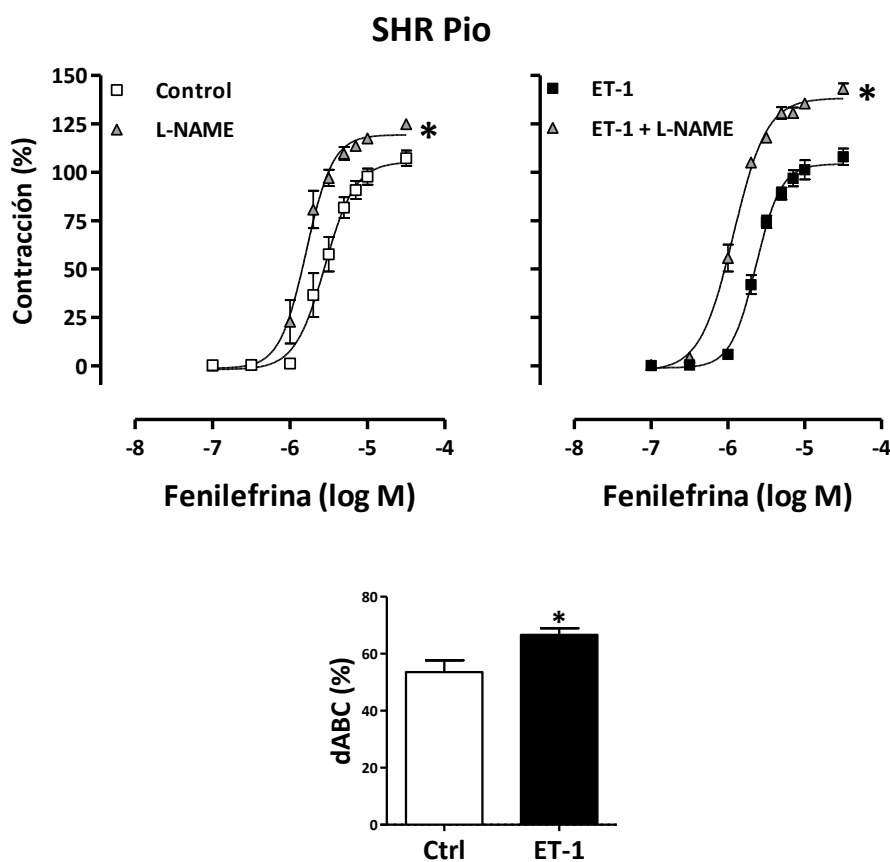
**Fig. 65:** Efecto de ET-1 (1 nM, 1,5 h) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en AMR de ratas SHR tratadas con pioglitazona (2,5 mg/Kg x día, 4 semanas). Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a  $K^+$ -KHS. \*  $p < 0,05$  respecto a Control, mediante ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni.  $n = 6-9$ .

En primer lugar estudiamos los receptores de ET-1 a través de los cuales este péptido reducía la respuesta a fenilefrina en SHR tratadas con pioglitazona. Como puede observarse en la figura. 66, el antagonista de receptores ET<sub>B</sub> BQ788 revirtió la reducción de la contracción a fenilefrina producida por ET-1 en estos animales; sin embargo, el antagonista de receptores ET<sub>A</sub> BQ123 no tuvo ningún efecto sobre dicha contracción. Estos resultados sugieren que en AMR de SHR tratadas con pioglitazona, ET-1 reduce la contracción a fenilefrina mediante unión a receptores ET<sub>B</sub>.



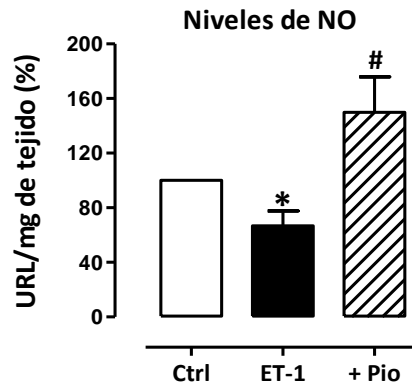
**Fig. 66:** Efecto de ET-1 (1 nM, 1,5 h) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en AMR de ratas SHR tratadas con pioglitazona (2,5 mg/Kg x día, 4 semanas), en ausencia y presencia del antagonista de receptores ET<sub>A</sub> de ET-1 BQ123 (1 μM, 30') o de receptores ET<sub>B</sub> BQ788 (1 μM, 30'). Los resultados (media ± ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K<sup>+</sup>-KHS. \* p < 0,05 respecto a Control, # p < 0,05 respecto a ET-1, mediante ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni. n= 6-9.

Se ha descrito ampliamente que la activación de receptores  $ET_B$  endoteliales por ET-1 conduce a un aumento de la producción de NO. Para comprobar la participación de NO en el efecto de ET-1 en ratas tratadas con pioglitazona, utilizamos el inhibidor de la NOS L-NAME. Este fármaco potenció la contracción a fenilefrina, tanto en arterias controles como en las incubadas con ET-1, aunque el efecto fue mayor en estas últimas, como se deduce de la mayor dABC observada (Fig. 67). Estos resultados sugieren que en ratas tratadas con pioglitazona, ET-1, a través de receptores  $ET_B$ , reduce la contracción a fenilefrina por aumentar la modulación endotelial negativa inducida por NO.



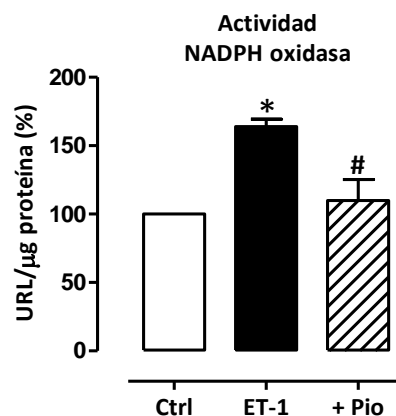
**Fig. 67:** Efecto de L-NAME (100  $\mu$ M, 30') sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de AMR de ratas SHR tratadas con pioglitazona (2,5 mg/Kg x día, 4 semanas) en situación control y tras la incubación con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por  $K^+$ -KHS. Los histogramas de la parte inferior muestran las diferencias de área bajo la curva a fenilefrina (dABC) en presencia y ausencia de L-NAME, en situación control y tras la incubación con ET-1. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como porcentaje del ABC en situación control. \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl o ET-1, mediante ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni o  $t$  de Student no pareada.  $n = 5$ .

Además, observamos que el tratamiento con pioglitazona (10  $\mu$ M, 18 h) aumentó la liberación basal de NO producida por la incubación *ex vivo* con ET-1 (1 nM, 1,5 h) (Fig. 68).



**Fig. 68:** Efecto de pioglitazona (Pio 10  $\mu$ M, 18 h) sobre la producción basal de óxido nítrico (NO) en segmentos aórticos de SHR incubados con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante *t* de Student pareada.  $n = 4$

Como hemos comentado, un mecanismo por el que ET-1 reduce la biodisponibilidad de NO es mediante el incremento en la producción de ROS. Para comprobar el efecto de pioglitazona sobre la producción de ROS inducida por ET-1, estimulamos segmentos aórticos de SHR con ET-1 (1 nM, 1,5 h) en presencia o ausencia de pioglitazona (10  $\mu$ M, 18 h). Como puede observarse en la figura 69, pioglitazona previno el incremento de actividad NADPH oxidasa producido por ET-1. Estos resultados sugieren que la reducción en la producción de ROS puede contribuir al aumento de la biodisponibilidad de NO inducido por pioglitazona.



**Fig. 69:** Efecto de pioglitazona (Pio 10  $\mu$ M, 18 h) sobre la actividad NADPH oxidasa en segmentos aórticos de SHR estimulados con ET-1 (1 nM, 1,5 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como valores relativos respecto a la situación control (Ctrl). \*  $p < 0,05$  respecto a Ctrl, #  $p < 0,05$  respecto a ET-1, mediante  $t$  de Student pareada.  $n = 4$

Con estos resultados deducimos que en AMR de ratas SHR ET-1, activando receptores  $ET_A$ , incrementa la contracción a fenilefrina a través de varios mecanismos como la producción de derivados contráctiles de COX-2 y la reducción de la biodisponibilidad de NO, probablemente como consecuencia del incremento del estrés oxidativo. Pioglitazona revierte este efecto mediante el incremento de la expresión de receptores  $ET_B$ , que produce un aumento de la producción de NO y una reducción del estrés oxidativo.



## **DISCUSIÓN**



La hipertensión es un importante factor de riesgo cardiovascular, cuyo origen, en la mayoría de los casos, es aún desconocido. Esta patología se caracteriza por un incremento de la resistencia vascular periférica que puede ser consecuencia de alteraciones funcionales, estructurales y mecánicas en la pared vascular. Entre las alteraciones funcionales destacan el incremento de la contractilidad y, fundamentalmente, la disfunción endotelial. Distintos mecanismos inflamatorios juegan un importante papel en la fisiopatología de la hipertensión. Así, en esta patología se ha descrito un incremento en la expresión de enzimas inflamatorias como la iNOS (Agarwal *et al.*, 2009; Oliveira-Paula *et al.*, 2014) o la COX-2 (Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005), así como en la producción de ROS (Redón *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2009). La ET-1 y el SRA, a través de su péptido efector Ang II, también pueden favorecer este estado inflamatorio por su capacidad para estimular la producción de ROS y activar factores de transcripción que conducen a la generación de mediadores inflamatorios y daño tisular (Rajagopalan *et al.*, 1996; Touyz y Schiffrin, 2000; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005; Sugimoto *et al.*, 2007; Lorenz *et al.*, 2009; Rodríguez-Pascual *et al.*, 2011; Stow *et al.*, 2011). Por otra parte, la reducción en los niveles de PPAR $\gamma$ , receptores nucleares con propiedades antiinflamatorias, que se ha descrito en vasos de animales hipertensos (Pérez-Girón, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Hernanz *et al.*, 2012; Akyürek *et al.*, 2014) puede contribuir al incremento en la proliferación, migración, inflamación y fibrosis características de la hipertensión (Xiong *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Además de su efecto inflamatorio, ET-1 puede regular el tono vascular, tanto produciendo vasoconstricción como modulando la respuesta de otros agentes vasoactivos (Yang *et al.*, 1990; Nakayama *et al.*, 1991; Henrion y Laher, 1993; Edwards *et al.*, 1995; Gondre y Christ, 1998; Matsumura *et al.*, 2001; Wingard *et al.*, 2003; García-Villalón *et al.*, 2008). El hecho de que PPAR $\gamma$  interfiera con el sistema endotelina (Tian *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Campia *et al.*, 2014), sugiere que el tratamiento con sus agonistas puede modular los efectos de este péptido.

### **Efecto del tratamiento *in vivo* de SHR con pioglitazona sobre los incrementados niveles vasculares de COX-2, ET-1 y ROS asociados al SRA**

La COX es la enzima responsable de la síntesis de prostanoïdes, los cuales, entre otras funciones, desempeñan un papel clave en la regulación del tono vascular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Wright *et al.*, 2001). De las distintas isoformas, la COX-2 se induce en la mayoría de los tejidos en respuesta a estímulos inflamatorios (Tsasanis *et al.*, 2006), aunque también se ha descrito que se encuentra presente de forma constitutiva en determinados tipos celulares (Acarin *et al.*, 2002; Hernanz *et al.*, 2003; Briones *et al.*, 2005; Bagi *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2007; Addabbo *et al.*, 2011; Alique *et al.*, 2011). Como se ha mencionado anteriormente, en hipertensión existe un aumento en la expresión de COX-2. Así, en pacientes con hipertensión esencial (Taddei *et al.*, 1997; Viridis *et al.*, 2013) y en distintos modelos animales como ratas SHR (García-Cohen *et al.*, 2000; Briones *et al.*, 2002; Blanco-Rivero *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2005; 2007; Hernanz *et al.*, 2012), DOCA-Salt (Adeagbo *et al.*, 2005), Dahl "SALT sensitive" (Jaimes *et al.*, 2008) o en ratones Cx40 (Krattinger *et al.*, 2009), se ha descrito un incremento tanto en la expresión de COX-2 como en la producción de prostanoïdes contráctiles. Estos prostanoïdes están implicados en la disfunción endotelial y en el incremento de las respuestas vasoconstrictoras que se observan en diferentes modelos (Blanco-Rivero *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2005; Abdelrahman *et al.*, 2008; Martínez-Revelles *et al.*, 2013), y podrían, por tanto, desempeñar un papel en el desarrollo de hipertensión; de hecho, el tratamiento con inhibidores de COX-2 reduce la presión arterial en algunos modelos de hipertensión (Adeagbo *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2012; Martínez-Revelles *et al.*, 2013), aunque en otros no se han observado efectos (Welch *et al.*, 2007; Viridis *et al.*, 2012). De acuerdo con la mayor expresión proteica de COX-2 en hipertensión, en este trabajo encontramos un incremento en los niveles de ARNm de COX-2, tanto en aorta como en CMLV de SHR.

Otra de las características de la patología hipertensiva es el aumento del estrés oxidativo. Se han descrito elevados niveles plasmáticos y vasculares de ROS en diferentes modelos (Redón *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2009; Hernanz *et al.*, 2012; Martínez-Revelles *et al.*, 2013), así como en pacientes hipertensos (Redón *et al.*, 2003;

Minuz *et al.*, 2004; Carrizzo *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2013; Kurlak *et al.*, 2014; Higashi *et al.*, 2014), donde además se ha observado que existe una reducción de la capacidad antioxidante (Minuz *et al.*, 2004; Higashi *et al.*, 2014). En este trabajo encontramos en aorta de ratas SHR niveles aumentados de las subunidades de la NADPH oxidasa NOX-1, NOX-4, p47phox y, en consecuencia, de la actividad del complejo enzimático. En condiciones fisiológicas, las ROS constituyen un grupo de segundos mensajeros celulares muy eficaces que contribuyen al mantenimiento del tono vascular, el crecimiento y la diferenciación celular o la apoptosis (Cai, 2005; Brown y Griendling, 2009; Pendyala y Natarajan, 2010); sin embargo, cuando ocurre un desbalance entre su producción y su eliminación, las ROS se acumulan produciendo un efecto tóxico que puede contribuir al desarrollo de diferentes patologías, entre las que se encuentra la hipertensión (Zalba *et al.*, 2001a; Landmesser y Harrison, 2001). El aumento de ROS puede mediar procesos de señalización celular que contribuyen a la inflamación (Yasunari *et al.*, 2002) y al remodelado vasculares (Touyz *et al.*, 2003; Martínez-Revelles *et al.*, 2013), así como a la alteración de las respuestas vasodilatadoras y vasoconstrictoras que se observan en hipertensión (Zimmerman *et al.*, 2004; Widlansky y Gutterman, 2011; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque se han encontrado efectos beneficiosos de algunos compuestos como la vitamina C a nivel vascular y de reducción de la presión sanguínea, los resultados con el uso de antioxidantes son inconsistentes, siendo necesarios más estudios para establecer su eficacia, por lo que los antioxidantes no son usados como antihipertensivos (González *et al.*, 2014).

ET-1, péptido vasoconstrictor, es el miembro más importante de la familia de las endotelinas y, aunque inicialmente se aisló del sobrenadante del cultivo de células endoteliales (Yanagisawa *et al.*, 1988), se sabe que es producida por todos los tipos celulares de la pared vascular (Hahn *et al.*, 1990; Hong *et al.*, 2004; Wort *et al.*, 2009). La ET-1 de origen endotelial puede modular de forma paracrina las CMLV adyacentes afectando a la reactividad vascular y a la mitogénesis, y desempeñando un importante papel en el mantenimiento del tono vascular (Haynes y Webb, 1994; Barton y Yanagisawa, 2008; Rodríguez-Pascual *et al.*, 2011). Además, la ET-1 tiene también un papel autocrino en la regulación vascular, al ser liberada por las propias CMLV en respuesta a factores de crecimiento y/o sustancias vasoactivas (Hahn *et al.*, 1990; Hong *et al.*, 2004; Laplante *et al.*,

2005). El sistema de endotelina puede jugar un papel importante en diversas patologías cardiovasculares como insuficiencia cardíaca, diabetes o aterosclerosis (Khimji y Rockey, 2010). En el presente estudio observamos una mayor expresión del precursor de ET-1 pre-pro-ET-1 tanto en CMLV como en aorta de animales hipertensos, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por otros investigadores en algunos modelos de hipertensión (Schiffrin, 2001). También en pacientes con formas severas y aceleradas de hipertensión esencial y en pacientes con deterioro en el aclaramiento renal, se han observado incrementados niveles plasmáticos de ET-1 (Touyz y Schiffrin, 2003; Shreenivas y Oparil, 2007). Varios autores han sugerido la participación de ET-1 en el desarrollo de hipertensión y en algunas de las alteraciones vasculares asociadas (Li *et al.*, 1994; Schiffrin *et al.*, 1995a; Rajagopalan *et al.*, 1997; Pollock, 2000; Schiffrin, 2001; Touyz y Schiffrin, 2003; Shreenivas y Oparil, 2007). Así, la vasoconstricción inducida por administración exógena de ET-1 es mayor en pacientes hipertensos que en normotensos y se correlaciona positivamente con la presión arterial media en individuos hipertensos (Haynes *et al.*, 1994). En ratas SHR, si bien la endotelina no parece jugar un papel importante en el desarrollo de la hipertensión, la respuesta vasoconstrictora a este péptido está incrementada (Schiffrin, 2001). En este sentido, y como se discutirá más adelante, nosotros observamos que ET-1 produce un aumento de la contracción inducida por fenilefrina únicamente en arterias de animales hipertensos.

Entre los mecanismos que explican el papel de la ET-1 en hipertensión se ha propuesto la existencia de diferencias en la distribución de sus receptores. En el presente estudio encontramos un aumento en la expresión de receptores ET<sub>A</sub> en aorta de animales hipertensos, sin cambios en los niveles de ET<sub>B</sub>. Otros trabajos también muestran incrementos en la expresión de ET<sub>A</sub> a nivel renal y cerebral o en su afinidad en arterias coronarias de ratas SHR (Hoche *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 2013). Los receptores ET<sub>A</sub> median los efectos contráctiles, proliferativos y proinflamatorios inducidos por ET-1 (Münter y Kirchengast, 2001), mientras que los receptores ET<sub>B</sub> tienen un papel controvertido, ya que pueden mediar efectos opuestos según el tipo celular o el estado fisiológico (Schiffrin *et al.*, 1995a; Goto *et al.*, 1996; Miyauchi y Masaki, 1999; Davenport, 2002; Matsumoto *et al.*, 2008). Diversos modelos y pacientes con hipertensión presentan menor proporción de

receptores vasodilatadores endoteliales  $ET_B$  y mayor densidad de receptores vasoconstrictores musculares  $ET_B$  (Touyz y Schiffrin, 2003; Shreenivas y Oparil, 2007). Los cambios en la expresión de receptores junto a los elevados niveles plasmáticos y tisulares de ET-1, contribuirían a la incrementada reactividad y prevalencia de hipertensión en estas condiciones (Touyz y Schiffrin, 2003; Shreenivas y Oparil, 2007).

Como ya hemos comentado, la sobreactivación del SRA conduce a un incremento del estrés oxidativo así como a un aumento de la expresión y la actividad de COX-2 a través de la liberación de su principal péptido efector, la Ang II (Álvarez *et al.*, 2007; Dikalov *et al.*, 2008). ET-1 puede ser liberada en respuesta a factores de crecimiento y/o sustancias vasoactivas, incluyendo Ang II (Imai *et al.*, 1992; Rajagopalan *et al.*, 1997; Alexyev *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2004; An *et al.*, 2006), y se ha descrito que el sistema ET-1 puede ser un mediador importante para explicar algunos efectos hemodinámicos así como el daño cardiovascular inducidos por Ang II (Rajagopalan *et al.*, 1997; Montanari *et al.*, 2003; Laplante *et al.*, 2005; Boesen *et al.*, 2010). Por otra parte, el tratamiento con IECAs normaliza los incrementados niveles plasmáticos de ET-1 en pacientes hipertensos (Uemasu *et al.*, 1994). De acuerdo con esto, el tratamiento con losartán redujo el aumento de la expresión de ET-1 y de su receptor  $ET_A$  encontrado en aortas de SHR, lo que confirma que la elevada actividad del SRA en hipertensión contribuye a dicho aumento. En este mismo sentido, como comentamos más adelante, Ang II incrementa los niveles de ET-1 en CMLV de ratas SHR.

PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares que posee efectos cardiovasculares protectores asociados a su capacidad de reducir, entre otras, la expresión vascular de enzimas proinflamatorias, la proliferación de CMLV y, en general, la inflamación vascular (Touyz y Schiffrin, 2006). La capacidad de los agonistas PPAR $\gamma$  de reducir la incrementada expresión de COX-2 que se observa en distintos modelos de inflamación (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2005; Collino *et al.*, 2006) contribuiría al efecto antiinflamatorio de estos compuestos. En este sentido, encontramos que el tratamiento con pioglitazona reduce los incrementados niveles de COX-2 en aorta de SHR. Estos resultados difieren de los encontrados en segmentos de AMR, donde habíamos

observado un aumento de expresión de COX-2 tras el tratamiento con pioglitazona (Hernanz *et al.*, 2012). No tenemos explicación para este resultado contradictorio, pero podría deberse a diferencias en los mecanismos de compensación que ocurren en arterias de resistencia frente a las de conductancia.

Los agonistas PPAR $\gamma$  también inhiben el estrés oxidativo, lo que contribuye a los efectos protectores de estos compuestos. Así, en aortas de ratas diabéticas, el tratamiento con pioglitazona también disminuyó el estrés oxidativo mediante la reducción de la actividad NADPH oxidasa y el incremento de SOD (Matsumoto *et al.*, 2007), y en un modelo de síndrome metabólico, pioglitazona redujo la expresión de p47phox así como la actividad NADPH oxidasa en aorta y riñón de rata (Kong *et al.*, 2012; 2014). En AMR de SHR tratadas con pioglitazona nuestro grupo observó menores niveles de anión superóxido así como de las subunidades catalíticas de la NADPH oxidasa NOX-1 y NOX-2, y de la subunidad organizadora p47phox (Hernanz *et al.*, 2012). Además, los efectos beneficiosos de pioglitazona sobre el daño cerebrovascular en ratas SHR-SP se han asociado con una reducción en la producción de anión superóxido por inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa (Nakamura *et al.*, 2007). De acuerdo con lo descrito, en el presente estudio pioglitazona redujo el incremento en la expresión de NOX-1, NOX-4 y p47phox, así como en la actividad de la NADPH oxidasa observado en aorta de SHR. La reducción del estrés oxidativo podría contribuir a la mejora de la relajación dependiente de endotelio producida por las glitazonas en distintas patologías, incluida la hipertensión (Diep *et al.*, 2002; Hernanz *et al.*, 2012).

Además de los efectos ya mencionados, PPAR $\gamma$  puede interferir con el eje endotelina reduciendo la expresión del péptido, tanto a nivel basal como tras su estimulación por diversos agentes (Delerive *et al.*, 1999; Fukunaga *et al.*, 2001; Potenza *et al.*, 2006; Venegas-Pont *et al.*, 2009). Adicionalmente, PPAR $\gamma$  puede regular la expresión de los receptores de ET-1 y, en consecuencia, las respuestas vasculares. Así, en arterias pulmonares de ratas Sprague Dawley con hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, rosiglitazona redujo la contractilidad a ET-1 mediante la disminución de los niveles de ET $_A$  y el incremento de ET $_B$  (Liu *et al.*, 2014); del mismo modo, Tian *et al.* (2010) encontraron que rosiglitazona reducía

la contractilidad a ET-1 como consecuencia del incremento de receptores ET<sub>B</sub>. Por el contrario, en un estudio con 80 pacientes el tratamiento con pioglitazona de pacientes hipertensos o con hipercolesterolemia no diabéticos no modificaba la capacidad vasodilatadora del antagonista de receptores ET<sub>A</sub> BQ123, si bien no se analizaba el efecto sobre los receptores ET<sub>B</sub> (Campia *et al.*, 2014). Otros autores han descrito un efecto reductor de pioglitazona sobre la expresión no solo de ET-1 y ET<sub>A</sub> sino también de ET<sub>B</sub> (Kang *et al.*, 2011). En nuestro trabajo observamos que el tratamiento *in vivo* de ratas SHR con pioglitazona redujo los niveles basales de ARNm de ET-1 y de su receptor ET<sub>A</sub> en segmentos aórticos, mientras que aumentó los de ET<sub>B</sub>. Como discutiremos más adelante, estos cambios en la expresión de los receptores de ET-1 pueden estar relacionados con la reducción de la contractilidad a fenilefrina inducida por ET-1 en arterias de SHR tratadas con pioglitazona. El efecto de los agonistas PPAR $\gamma$  sobre el eje endotelina contribuiría a la mejora de las alteraciones cardiovasculares que producen estos compuestos no solo en hipertensión sino también en otros procesos patológicos como diabetes o hipertrofia cardíaca (Sakai *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2007; Venegas-Pon *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012). Por otra parte, el hecho de que en vasos de SHR los niveles de PPAR $\gamma$  se encuentren disminuidos (Pérez-Girón, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Hernanz *et al.*, 2012; Akyürek *et al.*, 2014) puede ayudar a explicar el aumento de ET-1 y ET<sub>A</sub>, así como los ya mencionados elevados niveles de COX-2 y la mayor producción de ROS que se observan en animales hipertensos.

Sin embargo, y a pesar de los efectos mencionados de pioglitazona sobre el estrés oxidativo, COX-2 y ET-1, no se observaron cambios en la presión arterial de las ratas SHR tratadas con pioglitazona, tal como habíamos descrito (Hernanz *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las glitazonas pueden bajar la presión arterial en pacientes o modelos animales de diabetes y síndrome metabólico (Kaufman *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1999; Venegas-Pont *et al.*, 2009); sin embargo, cuando la hipertensión no está asociada con diabetes u otros factores del síndrome metabólico, generalmente no se han observado cambios en la presión arterial (Llorens *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Shinzato *et al.*, 2007; Hernanz *et al.*, 2012), excepto en tratamientos a largo plazo (Zhang *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2014) o utilizando altas dosis de los agonistas (Chan *et al.*, 2010; Dovinová *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2014). Es posible que aunque pioglitazona reduzca algunos marcadores

proinflamatorios, este efecto beneficioso sea temprano y sea a largo plazo cuando se traduzca en una bajada de la presión como consecuencia de la mejora del perfil inflamatorio.

### **Efecto de pioglitazona sobre la participación de ET-1 en la inducción de COX-2 estimulada por Ang II en CMLV de ratas hipertensas**

Como hemos comentado, la activación de PPAR $\gamma$  reduce los incrementados niveles de COX-2 y de ET-1 observados en hipertensión. Puesto que un incremento en la actividad del SRA en esta patología se ha relacionado con la elevada expresión de ambos ET-1 (presente estudio) y COX-2 (Alvarez *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008; Martínez-Revelles *et al.*, 2013), llevamos a cabo experimentos para comprobar si la activación de PPAR $\gamma$  modifica el papel de ET-1 sobre la inducción de COX-2 por Ang II, así como los mecanismos implicados. Para ello, utilizamos CMLV de aorta de ratas normotensas e hipertensas tras la estimulación con Ang II.

Como ya se ha comentado, la COX-2 es la principal fuente de prostanoïdes vasoactivos en presencia de mediadores proinflamatorios como citoquinas (Briones *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2012), endotoxinas bacterianas como el lipopolisacárido bacteriano (Hernanz *et al.*, 2004), o péptidos vasoactivos como la Ang II (Hu *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2007; Beltrán *et al.*, 2009). Ang II indujo la expresión de la enzima proinflamatoria de forma dependiente del tiempo en mayor grado en células de ratas SHR que en las de ratas WKY. En un trabajo previo, nuestro grupo había descrito que la inducción de COX-2 por IL-1 $\beta$  también era mayor en células de SHR (Martín *et al.*, 2012), lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales o alteraciones en la respuesta en hipertensión respecto a su control normotenso. Uno de los mecanismos que podría explicar esta incrementada respuesta en ratas hipertensas es la mayor presencia de receptores AT<sub>1</sub> descrita por algunos investigadores (Dhar *et al.*, 2013; Bhatt *et al.*, 2014), aunque no hemos analizado esa posibilidad en este trabajo. Además de aumentar la expresión de COX-2, en CMLV de SHR Ang II incrementó los niveles de ET-1, siendo este efecto producido a través de la activación de receptores AT<sub>1</sub>. Por el contrario, en células de WKY, Ang II no modificó la expresión de ET-1, lo que difiere de lo descrito en cultivos de CMLV de ratas Sprague Dawley, también

normotensas, donde Ang II induce un aumento en la expresión del péptido (Hong *et al.*, 2004). Esta discrepancia puede ser explicada por diferencias entre cepas, grado de confluencia o incluso el pase del cultivo celular, ya que se ha descrito que todos estos factores son críticos para la expresión de ET-1 (Ranta *et al.*, 1997).

Como ya se ha comentado, la producción de ET-1 puede ser importante para explicar el daño cardiovascular inducido por Ang II. Así, la hipertensión, la proliferación y los efectos renales observados tras la infusión con Ang II son atenuados por antagonistas de ET-1 (Rajagopalan *et al.*, 1997; Montanari *et al.*, 2003; Laplante *et al.*, 2005; Boesen *et al.*, 2011). Además, la hipertrofia y la fibrosis cardiaca inducida por Ang II son menores en ratones deficientes específicos en ET-1 de células endoteliales (Adiarlo *et al.*, 2012). Nosotros observamos que ET-1, actuando sobre receptores ET<sub>A</sub>, contribuye al incremento en la expresión de COX-2 producido por Ang II en CMLV de SHR basándonos en los siguientes resultados: 1) ET-1 indujo la expresión de COX-2 mediante la activación de receptores ET<sub>A</sub>, y 2) el bloqueo de receptores ET<sub>A</sub>, pero no de ET<sub>B</sub>, redujo la expresión de COX-2 inducida por Ang II. De forma similar, ET-1 aumenta la expresión de COX-2 en CMLV de AMR de ratas SHR-SP pero no en las de WKY (Montezano *et al.*, 2007). El hecho de que Ang II no incrementara la expresión de ET-1 en células de ratas normotensas y los menores niveles de ET-1 en ratas WKY comparados con SHR, podría contribuir a explicar los menores niveles de COX-2 observados en CMLV y en segmentos aórticos de ratas WKY, así como el menor incremento de COX-2 inducido por Ang II observado en CMLV de esta cepa.

El SRA es responsable del aumento del estrés oxidativo en diferentes modelos de hipertensión (Alvarez *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Además, está descrito que Ang II aumenta la producción de ROS en varios tipos celulares (Schieffer *et al.*, 2000; Dikalov *et al.*, 2008; Beltrán *et al.*, 2009; Montezano *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013) y que existe una relación entre ellas y los productos derivados de COX-2. Así, las ROS pueden aumentar tanto la expresión como la actividad de COX-2 (Feng *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2012), aunque también es conocido el papel de los derivados de COX sobre la producción de ROS (Muzaffar *et al.*, 2004; Cogolludo *et al.*, 2006; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Adicionalmente, las ROS están implicadas en la

inducción de ET-1 (Chen *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003; Troncoso Brindeiro *et al.*, 2007). En nuestras condiciones experimentales, Ang II aumentó los niveles de ARNm de la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa NOX-1, que fue acompañado por un incremento en la actividad de dicha enzima y en la subsecuente producción de  $O_2^-$ . Además, encontramos que tanto el inhibidor específico de NOX-1 ML171 (Gianni *et al.*, 2009) como el barredor de  $H_2O_2$  catalasa, redujeron la expresión de COX-2 producida por Ang II en CMLV de SHR, confirmando que el anión superóxido derivado de NADPH oxidasa y el  $H_2O_2$  participan en este efecto. En un trabajo previo, hemos descrito que las ROS están implicadas en la inducción de COX-2 causada por IL-1 $\beta$  en CMLV de ratas SHR (Martín *et al.*, 2012). Aunque no hemos analizado la procedencia del  $H_2O_2$ , éste puede producirse a partir del anión superóxido por acción de la SOD o por alguna fuente de producción directa como NOX-4 (Dikalov *et al.*, 2008), eNOS (Schulz *et al.*, 2008) o xantina oxidasa (Lacy *et al.*, 1998). Tanto ML171 como catalasa también redujeron los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1, indicando que las ROS producidas por Ang II también participan en la expresión de este péptido.

Los factores de transcripción AP-1 y NF $\kappa$ B se encuentran activados muy frecuentemente en patologías cardiovasculares como la hipertensión (Luft *et al.*, 1999; Fiebeler *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2009). NF $\kappa$ B es una familia de factores transcripción ubicua que controla la proliferación y migración celular, así como la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria. Es un dímero formado por las subunidades p65 y p50 o p52. En células en reposo, NF $\kappa$ B permanece secuestrado en el citoplasma asociado con las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B. Tras la estimulación, la quinasa de I $\kappa$ B (IKK) se fosforila y se activa, fosforilando a su vez a I $\kappa$ B, que se ubiquitina y se degrada en el proteasoma, permitiendo que NF $\kappa$ B se trasloque al núcleo donde ejerce su función como factor de transcripción (Li y Stark, 2002; Hayden y Ghosh, 2004). Ang II puede activar este factor de transcripción (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008a) y, de acuerdo con esto, observamos que Ang II incrementó la fosforilación de IKK así como la expresión nuclear de la subunidad de NF $\kappa$ B p65 en CMLV de SHR. Por su parte, AP-1 es un grupo de factores de transcripción compuestos por dímeros de jun (c-Jun, JunB y JunD) y fos (Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2), pudiendo existir como homodímeros de jun o heterodímeros de jun y fos. Para su activación necesitan ser fosforilados en el extremo N-terminal de jun por una

quinasa (JNK) (Zenz *et al.*, 2008; Davies y Tournier, 2012). En CMLV de SHR, Ang II incrementó la fosforilación de JNK, los niveles de ARNm de c-jun y la expresión nuclear de fosfo-c-jun, sugiriendo la activación de AP-1 tras la estimulación con Ang II, como ha sido descrito por otros investigadores (Yin *et al.*, 2009).

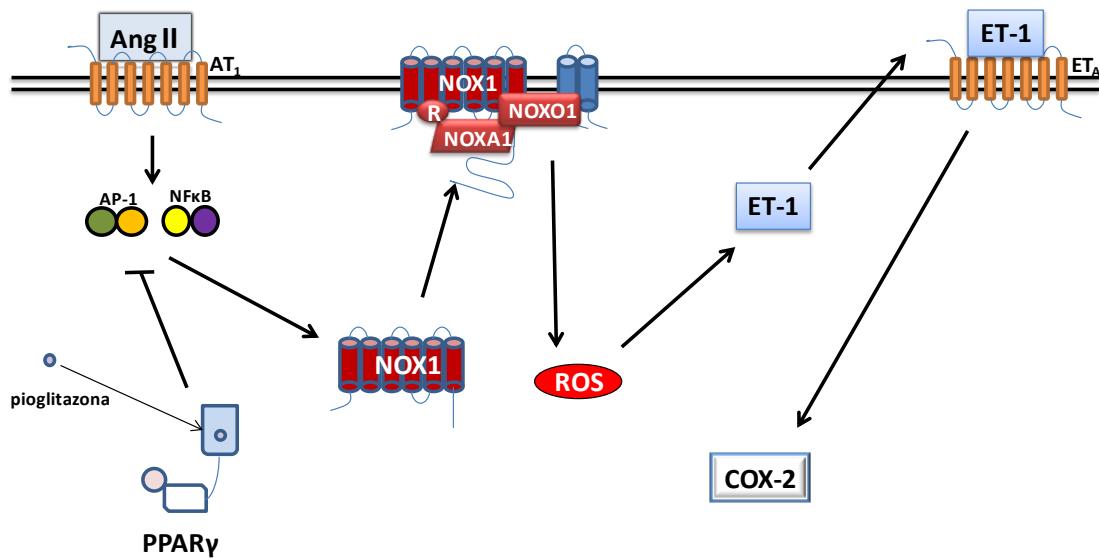
La activación de AP-1 juega un papel relevante en la inducción de ET-1 (Rodríguez-Pascual *et al.*, 2011; Stow *et al.*, 2011). De hecho, análisis mutacionales del promotor de este gen mostraron que el sitio de unión de AP-1 es un elemento importante en la inducción de ET-1 producida por diferentes estímulos, tales como Ang II (Cheng *et al.*, 2003; 2010). Además, el promotor de ET-1 también contiene al menos un sitio funcional de unión a NFκB (Lorenz *et al.*, 2009; Rodríguez-Pascual *et al.*, 2011; Stow *et al.*, 2011). En este sentido, la sobreexpresión de la subunidad de NFκB p65, conduce a un incremento de la transcripción de ET-1, mientras que la sobreexpresión de IκB disminuye la actividad del promotor (Quehenberger *et al.*, 2000). El hecho de que el tratamiento tanto con el inhibidor de JNK SP600125 como con el inhibidor del proteasoma lactacistina disminuyera significativamente el aumento en los niveles de ARNm de pre-pro-ET-1 producido por Ang II, sugiere que dicho incremento depende de la activación de ambas rutas de señalización. El promotor de NOX-1 también contiene sitios de unión para AP-1 (Cevik *et al.*, 2008; Manea *et al.*, 2008), y NFκB es un regulador esencial de NOX-1 (Manea *et al.*, 2010). De acuerdo con esto, los niveles de ARNm de NOX-1 así como la actividad de la NADPH oxidasa se redujeron con SP600125 y lactacistina en CMLV de SHR estimuladas con Ang II. Puesto que ROS y ET-1 están implicados en la inducción de COX-2 producida por Ang II, y dado que NFκB y AP-1 participan en la expresión de estos mediadores, es de esperar que ambos factores de transcripción contribuyan a la inducción de la expresión de COX-2. De acuerdo con esto, ambos SP600125 y lactacistina disminuyeron la expresión de COX-2 inducida por Ang II, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

En CMLV de SHR el agonista PPARγ redujo el incremento tanto de COX-2 como de ET-1 producido por Ang II, apoyando los resultados obtenidos en segmentos aórticos tras el tratamiento *in vivo*. Existen varios mecanismos por los cuales pioglitazona podría estar reduciendo la inducción de ET-1 y, consecuentemente, de COX-2. Como ya hemos

comentado, la activación de PPAR $\gamma$  puede reducir el estrés oxidativo aumentando mecanismos antioxidantes (Matsumoto *et al.*, 2007) así como disminuyendo la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa o su actividad (Matsumoto *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2012; Hernanz *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2014). Corroborando este hecho, observamos que pioglitazona redujo el incremento de NOX-1 y la actividad de la NADPH oxidasa inducidos por Ang II en CMLV de SHR, resultados que son consistentes con los obtenidos tras el tratamiento *in vivo*. Puesto que, como hemos observado en nuestros experimentos, las ROS están implicadas en la inducción de COX-2 y ET-1, el efecto antioxidante de pioglitazona podría ser una de las vías por las cuales este agonista PPAR $\gamma$  reduce COX-2 y ET-1.

Los agonistas PPAR $\gamma$  interfieren con factores de transcripción como AP-1 y NF $\kappa$ B, mecanismo conocido como transrepresión, lo que explica las acciones antiinflamatorias de estos compuestos (Ricote y Glass, 2007; Choi y Bothwell, 2012; Martín *et al.*, 2012). Como hemos descrito anteriormente, los factores de transcripción AP-1 y NF $\kappa$ B están implicados en la inducción de la expresión de COX-2 y ET-1 por Ang II. En CMLV de SHR, pioglitazona redujo la fosforilación de JNK, los niveles de ARNm de c-jun y la expresión nuclear de p-c-jun; además, también redujo la expresión nuclear de p65. Por lo tanto, la interferencia con estos factores de transcripción es otro de los mecanismos por los que la glitazona actúa sobre ET-1 y, consecuentemente, sobre COX-2. Por otra parte, puesto que la activación de AP-1 y NF $\kappa$ B también participa en el incremento de la expresión de NOX-1 así como de la actividad NADPH oxidasa, la reducción del estrés oxidativo llevada a cabo por pioglitazona podría ser explicada por la interferencia con estos factores de transcripción; este mecanismo también contribuiría a la reducción de ET-1 y COX-2 inducida por Ang II.

Resumiendo, los resultados presentados hasta el momento proporcionan evidencias sobre la existencia de mecanismos dependientes de ROS que incrementan ET-1 y que contribuyen a la mayor expresión de COX-2 inducida por Ang II observada en vasos de conductancia de animales hipertensos. Además, las glitazonas inhiben la expresión de COX-2 producida por Ang II en células de SHR mediante la disminución de la producción de ROS y de los niveles de ET-1, interfiriendo con la activación de las rutas de NF $\kappa$ B y AP-1, aunque no se pueden descartar mecanismos adicionales (Fig. 70).



**Fig. 70:** Esquema representativo de los mecanismos estudiados en este trabajo implicados en la inducción de COX-2 por Ang II en CMLV de SHR y su regulación por PPAR $\gamma$ .

#### *Efecto de pioglitazona sobre la expresión de COX-2 inducida por ET-1 en CMLV de ratas hipertensas*

Una vez demostrada la participación de ET-1, a través de receptores ET<sub>A</sub>, en el incremento de la expresión de COX-2 inducido por Ang II, analizamos los mecanismos por los que ET-1 induce dicha expresión, así como el efecto de pioglitazona. Al igual que hemos observado en CMLV de SHR, otros autores han demostrado que ET-1 incrementa la expresión de COX-2 en distintos tipos celulares como células endoteliales de microvasos cerebrales de ratón (Hsieh *et al.*, 2012), células de músculo liso de microvasos de pulmón (Chen *et al.*, 2003), células endoteliales de aorta de rata (Sugiyama *et al.*, 2004), células epiteliales humanas (Peng *et al.*, 2008) o CMLV de AMR de ratas SHR-SP (Montezano *et al.*, 2007). ET-1 también incrementa la producción de ROS por mecanismos dependientes (Banes-Berceli *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2014b) o independientes de la actividad de la NADPH oxidasa (Callera *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008). En el presente estudio observamos que ET-1 aumentó los niveles de ARNm de las subunidades catalíticas de la NADPH oxidasa NOX-1 y NOX-4, la actividad de esta enzima y la producción de anión superóxido. Aunque tradicionalmente se ha asociado NOX-4 a la producción constitutiva de ROS (Chen *et al.*, 2012), se sabe que también responde a ciertos estímulos como hipoxia (Craigie *et al.*, 2011), TGF- $\beta$ 1 (Cucoranu *et al.*, 2005) o estrés mecánico (White *et al.*, 2011).

El aumento de la producción de anión superóxido derivado de NADPH oxidasa contribuye a la inducción de COX-2 producida por el péptido en CMLV de SHR, como lo demuestra el hecho de que apocinina redujera dicha inducción, aunque no podemos descartar que exista otra fuente de producción de anión que esté participando. Por el contrario, catalasa no modificó la expresión de COX-2 inducida por ET-1, lo que descarta la participación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En este mismo trabajo hemos demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa en el incremento de COX-2 inducido por Ang II; además, en un trabajo previo llevado a cabo en este mismo tipo celular, nuestro grupo también ha descrito la participación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la inducción del enzima por IL-1 $\beta$  (Martín *et al.*, 2012). Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, o bien ET-1 no incrementa la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o bien este peróxido de hidrógeno está siendo rápidamente detoxificado. Esta última opción parece ser la más probable puesto que, como hemos mencionado, ET-1 aumenta la expresión de NOX-4, subunidad de NADPH oxidasa que produce preferentemente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en lugar de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Dikalov *et al.*, 2008).

Ya hemos señalado anteriormente que el promotor de COX-2 posee motivos de unión a los factores de transcripción proinflamatorios AP-1 y NF $\kappa$ B (Tsatsanis *et al.*, 2006). Está descrito que ET-1 puede activar tanto AP-1 (Kodama *et al.*, 2003; Sutcliffe *et al.*, 2009; Hsieh *et al.*, 2012) como NF $\kappa$ B (Woods *et al.*, 2003; Montezano *et al.*, 2007; Sutcliffe *et al.*, 2009), hecho que nosotros constatamos ya que ET-1 incrementó la fosforilación de JNK, los niveles de ARNm de c-jun, así como la expresión nuclear de p65 en CMLV de SHR. Montezano *et al.* (2007) describieron la participación de NF $\kappa$ B en la inducción de COX-2 producida por ET-1 en CMLV de ratas SHR-SP. Por otro lado, también se ha descrito la implicación de AP-1 en el incremento de expresión de COX-2 producido por ET-1 en una línea de células endoteliales de cerebro de ratón (Lin *et al.*, 2014). De acuerdo con estos trabajos, nosotros observamos que tanto el inhibidor de JNK SP600125 como el inhibidor del proteasoma lactacistina redujeron la inducción de COX-2 producida por ET-1, demostrando la participación de ambos factores de transcripción AP-1 y NF $\kappa$ B en dicha inducción.

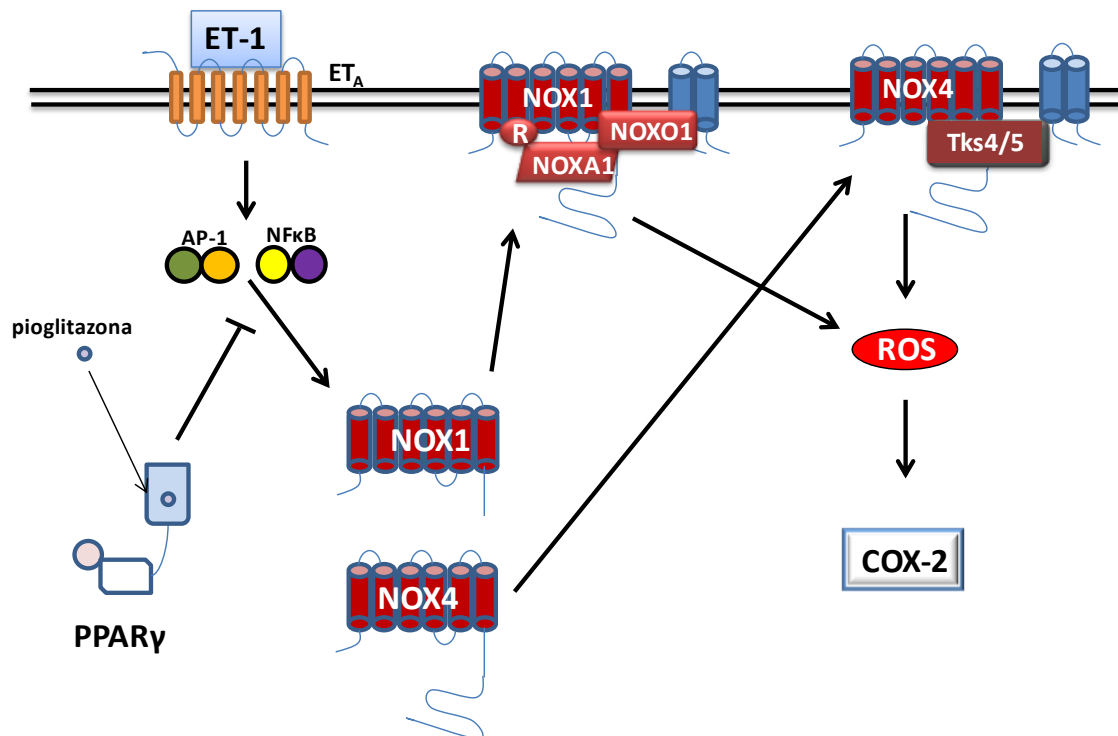
Tanto NF $\kappa$ B como AP-1 regulan la expresión de NOX-1 (Cevik *et al.*, 2008; Manea *et al.*, 2008; 2010), como también hemos comprobado en CMLV de SHR tras la estimulación con Ang II. Además, ambos factores de transcripción están implicados en la regulación del gen

de NOX-4 (Manea *et al.*, 2008; 2010; Lu *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2014). En este estudio observamos que la inhibición de la activación de NFκB redujo la expresión aumentada de NOX-1 y NOX-4 y la actividad NADPH oxidasa inducidas por ET-1; además, la inhibición de AP-1 redujo la expresión de NOX-1 y la actividad NADPH oxidasa, aunque no modificó la expresión de NOX-4. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que ET-1 activa AP-1 y NFκB, los cuales incrementan la expresión de NADPH oxidasa y, en consecuencia, su actividad; esto aumentaría los niveles de anión superóxido, que contribuyen a la inducción de la expresión de COX-2 por ET-1. Sin embargo, no podemos descartar que AP-1 y NFκB estén activando directamente el promotor de COX-2.

Como hemos comentado anteriormente, la reducción de la producción de ET-1 por los agonistas PPARγ es uno de los mecanismos que explican las acciones cardioprotectoras de estos fármacos (Sato *et al.*, 1999; Delerive *et al.*, 1999; Lepailleur-Enouf *et al.*, 2000; Fukunaga *et al.*, 2001; Martin-Nizard *et al.*, 2002; Touyz y Schiffrin, 2006); sin embargo, no podemos descartar que pioglitazona actúe, además, modulando los mecanismos activados por este péptido que conducen al incremento de COX-2. En este sentido, otros autores han descrito la capacidad de PPARγ de regular procesos activados por ET-1, como la hipertrofia cardiaca (Bao *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). Además, Montezano *et al.* (2007) encontraron que rosiglitazona reducía la expresión de COX-2 incrementada por ET-1 en CMLV de ratas SHR-SP. De acuerdo con estos resultados, en CMLV de SHR observamos que pioglitazona reduce la expresión de COX-2 inducida por ET-1. Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes descritas para las glitazonas (Matsumoto *et al.*, 2007; Hernanz *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2014), y que el estrés oxidativo contribuye al incremento en la expresión de COX-2 inducido por ET-1, analizamos el efecto de pioglitazona sobre el estrés oxidativo inducido por el péptido. En CMLV de SHR, pioglitazona redujo los niveles de las subunidades de NADPH oxidasa NOX-1 y NOX-4, la actividad de la enzima y la subsecuente producción de anión superóxido aumentados por ET-1, mecanismo que contribuiría al efecto de la glitazona sobre la expresión de COX-2. Por otra parte, y de acuerdo con los mecanismos de transrepresión a través de los cuales actúan los agonistas PPARγ, pioglitazona interfirió con la activación de NFκB inducida por ET-1 reduciendo los niveles de la subunidad p65 en el núcleo; este resultado está en línea con lo descrito

previamente (Montezano *et al.*, 2007). Además, pioglitazona también actúa sobre la activación de AP-1, ya que redujo la fosforilación de JNK y el aumento de los niveles de ARNm de c-jun que se observan tras el tratamiento con ET-1. Hasta donde nosotros sabemos es la primera vez que se describe que pioglitazona interfiere con la activación del factor de transcripción AP-1 por ET-1.

Estos resultados indican que pioglitazona reduce los niveles de COX-2 incrementados por ET-1 mediante la transrepresión de AP-1 y NFκB, lo que conducirá a una menor producción de ROS y, finalmente, a una reducción de COX-2 (Fig. 71). No obstante, no podemos descartar que la propia activación de dichos factores de transcripción participe de forma directa en la inducción de la enzima proinflamatoria y que pioglitazona interfiera a este nivel.



**Fig. 71:** Esquema representativo de los mecanismos estudiados en este trabajo implicados en la inducción de COX-2 por ET-1 en CMLV de SHR y su regulación por PPAR $\gamma$ .

### **Modulación por pioglitazona del efecto de ET-1 en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en arterias mesentéricas de resistencia de ratas hipertensas**

Ya hemos mencionado anteriormente que ET-1, aislado inicialmente del sobrenadante de células endoteliales, fue considerado el vasoconstrictor más potente conocido (Yanagisawa *et al.*, 1988), pudiendo inducir respuestas vasoconstrictoras tanto en arterias de resistencia como de conductancia. Por otra parte, aunque las concentraciones de ET-1 *in vivo* puedan ser demasiado bajas para producir contracción, algunos autores han sugerido que este péptido puede participar en la fisiología y patofisiología vascular por su capacidad para modular la respuesta a otros agentes vasoactivos, aunque como veremos a continuación los resultados en este sentido son contradictorios. En nuestro estudio analizamos si la hipertensión modifica la modulación inducida por ET-1 sobre la contracción a fenilefrina, así como el efecto ejercido por la activación de PPAR $\gamma$ . Para ello, utilizamos AMR incubadas con ET-1, a una concentración que no produce vasoconstricción de forma directa.

En AMR de ratas WKY la incubación con ET-1 no modificó la contracción producida por el agonista  $\alpha$ -adrenérgico fenilefrina; sin embargo, ET-1 potenció dicha contracción en vasos procedentes de ratas SHR. De forma similar, en aorta de SHR, pero no de WKY, ET-1 potencia la contracción a noradrenalina (Zerrouk *et al.*, 1997); sin embargo, este péptido no modifica la contracción a noradrenalina ni en arteria caudal de SHR ni de WKY (García-Villalón *et al.*, 2000). Por el contrario, ET-1 aumenta la contracción inducida por serotonina y U46619 en arterias coronarias de cerdo y de ratas Sprague Dawley (Nakayama *et al.*, 1991; García-Villalón *et al.*, 2008), así como la respuesta a noradrenalina en aorta de conejo (Henrion y Laher, 1993) y a fenilefrina en diversos lechos vasculares de conejo y de rata (Gondre y Christ, 1998; Wingard *et al.*, 2003). Estas discrepancias podrían explicarse por diferencias en el lecho vascular y en el modelo animal utilizados, donde la expresión de receptores para ET-1 puede variar (Schiffrin *et al.*, 1995a; Goto *et al.*, 1996; Miyauchi y Masaki, 1999; Marracheli *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2010). Diferencias en las condiciones experimentales también pueden ayudar a explicar estas discrepancias; así, Matsumura *et al.* (2001) encontraron un efecto potenciador de ET-1 sobre la contracción producida por noradrenalina en arterias mesentéricas perfundidas de ratas WKY, a diferencia de lo obtenido en nuestras condiciones experimentales, donde utilizamos un miógrafo de alambres.

El aumento de la contracción a fenilefrina por ET-1 en arterias de ratas SHR depende de receptores ET<sub>A</sub>, ya que fue abolido por el antagonista de dicho receptor BQ123, pero no por el antagonista de receptores ET<sub>B</sub> BQ788. La participación del receptor ET<sub>A</sub> en este efecto está apoyada por el aumento de su expresión que encontramos en vasos de animales hipertensos y que hemos discutido anteriormente. Los datos de la bibliografía sobre el subtipo de receptor implicado en el efecto potenciador de ET-1 también son conflictivos; si bien la mayor parte de los autores concluye que es el receptor ET<sub>A</sub> el implicado en dicho efecto (Zerrouk *et al.*, 1997; García-Villalón *et al.*, 1997; Matsumura *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2014a), algunos sugieren la participación única de ET<sub>B</sub> (Hempelmann *et al.*, 1999; Gössl *et al.*, 2004), mientras que otros describen que contribuyen ambos subtipos de receptores, aunque predomina el papel de ET<sub>A</sub> (García-Villalón *et al.*, 2008; de Souza Rossignoli *et al.*, 2010).

Entre los mecanismos por los que ET-1 potencia la contractilidad producida por otras sustancias vasoconstrictoras se ha propuesto la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Yang *et al.*, 1990; García-Villalón *et al.*, 2000) o el incremento de la sensibilidad de la maquinaria contráctil a este ion, la cual puede estar mediada por PKC (Nakayama *et al.*, 1991; Henrion y Laher, 1993) o por RhoA-Rho quinasa (Wingard *et al.*, 2003). Sin embargo, es posible que además de un efecto sobre los mecanismos de contracción en la célula muscular lisa, ET-1 modifique los niveles de distintos mediadores que controlan el tono vascular. Así, se ha descrito que ET-1 induce contracción mediada por prostanoides vasoconstrictores (Oyekan *et al.*, 1997; Bolla *et al.*, 2004; Desjardins *et al.*, 2005; Marrachelli *et al.*, 2006), aunque también incrementa la producción de vasodilatadores como  $\text{PGI}_2$  y  $\text{PGE}_2$  que contrarrestan el efecto presor y vasoconstrictor del péptido (De Nucci *et al.*, 1988; Miura *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha descrito que derivados de ciclooxigenasa también participan en el efecto potenciador de ET-1 sobre la contracción inducida por otros agentes vasoactivos (Hempelmann *et al.*, 1999; Zerrouk *et al.*, 1997; Vila *et al.*, 2001). Nosotros observamos que el incremento en la contracción a fenilefrina inducido por ET-1 se reduce al incubar los segmentos arteriales con el inhibidor no selectivo de COX indometacina, así como con el inhibidor de COX-2 NS398. Estos resultados indican la participación de derivados contráctiles de COX-2 en el efecto potenciador observado en arterias de animales hipertensos, y están en línea con la inducción de la expresión de COX-2 producida por ET-1 en CMLV de SHR. Aunque ya se había descrito la participación de derivados de COX-2 en la vasoconstricción a ET-1 mediada por receptores  $\text{ET}_A$  (Zhou *et al.*, 2006), hasta donde nosotros sabemos, es la primera vez que se describe la implicación de derivados de esta isoforma en el aumento de la contracción a fenilefrina llevado a cabo por ET-1.

La incrementada expresión de COX-2 inducida por ET-1 en células de la pared vascular conduce a la producción de diversos prostanoides como  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  y  $\text{TXA}_2$  (Chen *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013), los cuales median algunos de los efectos producidos por el péptido (Deacon y Knox, 2010). En este trabajo observamos que el antagonista de receptores  $\text{EP}_1/\text{EP}_3$  SC19220 no modifica la potenciación de la respuesta a fenilefrina inducida por ET-1, descartando la participación de  $\text{PGE}_2$  actuando sobre estos receptores en dicho efecto; sin embargo, el hecho de que SQ29,548, un antagonista del

receptor TP, redujera el efecto de ET-1 sobre la contracción a fenilefrina sugiere la participación de este receptor. De acuerdo con nuestros resultados, otros investigadores han relacionado al receptor TP tanto en la respuesta contráctil inducida por la activación  $ET_A$  (Desjardins *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006), como en la potenciación de la respuesta alfa adrenérgica inducida por ET-1 (Zerrouk *et al.*, 1997; Vila *et al.*, 2001). Algunos autores proponen que es  $TXA_2$  el prostanoides que activa receptores TP en respuesta a ET-1 (Vila *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2006); sin embargo, el hecho de que en AMR de SHR el inhibidor de la  $TXA_2$  sintasa furegrelato no modificara el efecto de ET-1, descarta, aparentemente, su participación. Por otra parte, se ha descrito que ET-1 potencia la contracción al análogo de  $TXA_2$  U46619 (García-Villalón *et al.*, 2008), lo que nos lleva a pensar que ET-1 podría producir una sensibilización del receptor TP, al margen del efecto sobre la producción de prostanoides.

Es conocido que, en determinadas condiciones, otros prostanoides diferentes a  $TXA_2$  pueden producir sus efectos mediante unión al receptor TP. Así, nuestro grupo describió que  $PGI_2$  produce un efecto contráctil en AMR de ratas hipertensas a través de receptores TP (Hernanz *et al.*, 2012). Este efecto contráctil de la  $PGI_2$  ya ha sido descrito por otros autores en hipertensión (Gluais *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2008; Félétoú *et al.*, 2009) y envejecimiento (Gomez *et al.*, 2008). Sin embargo, el inhibidor de la  $PGI_2$  sintasa tranilcipromina no modificó la potenciación de la respuesta a fenilefrina inducida por ET-1, descartando también la participación de prostaciclina en este efecto. Otros derivados de la COX como  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGH_2$  o isoprostanos también pueden actuar a través de receptores TP (Coleman y Sheldrick, 1989; Ishizuka *et al.*, 2007); por lo tanto, son necesarios más experimentos para elucidar la naturaleza del derivado de COX-2 implicado en el efecto potenciador de la respuesta a fenilefrina inducido por ET-1 que se observa en ratas hipertensas.

El NO modula las respuestas vasoconstrictoras inducidas por diferentes agentes vasoactivos, incluidos los agonistas adrenérgicos como fenilefrina (Wiggers *et al.*, 2008) o noradrenalina (Xavier *et al.*, 2004). En AMR de SHR observamos que la inhibición de la sintasa de NO con L-NAME aumenta la contracción inducida por fenilefrina. Tras la

incubación con ET-1, el efecto potenciador de L-NAME fue menor, sugiriendo una menor modulación negativa por parte del NO de la respuesta vasoconstrictora. Además, la incubación de segmentos vasculares con ET-1 redujo los niveles basales de NO, así como tras la estimulación con acetilcolina (resultados no mostrados). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que una reducción en los niveles de NO contribuye a la aumentada contracción a fenilefrina inducida por ET-1. En línea con estos resultados, otros autores han observado que la inhibición de la producción de NO reduce o abole el efecto potenciador de ET-1 sobre la contracción a la estimulación eléctrica (García-Villalón *et al.*, 1997) y a 5-HT (García-Villalón *et al.*, 2008).

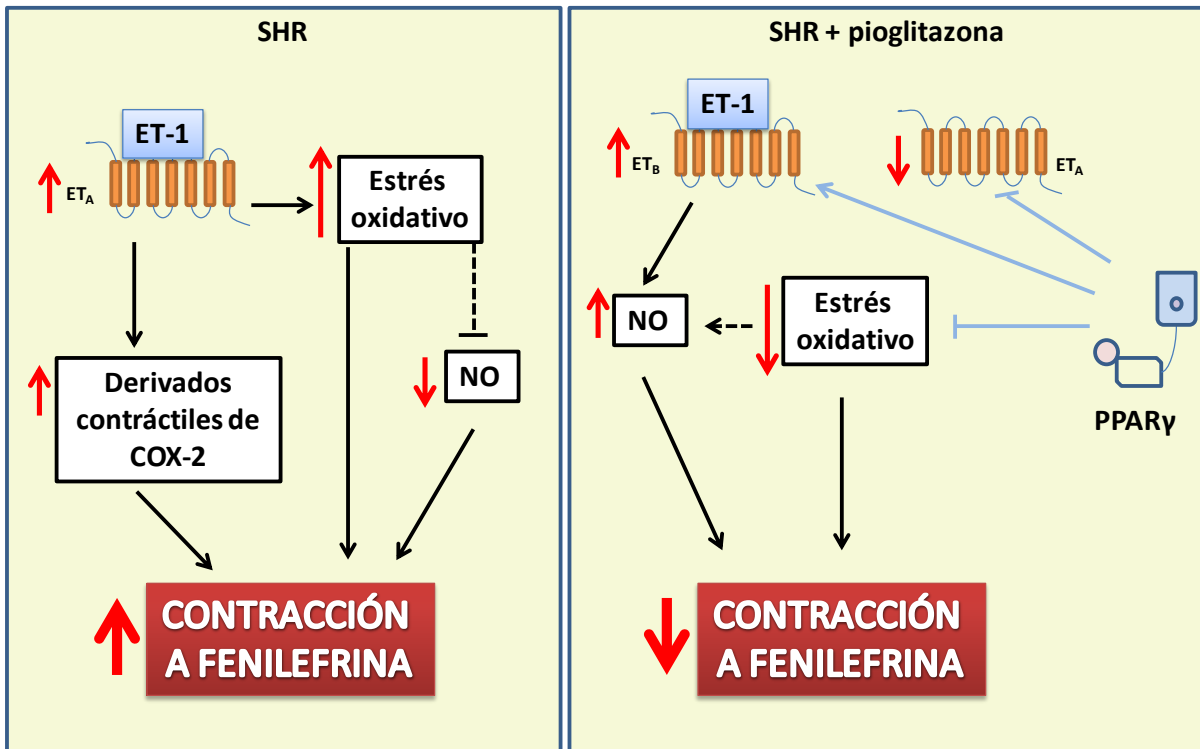
La relación existente entre NO y ET-1 es compleja. Por una parte, ET-1, a través de receptores ET<sub>B</sub> endoteliales, incrementa la producción de NO (Warner *et al.*, 1989; Schiffrin y Touyz, 1998; Cardillo *et al.*, 2000; Maguire y Davenport, 2015); sin embargo, la reducción de la producción de NO mediada por ET<sub>B</sub> participa en la incrementada contracción inducida por ET-1 observada en ratas diabéticas (Matsumoto *et al.*, 2009). En nuestro modelo esta posibilidad queda descartada ya que, como hemos comentado, el efecto de ET-1 que observamos es independiente de ET<sub>B</sub>. Por otra parte, algunos estudios describen que ET-1 puede reducir la producción de NO inhibiendo la expresión de eNOS por mecanismos que implican PKC (Ramzy *et al.*, 2006; Sud y Black, 2009); no parece que este sea el mecanismo que tenga lugar en nuestras condiciones experimentales, ya que los estudios mencionados se llevaron a cabo en cultivo de células endoteliales, donde el receptor expresado es ET<sub>B</sub>. Sin embargo, en un trabajo realizado en co-cultivo de células endoteliales con células musculares de arterias pulmonares, Wedgwood y Black (2005) describieron que la disminución de la expresión de eNOS por ET-1 implica la activación de ET<sub>A</sub> y la posterior producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta hipótesis abre una nueva vía de experimentación para determinar la implicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el efecto de ET-1 en nuestro estudio. Otro de los mecanismos que contribuyen a la reducción en la biodisponibilidad de NO, y que puede explicar las alteraciones vasculares que se producen en patologías como la hipertensión, es el incremento en la producción de ROS (Briones *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2015; Montezano *et al.*, 2015). Ya hemos comentado que ET-1 incrementa la producción de ROS, bien derivadas de NADPH oxidasa (Banes-Berceli *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010;

resultados de este trabajo), de xantina oxidasa (Viel *et al.*, 2008) o de la mitocondria (Callera *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008). Sánchez *et al.* (2014b) encontraron en arterias peneanas que ET-1, vía receptores ET<sub>A</sub>, estimula la producción de ROS a partir de la NADPH oxidasa, las cuales inhiben la biodisponibilidad de NO endotelial, contribuyendo a la contracción inducida por ET-1. El hecho de que en AMR de SHR la incubación con ET-1 incrementara la actividad de la NADPH oxidasa, nos lleva a proponer que el incremento en la producción de ROS muscular a partir de esta fuente, puede contribuir a la potenciación de la contracción a fenilefrina como consecuencia de la reducción de la biodisponibilidad de NO. Adicionalmente, ET-1 puede alterar los mecanismos de relajación a NO, habiéndose descrito que también reduce la vasodilatación endotelio-independiente inducida por la administración de donadores exógenos de NO (Böhm *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2014b). Por lo tanto, no podemos descartar que, además de una reducción en la biodisponibilidad a NO, ET-1 potencie la respuesta a fenilefrina en arterias de ratas hipertensas por mecanismos que impliquen un deterioro en la vasodilatación que éste produce.

Como hemos comentado anteriormente, las glitazonas poseen efectos protectores vasculares, entre los que destaca la mejora de la disfunción endotelial asociada a diversas patologías, incluyendo la hipertensión (Diep *et al.*, 2002; Hernanz *et al.*, 2012). Se ha descrito que ET-1 está implicada en el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes (Kamata *et al.*, 2004; Elmarakby *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2008), de manera que la reducción en los niveles de este péptido puede ser uno de los mecanismos por los que las glitazonas mejoran la disfunción endotelial en hipertensión, como ha sido sugerido por algunos investigadores (Touyz y Schiffrin, 2006; Matsumoto *et al.*, 2008). Además, pioglitazona también podría interferir con los efectos vasoactivos de ET-1. En nuestro trabajo encontramos que el tratamiento de ratas hipertensas con pioglitazona no sólo abolió la potenciación de la contracción a fenilefrina inducida por ET-1, si no que en estas condiciones, ET-1 redujo dicha contracción. Esta reducción, que no fue modificada por el antagonista de receptores ET<sub>A</sub>, fue inhibida por el antagonista de receptores ET<sub>B</sub>, lo que demuestra la participación de este subtipo de receptor en dicha inducción. El efecto de pioglitazona sobre los efectos vasculares de ET-1 se asocia con la reducción en los niveles de ET<sub>A</sub> y el aumento en los de ET<sub>B</sub> observados tras el tratamiento con la glitazona.

Ya hemos comentado que a través de receptores  $ET_B$  de origen endotelial, ET-1 incrementa la producción de NO (Warner *et al.*, 1989; Schiffrin y Touyz, 1998; Cardillo *et al.*, 2000; Maguire y Davenport, 2015). De acuerdo con la mayor expresión de receptores  $ET_B$ , en segmentos de ratas tratadas con pioglitazona, el efecto potenciador de la respuesta a fenilefrina inducido por L-NAME fue mayor tras la incubación con ET-1 que en situación control, sugiriendo una mayor modulación negativa por parte del NO de la respuesta vasoconstrictora. Adicionalmente, la incubación de segmentos arteriales con pioglitazona aumentó la producción de NO, cuyos niveles habían sido reducidos por ET-1. En línea con esto, se ha sugerido que rosiglitazona reduce la vasoconstricción a ET-1 por mecanismos que implican un aumento en la vía del NO asociado al incremento en la expresión de receptores  $ET_B$  (Tian *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). El aumento de la biodisponibilidad de NO inducido por ET-1 que se observa tras el tratamiento con la glitazona puede deberse a una reducción de la producción de ROS, por lo tanto, el efecto beneficioso de pioglitazona podría estar mediado por un aumento en la vía del NO asociado a la reducción del estrés oxidativo, como ha sido descrito (Ikejama *et al.*, 2008; Hernanz *et al.*, 2012). Confirmando esta hipótesis, la incubación de segmentos arteriales con pioglitazona abole el incremento de la actividad NADPH oxidasa inducido por ET-1.

En resumen, la incrementada expresión de  $ET_A$  en vasos de animales hipertensos contribuye al aumento de la contracción a fenilefrina inducido por ET-1 por mecanismos que implican a un prostanoides derivado de COX-2, que actúa a través de receptores TP (Fig. 72). Además, la reducción de la biodisponibilidad de NO, probablemente como consecuencia del aumento en la producción de ROS a partir de la NADPH oxidasa, también contribuye al efecto potenciador inducido por ET-1. El tratamiento de animales hipertensos con pioglitazona, además de reducir los incrementados niveles de ET-1, modifica la proporción de los receptores de este péptido, reduciendo la relación  $ET_A/ET_B$ ; en esta situación, ET-1 reduce la contracción a fenilefrina, debido posiblemente al aumento de la producción de NO y a la reducción de la actividad NADPH oxidasa que se observa (Fig. 72). Puesto que no hemos analizado el efecto de pioglitazona sobre la participación de los prostanooides, no podemos descartar un efecto sobre este mecanismo.



**Fig. 72:** Esquema representativo de los mecanismos estudiados en este trabajo implicados en la potenciación de la contracción a fenilefrina producida por ET-1 en AMR de SHR (izquierda) y su modulación por PPAR<sub>γ</sub> (derecha).

## **CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



1.- El tratamiento de ratas SHR con pioglitazona reduce el estrés oxidativo y el incremento de la expresión vascular de COX-2, ET-1 y receptores ET<sub>A</sub> asociados al SRA en hipertensión. Además, la glitazona aumenta la expresión de receptores ET<sub>B</sub>.

2.- La producción de ET-1 por Ang II, a través de mecanismos que implican la activación de AP-1 y NFκB y el consiguiente aumento en la producción de ROS, participa en la inducción de COX-2 por Ang II únicamente en CMLV de SHR, lo que ayudaría a explicar la mayor expresión de COX-2 observada en esta cepa.

3.- ET-1, vía receptores ET<sub>A</sub>, activa los factores de transcripción NFκB y AP-1, conduciendo a un incremento del estrés oxidativo que contribuye a la inducción de COX-2 en CMLV de SHR.

4.- Pioglitazona inhibe la expresión de COX-2 inducida por Ang II en células de SHR mediante la reducción tanto de la producción de ET-1 como de su efecto sobre la expresión de COX-2, por mecanismos que implican la interferencia con AP-1 y NFκB y la reducción del estrés oxidativo.

5.- En vasos de SHR, ET-1 potencia la contracción a fenilefrina a través de receptores ET<sub>A</sub>. El aumento de derivados de COX-2 que actúan a través de receptores TP, y la reducción de la biodisponibilidad de NO, probablemente como consecuencia del aumento del estrés oxidativo, contribuyen a este efecto potenciador.

6.- Tras el tratamiento de ratas hipertensas con pioglitazona, ET-1, a través de receptores ET<sub>B</sub>, aumenta la biodisponibilidad de NO, reduciendo la contracción a fenilefrina. Este efecto podría verse favorecido por la reducción del estrés oxidativo que produce la glitazona.

### **Conclusión general**

Los resultados de esta Tesis indican que pioglitazona disminuye la incrementada expresión vascular de COX-2 en hipertensión mediante la reducción tanto de la producción de ET-1 como de su efecto sobre la expresión de dicha enzima proinflamatoria. Además, la

glitazona reduce la relación entre la expresión de receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, revirtiendo el efecto de ET-1 sobre la contracción a fenilefrina; en esta situación, ET-1 reduce dicha contracción debido al aumento en la biodisponibilidad de NO. La actividad antioxidante de este compuesto contribuye a los efectos vasculares mencionados. Estos resultados permiten avanzar en el conocimiento de los mecanismos que contribuyen a los efectos cardioprotectores de los agonistas PPAR $\gamma$  y de la importancia de estos compuestos en la mejora de la inflamación vascular asociada a la hipertensión.

1.- Treatment of SHR *in vivo* with pioglitazone reduces the oxidative stress and the increased vascular expression of COX-2, ET-1 and ET<sub>A</sub> receptors associated to renin-angiotensin system in hypertension. In addition, the glitazone augments expression of ET<sub>B</sub> receptors.

2.- Ang II-induced ET-1 production, through mechanisms dependent of AP-1 and NFκB activation and the subsequent ROS production, participates in the Ang II-induced COX-2 expression only in vascular smooth muscle cells (VSMC) from SHR. This might help to explain the higher COX-2 levels observed in this strain.

3.- ET-1, via ET<sub>A</sub> receptors, activates NFκB and AP-1 transcription factors leading to increased oxidative stress that contributes to COX-2 induction in VSMC from SHR.

4.- Pioglitazone inhibits AngII-induced COX-2 expression in cells from SHR by reducing both ET-1 production and its effect on COX-2 expression by mechanisms dependent of AP-1 and NFκB interference and reduction of ROS production.

5.- In vessels from SHR, ET-1 potentiates the phenylephrine contraction through ET<sub>A</sub> receptors. An increase in COX-2 derivatives acting on TP receptors and the reduction of the bioavailability of NO, likely as a consequence of the increased oxidative stress, contribute to this effect.

6.- After pioglitazone treatment of hypertensive rats, ET-1, through ET<sub>B</sub> receptors, reduces the contraction to phenylephrine by increasing NO bioavailability; the oxidative stress reduction produced by the glitazone can contribute to this effect .

### **Overall conclusion**

The results of this Thesis demonstrate that pioglitazone diminishes the increased vascular COX-2 expression in hypertension through the reduction of ET-1 production and its effect on COX-2 expression. In addition, the glitazone reduces the expression of the ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> ratio. In this situation, ET-1 induces an opposing effect reducing phenylephrine-induced contraction as a consequence of increased NO bioavailability. The antioxidant activity of this

compound contributes to these vascular effects. These results advance our understanding of the mechanisms that contribute to the cardioprotective effects of the PPAR $\gamma$  agonists and the importance of these compounds in the improvement of vascular inflammation associated to hypertension.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abdelrahman AM, Al Suleimani YM. Four-week administration of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor, improves endothelial dysfunction in the hindlimb vasculature of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharm Res.* 2008;31(12):1584-9.
- Acarin L, Peluffo H, González B, Castellano B. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after excitotoxic damage to the immature rat brain. *J Neurosci Res.* 2002;68(6):745-54.
- Addabbo F, Nacci C, De Benedictis L, Leo V, Tarquinio M, Quon MJ, Montagnani M. Globular adiponectin counteracts VCAM-1-mediated monocyte adhesion via AdipoR1/NF- $\kappa$ B/COX-2 signaling in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(6):E1143-54.
- Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2005;23(5):1025-36.
- Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N. ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci.* 2012;91(13-14):651-7.
- Agarwal D, Haque M, Sriramula S, Mariappan N, Pariat R, Francis J. Role of proinflammatory cytokines y redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2009;54(6):1393-400.
- Aguado A, Rodríguez C, Martínez-Revelles S, Avendaño MS, Zhenyukh O, Orriols M, Martínez-González J, Alonso MJ, Briones AM, Dixon DA, Salaices M. HuR mediates the synergistic effects of angiotensin II and IL-1 $\beta$  on vascular COX-2 expression and cell migration. *Br J Pharmacol.* 2015;172(12):3028-42.
- Ahmad A, Singhal U, Hossain MM, Islam N, Rizvi I. The role of the endogenous antioxidant enzymes and malondialdehyde in essential hypertension. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(6):987-90.
- Ahmed SR, McGettrick HM, Yates CM, Buckley CD, Ratcliffe MJ, Nash GB, Rainger GE. Prostaglandin D2 regulates CD4+ memory T cell trafficking across blood vascular endothelium and primes these cells for clearance across lymphatic endothelium. *J Immunol.* 2011;187(3):1432-9.
- Akyürek Ö, Akbal E, Güneş F, Akyürek N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma concentrations in newly diagnosed hypertension patients and the metabolic effects of olmesartan. *Arch Med Res.* 2014;45(2):138-42.
- Alexyer BT, Cockrell KL, Rinewalt AN, Herrington JN, Granger JP. Enhanced renal expression of preproendothelin mRNA during chronic angiotensin II hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(5):R1388-92.
- Alique M, Calleros L, Luengo A, Griera M, Iñiguez MÁ, Punzón C, Fresno M, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. Changes in extracellular matrix composition regulate cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300(4):C907-18.
- Al-Shali K, Cao H, Knoers N, Hermus AR, Tack CJ, Hegele RA. A single-base mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma4 promoter associated with altered in vitro expression and partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5655-60.
- Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, Lobb RR, Sanz MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood.* 2004;104(2):402-8.
- Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 2005;23(4):767-77.
- Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(1):381-8.

- Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol*. 2008;153(5):926-35.
- An SJ, Boyd R, Wang Y, Qiu X, Wang HD. Endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(2):H700-8.
- An SJ, Boyd R, Zhu M, Chapman A, Pimentel DR, Wang HD. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):702-9.
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22(10):1276-312.
- Andresen J, Shafi NI, Bryan RM Jr. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985). 2006;100(1):318-27.
- Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation*. 2005;112(5):759-70.
- Arima S, Endo Y, Yaoita H, Omata K, Ogawa S, Tsunoda K, Abe M, Takeuchi K, Abe K, Ito S. Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest*. 1997;100(11):2816-23.
- Audoly LP, Rocca B, Fabre JE, Koller BH, Thomas D, Loeb AL, Coffman TM, FitzGerald GA. Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2 $\alpha$ )-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo. *Circulation*. 2000;101(24):2833-40.
- Avendaño M, Martínez-Revelles S, Aguado S, Simões MR, González-Amor M, Palacios R, Guillem-Llobat P, Vassallo DV, Vila L, García-Puig J, Beltrán L, Alonso MJ, Cachofeiro MV, Salaices M, Briones AM. Role of COX-2-derived PGE 2 on vascular stiffness and function in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2016 (en prensa).
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(2-3):76-102.
- Bagi Z, Erdei N, Toth A, Li W, Hintze TH, Koller A, Kaley G. Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-derived constrictor prostaglandins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1610-6.
- Bai G, Hock TD, Logsdon N, Zhou Y, Thannickal VJ. A far-upstream AP-1/Smad binding box regulates human NOX-4 promoter activation by transforming growth factor- $\beta$ . *Gene*. 2014;540(1):62-7.
- Bakris GL, Lindholm LH, Black HR, Krum H, Linas S, Linseman JV, Arterburn S, Sager P, Weber M. Divergent results using clinic and ambulatory blood pressures: report of a darusentan-resistant hypertension trial. *Hypertension*. 2010;56(5):824-30.
- Banes-Berceli AK, Ogobi S, Tawfik A, Patel B, Shirley A, Pollock DM, Fulton D, Marrero MB. Endothelin-1 activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells involves NADPHoxidase-derived reactive oxygen species. *Vascul Pharmacol*. 2005;43(5):310-9.
- Bao Y, Li R, Jiang J, Cai B, Gao J, Le K, Zhang F, Chen S, Liu P. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits endothelin-1-induced cardiac hypertrophy via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2008;317(1-2):189-96.
- Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):L829-36.
- Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116(3):590-7.
- Barrios V, Calderón A, Navarro-Cid J, Lahera V, Ruilope LM. N-acetylcysteine potentiates the antihypertensive effect of ACE inhibitors in hypertensive patients. *Blood Press*. 2002;11(4):235-9.

- Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*. 1999;402(6764):880-3.
- Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(8):485-98.
- Battistini B, O'Donnell LJ, Warner TD, Fournier A, Farthing MJ, Vane JR. Characterization of endothelin (ET) receptors in the isolated gall bladder of the guinea-pig: evidence for an additional ET receptor subtype. *Br J Pharmacol*. 1994;112(4):1244-50.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
- Beltrán AE, Briones AM, García-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens*. 2009;27(1):142-54.
- Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*. 1995;372(1):83-7.
- Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC. Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):781-6.
- Bhatt SR, Lokhywala MF, Byay AA. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. *Clin Exp Hypertens*. 2014;36(6):367-73.
- Bhosale UA, Quraishi N, Yegnanarayan R, Devasthale D. A comparative study to evaluate the cardiovascular risk of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors (COX-Is) in arthritic patients. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;26(1):73-9.
- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(8):994-1003.
- Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(5):1596-604.
- Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta goes vascular. *Circ Res*. 2008;102(2):146-7.
- Blanco-Rivero J, Cachafeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 2005;46(1):107-12.
- Bloch M, Prock A, Paonessa F, Benz V, Bähr IN, Herbst L, Witt H, Kappert K, Spranger J, Stawowy P, Unger T, Fusco A, Sedding D, Brunetti A, Foryst-Ludwig A, Kintscher U. High-mobility group A1 protein: a new coregulator of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated transrepression in the vasculature. *Circ Res*. 2012;110(3):394-405.
- Boesen EI, Pollock JS, Pollock DM. Contrasting effects of intervention with ETA and ETB receptor antagonists in hypertension induced by angiotensin II and high-salt diet. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(8):802-7.
- Boesen EI, Krishnan KR, Pollock JS, Pollock DM. ETA activation mediates angiotensin II-induced infiltration of renal cortical T cells. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(12):2187-92.
- Böhm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis*. 2007;190(2):408-15.

- Bolla M, You D, Loufrani L, Levy BI, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension*. 2004;43(6):1264-9.
- Boos CJ, Lip GY. Is hypertension an inflammatory process? *Curr Pharm Des*. 2006;12(13):1623-35.
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(7):1187-205.
- Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis*. 2000;31 Suppl 5:S202-10.
- Boutouyrie P, Lacolley P, Briet M, Regnault V, Stanton A, Laurent S, Mahmud A. Pharmacological modulation of arterial stiffness. *Drugs*. 2011;71(13):1689-701.
- Bowie AG, O'Neill LA. Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*. 2000;165(12):7180-8.
- Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137(1):354-66.
- Braissant O, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology*. 1998;139(6):2748-54.
- Briet M, Schiffrin EL. Treatment of arterial remodeling in essential hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013;15(1):3-9.
- Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Miguel M, Salas M. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39(3):378-88.
- Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2005;25(4):155-62.
- Briones AM, Arribas SM, Salas M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19(2):187-94.
- Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1239-53.
- Brune K. COX-2 selective inhibitors--they are still the best treatment for many patients! *Swiss Med Wkly*. 2005;135(11-12):163-5.
- Burns KA, Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):952-60.
- Cacioppo JA, Oh SW, Kim HY, Cho J, Lin PC, Yanagisawa M, Ko C. Loss of function of endothelin-2 leads to reduced ovulation and CL formation. *PLoS One*. 2014;9(4):e96115.
- Cai H. NADPHoxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res*. 2005;96(8):818-22.
- Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(2):243-53.
- Campia U, Matuskey LA, Tesauro M, Cardillo C, Panza JA. PPAR $\gamma$  activation does not affect endothelin activity in non-diabetic patients with hypertension or hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):436-40.
- Cantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide*. 2013;34:19-26.
- Cao W, Cheng L, Behar J, Biancani P, Harnett KM. IL-1beta signaling in cat lower esophageal sphincter circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(4):G672-80.

- Cao Z, Liu LZ, Dixon DA, Zheng JZ, Chyran B, Jiang BH. Insulin-like growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells. *Cell Signal*. 2007;19(7):1542-53.
- Cao L, Cao YX, Xu CB, Edvinsson L. Altered endothelin receptor expression and affinity in spontaneously hypertensive rat cerebral and coronary arteries. *PLoS One*. 2013;8(9):e73761.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Panza JA. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension*. 2000;35(6):1237-41.
- Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 2000;101(3):329-35.
- Carrizzo A, Puca A, Damato A, Marino M, Franco E, Pompeo F, Traficante A, Civitillo F, Santini L, Trimarco V, Vecchione C. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*. 2013;62(2):359-66.
- Cevik MO, Katsuyama M, Kanda S, Kaneko T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Kakehi T, Cui W, Sasaki M, Yabe-Nishimura C. The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX-1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: Possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(2):351-5.
- Chan SH, Wu KL, Kung PS, Chan JY. Oral intake of rosiglitazone promotes a central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2010;55(6):1444-53.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13926-31.
- Chang I, Bramall AN, Baynash AG, Rattner A, Rakheja D, Post M, Joza S, McKerlie C, Stewart DJ, McInnes RR, Yanagisawa M. Endothelin-2 deficiency causes growth retardation, hypothermia, and emphysema in mice. *J Clin Invest*. 2013;123(6):2643-53.
- Chen HC, Guh JY, Shin SJ, Tsai JH, Lai YH. Reactive oxygen species enhances endothelin-1 production of diabetic rat glomeruli in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med*. 2000;135(4):309-15.
- Chen D, Balyakina EV, Lawrence M, Christman BW, Meyrick B. Cyclooxygenase is regulated by ET-1 and MAPKs in peripheral lung microvascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(4):L614-21.
- Chen W, Druhan LJ, Chen CA, Hemann C, Chen YR, Berka V, Tsai AL, Zweier JL. Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. *Biochemistry*. 2010;49(14):3129-37.
- Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJ. From form to function: the role of NOX-4 in the cardiovascular system. *Front Physiol*. 2012;3:412.
- Chen QW, Edvinsson L, Xu CB. Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*. 2009;10:52.
- Cheng TH, Cheng PY, Shih NL, Chen IB, Wang DL, Chen JJ. Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(10):1845-54.
- Cheng TH, Lin JW, Chao HH, Chen YL, Chen CH, Chan P, Liu JC. Uric acid activates extracellular signal-regulated kinases and thereafter endothelin-1 expression in rat cardiac fibroblasts. *Int J Cardiol*. 2010;139(1):42-9.
- Chiloeches A, Paterson HF, Marais R, Clerk A, Marshall CJ, Sugden PH. Regulation of Ras.GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19762-70.

- Choi JM, Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Mol Cells*. 2012;33(3):217-22.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
- Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kim TS. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32681-7.
- Cipollone F, Fazia ML. Cyclooxygenase-2 inhibition: vascular inflammation and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep*. 2006;8(3):245-51.
- Cogolludo A, Frazziano G, Cobeño L, Moreno L, Lodi F, Villamor E, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1091:41-51.
- Coleman RA, Sheldrick RL. Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *Br J Pharmacol*. 1989;96(3):688-92.
- Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Danni O, Thiemeermann C, Fantozzi R. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*. 2006;530(1-2):70-80.
- Cok SJ, Acton SJ, Sexton AE, Morrison AR. Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3'-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA. *J Biol Chem*. 2004;279(9):8196-205.
- Cracowski JL, Devillier P, Chavanon O, Sietchiping-Nzema FA, Stanke-Labesque F, Bessard G. Isoprostaglandin E2 type-III (8-iso-prostaglandin E2) evoked contractions in the human internal mammary artery. *Life Sci*. 2001;68(21):2405-13.
- Craige SM, Chen K, Pei Y, Li C, Huang X, Chen C, Shibata R, Sato K, Walsh K, Keaney JF Jr. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation*. 2011;124(6):731-40.
- Crisafulli C, Bruscoli S, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Genovese T, Bramanti P, Migliorati G, Cuzzocrea S. PPAR-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of 17beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(3):796-807.
- Cui P, Tani K, Kitamura H, Okumura Y, Yano M, Inui D, Tamaki T, Sone S, Kido H. A novel bioactive 31-amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol*. 2001;70(2):306-12.
- Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, Sorescu D. NADPHoxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*. 2005;97(9):900-7.
- Dange RB, Agarwal D, Teruyama R, Francis J. Toll-like receptor 4 inhibition within the paraventricular nucleus attenuates blood pressure and inflammatory response in a genetic model of hypertension. *J Neuroinflammation*. 2015;12:31.
- Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):219-26.
- Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res*. 2001;89(8):650-60.
- Davies C, Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(1):85-9.

- Deacon K, Knox AJ. Endothelin-1 (ET-1) increases the expression of remodeling genes in vascular smooth muscle through linked calcium and cAMP pathways: role of a phospholipase A<sub>2</sub>(cPLA<sub>2</sub>)/cyclooxygenase-2 (COX-2)/prostacyclin receptor-dependent autocrine loop. *J Biol Chem.* 2010;285(34):25913-27.
- Dean JL, Brook M, Clark AR, Saklatvala J. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem.* 1999;274(1):264-9.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res.* 1999;85(5):394-402.
- de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(24):9797-800.
- Desjardins F, Aubin MC, Carrier M, Perrault LP. Decrease of endothelin receptor subtype ETB and release of COX-derived products contribute to endothelial dysfunction of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(6):499-508.
- de Souza Rossignoli P, Pereira OC, Chies AB. Orchidectomy enhances the effects of phenylephrine in rat isolated portal vein. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(3):368-74.
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med.* 2001;193(7):827-38.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999;20(5):649-88.
- Dewachter C, Belhaj A, Rondelet B, Vercruyssen M, Schraufnagel DP, Rimmelink M, Brimiouille S, Kerbaul F, Naeije R, Dewachter L. Myocardial inflammation in experimental acute right ventricular failure: Effects of prostacyclin therapy. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34(10):1334-45.
- Dhar I, Dhar A, Wu L, Desai KM. Increased methylglyoxal formation with upregulation of renin angiotensin system in fructose fed Sprague Dawley rats. *PLoS One.* 2013;8(9):e74212.
- Diep QN, Schiffrin EL. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001;38(2):249-54.
- Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Viridis A, Neves MF, Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation.* 2002;105(19):2296-302.
- Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of NOX-1 and NOX-4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(9):1340-51.
- Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1289-301.
- Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martín A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK. NOX-1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation.* 2005;112(17):2668-76.
- Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, Harrison DG, Dikalov SI. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res.* 2010;107(1):106-16.

- Di Mari JF, Saada JJ, Mifflin RC, Valentich JD, Powell DW. HETEs enhance IL-1-mediated COX-2 expression via augmentation of message stability in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(4):G719-28.
- Dimitropoulou C, White RE, Fuchs L, Zhang H, Catravas JD, Carrier GO. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. *Hypertension.* 2001;37(2):301-7.
- Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 2000;90(1-3):19-25.
- Dohi Y, Ohashi M, Sugiyama M, Takase H, Sato K, Ueda R. Candesartan reduces oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Hypertens Res.* 2003;26(9):691-7.
- Doi Y, Kudo H, Nishino T, Yamamoto O, Nagata T, Nara S, Morita M, Fujimoto S. Enhanced expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in acute hypoxic rat aorta. *Histol Histopathol.* 2002;17(1):97-105.
- Doi Y, Kudo H, Nishino T, Nagata T, Fujimoto S. The enhancement of preproendothelin-1 synthesis and the acceleration of endothelin-1 processing in the acute hypoxic rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44 Suppl 1:S207-10.
- Doller A, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell.* 2007;18(6):2137-48.
- Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murray GD, Styk E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkely K, Golay A, Heine RJ, Korányi L, Laakso M, Mokán M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Scherthner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J; PROactive investigators. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9493):1279-89.
- Doroudi R, Gan LM, Selin Sjögren L, Jern S. Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269(1):257-64.
- Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2008;102(4):488-96.
- Dovinová I, Barancik M, Majzunova M, Zorad S, Gajdosechová L, Gresová L, Cacanyiova S, Kristek F, Balis P, Chan JY. Effects of PPAR  $\gamma$  Agonist Pioglitazone on Redox-Sensitive Cellular Signaling in Young Spontaneously Hypertensive Rats. *PPAR Res.* 2013;2013:541871.
- Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(6):453-71.
- Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(2):128-33.
- Ducancel F. Endothelin-like peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(23):2828-39.
- Duez H, Chao YS, Hernyez M, Torpier G, Poulain P, Mundt S, Mallat Z, Teissier E, Burton CA, Tedgui A, Fruchart JC, Fiévet C, Wright SD, Staels B. Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48051-7.
- Duque J, Díaz-Muñoz MD, Fresno M, Iñiguez MA. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in colon carcinoma cells. *Cell Signal.* 2006;18(8):1262-9.
- Edwards JD, McGregor PE, Dovgan PS, Agrawal DK. Effect of endothelin-1 on arterial response to Bay K 8644. A comparison of ischemic and nonischemic arteries. *Life Sci.* 1995;57(3):225-34.

- El-Gowilly SM, Helmy MM, El-Gowell HM. Pioglitazone ameliorates methotrexate-induced renal endothelial dysfunction via amending detrimental changes in some antioxidant parameters, systemic cytokines and Fas production. *Vascul Pharmacol*. 2015. pii: S1537-1891(15)00151-2.
- Elmarakby AA, Loomis ED, Pollock JS, Pollock DM. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension*. 2005;45(2):283-7.
- Ergul S, Parish DC, Puett D, Ergul A. Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension*. 1996;28(4):652-5. Erratum in: *Hypertension* 1997;29(3):912.
- Evans NJ, Walker JW. Sustained Ca<sup>2+</sup> signaling and delayed internalization associated with endothelin receptor heterodimers linked through a PDZ finger. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(8):526-35.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18779-89.
- Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1367-73.
- Fecteau MH, Honoré JC, Plante M, Labonté J, Rae GA, D'Orléans-Juste P. Endothelin-1 (1-31) is an intermediate in the production of endothelin-1 after big endothelin-1 administration in vivo. *Hypertension*. 2005;46(1):87-92.
- Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(3):H985-1002.
- Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;156(4):563-74.
- Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol*. 2011;164(3):894-912.
- Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1669-75.
- Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2281-90.
- Fiebeler A, Schmidt F, Müller DN, Park JK, Dechend R, Bieringer M, Shagdarsuren E, Breu V, Haller H, Luft FC. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):787-93.
- Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, Nicklin SA. Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertension*. 2012;59(2):300-7.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell*. 1995;83(5):803-12.
- Fruchart JC, Staels B, Duriez P. The role of fibric acids in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3(1):83-92.
- Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Tanaka T, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Hosoda K, Kook H, Ueda M, Nakao K. Thiazolidinediones, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists, regulate endothelial cell growth and secretion of vasoactive peptides. *Atherosclerosis*. 2001;158(1):113-9.
- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(3):1461-5.
- Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008;264(3):224-36.

- Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92(4):361-5.
- Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A<sub>2</sub> production. *Br J Pharmacol*. 2001;134(8):1639-46.
- Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 2003;138(6):1085-92.
- Garcia-Cohen EC, Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodriguez-Martinez MA. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;293(1):75-81.
- García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AE, Alonso MJ, Simonsen U, Salaices M. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(1):19-27.
- García-Villalón AL, Buchholz JN, Duckles SP, Krause DN. Noradrenaline content and release in male and female rat tail arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;29(1):93-6.
- García-Villalón AL, Monge L, Fernández N, Sánchez MA, Martínez MA, Gómez B, Diéguez G. Impaired potentiation by endothelin-1 and vasopressin of sympathetic contraction in tail artery from hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2000;45(2):463-9.
- García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*. 2008;48(2-3):109-14.
- Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B. Fibrates increase human REV-ERB $\alpha$  expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol*. 1999;13(3):400-9.
- Giachini FR, Callera GE, Carneiro FS, Tostes RC, Webb RC. Therapeutic targets in hypertension: is there a place for antagonists of the most potent vasoconstrictors? *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(3):327-39.
- Giampietro L, D'Angelo A, Giancristofaro A, Ammazalorso A, De Filippis B, Fantacuzzi M, Linciano P, Maccallini C, Amoroso R. Synthesis and structure-activity relationships of fibrate-based analogues inside PPARs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(24):7662-6.
- Giannesi D, Del Ry S, Vitale RL. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res*. 2001;43(2):111-26.
- Gianni D, Diaz B, Taulet N, Fowler B, Courtneidge SA, Bokoch GM. Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (NOX-1) activity. *Sci Signal*. 2009;2(88):ra54.
- Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol*. 2002;16(12):2793-801.
- Gisser JM, Cohen AR, Yin H, Garipey CE. A novel bidirectional interaction between endothelin-3 and retinoic acid in rat enteric nervous system precursors. *PLoS One*. 2013;8(9):e74311.
- Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Félétou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 2005;146(6):834-45.
- Goel R, Bhat SA, Rajasekar N, Hanif K, Nath C, Shukla R. Hypertension exacerbates predisposition to neurodegeneration and memory impairment in the presence of a neuroinflammatory stimulus: Protection by angiotensin converting enzyme inhibition. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015;133:132-45.
- Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, Kintscher U, Stawowy P, Blaschke F, Graf K, Law RE, Fleck E, Gräfe M. PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(5):1431-7.

- Gomez E, Schwendemann C, Roger S, Simonet S, Paysant J, Courchay C, Verbeuren TJ, Félétou M. Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(5):H2198-211.
- Gondré M, Christ GJ. Endothelin-1-induced alterations in phenylephrine-induced contractile responses are largely additive in physiologically diverse rabbit vasculature. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(2):635-42.
- González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol*. 2014;6(6):353-66.
- Gössl M, Mitchell A, Lerman A, Opazo Saez A, Schäfers RF, Erbel R, Philipp T, Wenzel RR. Endothelin-B-receptor-selective antagonist inhibits endothelin-1 induced potentiation on the vasoconstriction to noradrenaline and angiotensin II. *J Hypertens*. 2004;22(10):1909-16.
- Goto K, Hama H, Kasuya Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol*. 1996;72(4):261-90.
- Granstam E, Wang L, Bill A. Effects of endothelins (ET-1, ET-2 and ET-3) in the rabbit eye; role of prostaglandins. *Eur J Pharmacol*. 1991;194(2-3):217-23.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2175-83.
- Griendling KK. Novel NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Heart*. 2004;90(5):491-3.
- Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*. 2014;13:17.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NADPH oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(14):1656-62.
- Guzik TJ, Chen W, Gongora MC, Guzik B, Lob HE, Mangalat D, Hoch N, Dikalov S, Rudzinski P, Kapelak B, Sadowski J, Harrison DG. Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(22):1803-9.
- Haak T, Jungmann E, Felber A, Hillmann U, Usadel KH. Increased plasma levels of endothelin in diabetic patients with hypertension. *Am J Hypertens*. 1992;5(3):161-6.
- Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Bühler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul*. 1990;1(9):649-59.
- Hajjar IM, George V, Sasse EA, Kochar MS. A randomized, double-blind, controlled trial of vitamin C in the management of hypertension and lipids. *Am J Ther*. 2002;9(4):289-93.
- Hammoud RA, Vaccari CS, Nagamia SH, Khan BV. Regulation of the renin-angiotensin system in coronary atherosclerosis: a review of the literature. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):937-45.
- Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R, Vane JR. Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(14):6344-8.
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*. 2002;33(6):774-97.
- Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18(18):2195-224.
- Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet*. 1994;344(8926):852-4.
- Haynes WG, Hand MF, Johnstone HA, Padfield PL, Webb DJ. Direct and sympathetically mediated venoconstriction in essential hypertension. Enhanced responses to endothelin-1. *J Clin Invest*. 1994;94(4):1359-64.

- Heagerty AM, Heerkens EH, Izzard AS. Small artery structure and function in hypertension. *J Cell Mol Med.* 2010;14(5):1037-43.
- Hempelmann RG, Pradel RH, Mehdorn HM, Ziegler A. Threshold concentrations of endothelin-1: the effects on contractions induced by 5-hydroxytryptamine in isolated rat cerebral and mesenteric arteries. *Pharmacol Toxicol.* 1999;85(3):115-22.
- Henrion D, Laher I. Potentiation of norepinephrine-induced contractions by endothelin-1 in the rabbit aorta. *Hypertension.* 1993;22(1):78-83.
- Hernanz R, Alonso MJ, Briones AM, Vila E, Simonsen U, Salaices M. Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* 2003;140(4):671-80.
- Hernanz R, Briones AM, Alonso MJ, Vila E, Salaices M. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(1):H225-34.
- Hernanz R, Martín Á, Pérez-Girón JV, Palacios R, Briones AM, Miguel M, Salaices M, Alonso MJ. Pioglitazone treatment increases COX-2-derived prostacyclin production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. *Br J Pharmacol.* 2012;166(4):1303-19.
- Hernanz R, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(2):111-21.
- Hernanz R, Martínez-Revelles S, Palacios R, Martín A, Cachofeiro V, Aguado A, García-Redondo L, Barrús MT, de Batista PR, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Br J Pharmacol.* 2015;172(12):3159-76.
- Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Fukuda Y, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am J Hypertens.* 2002;15(4 Pt 1):326-32.
- Higashi Y, Maruhashi T, Noma K, Kihara Y. Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc Med.* 2014;24(4):165-9
- Hiyama TY, Yoshida M, Matsumoto M, Suzuki R, Matsuda T, Watanabe E, Noda M. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na(x), the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. *Cell Metab.* 2013;17(4):507-19.
- Hocher B, Rohmeiss P, Zart R, Diekmann F, Vogt V, Metz D, Fakhury M, Gretz N, Bauer C, Koppenhagen K, Neumayer HH, Distler A. Function and expression of endothelin receptor subtypes in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1996;31(4):499-510.
- Hoffman A, Grossman E, Goldstein DS, Gill JR Jr, Keiser HR. Urinary excretion rate of endothelin-1 in patients with essential hypertension and salt sensitivity. *Kidney Int.* 1994;45(2):556-60.
- Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH, Yen MH. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001;38(5):1044-8.
- Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2004;61(1):159-68.
- Horiuchi M, Iwanami J, Mogi M. Regulation of angiotensin II receptors beyond the classical pathway. *Clin Sci (Lond).* 2012;123(4):193-203.
- Hou X, Zhang Y, Shen YH, Liu T, Song S, Cui L, Bu P. PPAR- $\gamma$  activation by rosiglitazone suppresses angiotensin II-mediated proliferation and phenotypic transition in cardiac fibroblasts via inhibition of activation of activator protein 1. *Eur J Pharmacol.* 2013;715(1-3):196-203.

- Hsieh HL, Lin CC, Chan HJ, Yang CM, Yang CM. c-Src-dependent EGF receptor transactivation contributes to ET-1-induced COX-2 expression in brain microvascular endothelial cells. *J Neuroinflammation*. 2012;9:152.
- Hu RM, Chuang MY, Prins B, Kashyap ML, Frank HJ, Pedram A, Levin ER. High density lipoproteins stimulate the production and secretion of endothelin-1 from cultured bovine aortic endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994;93(3):1056-62.
- Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(2):563-73.
- Huang Y, Zhang H, Shao Z, O'Hara KA, Kopilas MA, Yu L, Netticadan T, Yerson HD. Suppression of endothelin-1-induced cardiac myocyte hypertrophy by PPAR agonists: role of diacylglycerol kinase zeta. *Cardiovasc Res*. 2011;90(2):267-75.
- Humphreys MH, Reid IA, Ufferman RC, Lieberman RA, Earley LE. The relationship between sodium excretion and renin secretion by the perfused kidney. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975;150(3):728-34.
- Iglarz M, Clozel M. At the heart of tissue: endothelin system and end-organ damage. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119(11):453-63.
- Iglarz M, Steiner P, Wanner D, Rey M, Hess P, Clozel M. 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*. 2015;66(4):332-7.
- Ikejima H, Imanishi T, Tsuchioka H, Kuroi A, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Effect of pioglitazone on nitroglycerin-induced impairment of nitric oxide bioavailability by a catheter-type nitric oxide sensor. *Circ J*. 2008;72(6):998-1002.
- Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension*. 1992;19(6 Pt 2):753-7.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(8):2863-7.
- Ishihara Y, Sekine M, Hatano A, Shimamoto N. Sustained contraction and endothelial dysfunction induced by reactive oxygen species in porcine coronary artery. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(9):1667-72.
- Ishizuka T, Niwa A, Tabuchi M, Nagatani Y, Ooshima K, Higashino H. Involvement of thromboxane A2 receptor in the cerebrovascular damage of salt-loaded, stroke-prone rats. *J Hypertens*. 2007;25(4):861-70.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-50.
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3521-5.
- Jaimes EA, Zhou MS, Pearse DD, Puzis L, Rajj L. Upregulation of cortical COX-2 in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II and reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(2):F385-92.
- James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Hoyer J, Lackly DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, Smith SC Jr, Svetkey LP, Taler SJ, Townsend RR, Wright JT Jr, Narva AS, Ortiz E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311(5):507-20.
- Jiang J, Tran L, Vasudevan H, Xia Z, Yuen VG, McNeill JH. Endothelin-1 blockade prevents COX2 induction and TXA2 production in the fructose hypertensive rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(3-4):422-9.
- Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(1):42-52.
- Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*. 2005;26(4-5):340-52.

- Juraschek SP, Guallar E, Appel LJ, Miller ER 3rd. Effects of vitamin C supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(5):1079-88.
- Kamata K, Kanie N, Matsumoto T, Kobayashi T. Endothelin-1-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in aortas isolated from controls and diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44 Suppl 1:S186-90.
- Kang BY, Kleinhenz JM, Murphy TC, Hart CM. The PPAR $\gamma$  ligand rosiglitazone attenuates hypoxia-induced endothelin signaling in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;301(6):L881-91.
- Karaa A, Kamoun WS, Xu H, Zhang J, Clemens MG. Differential effects of oxidative stress on hepatic endothelial and Kupffer cell eicosanoid release in response to endothelin-1. *Microcirculation.* 2006;13(6):457-66.
- Karlberg BE. Adrenergic regulation of renin release and effects on angiotensin and aldosterone. *Acta Med Scand Suppl.* 1983;672:33-40.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem.* 1993;268(25):19126-33.
- Katada J, Majima M. AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol.* 2002;136(4):484-91.
- Kaufman LN, Peterson MM, DeGrange LM. Pioglitazone attenuates diet-induced hypertension in rats. *Metabolism.* 1995;44(9):1105-9.
- Ketsawatsomkron P, Pelham CJ, Groh S, Keen HL, Faraci FM, Sigmund CD. Does peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR gamma) protect from hypertension directly through effects in the vasculature? *J Biol Chem.* 2010;285(13):9311-6.
- Ketsawatsomkron P, Lorca RA, Keen HL, Weatherford ET, Liu X, Pelham CJ, Grobe JL, Faraci FM, Engly SK, Sigmund CD. PPAR $\gamma$  regulates resistance vessel tone through a mechanism involving RGS5-mediated control of protein kinase C and BKCa channel activity. *Circ Res.* 2012;111(11):1446-58.
- Khalil RA. Modulators of the vascular endothelin receptor in blood pressure regulation and hypertension. *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4(3):176-86.
- Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol.* 1998;26(5):612-20.
- Khimji AK, Rockey DC. Endothelin--biology and disease. *Cell Signal.* 2010;22(11):1615-25.
- Kida T, Sawada K, Kobayashi K, Hori M, Ozaki H, Murata T. Diverse effects of prostaglandin E $_2$  on vascular contractility. *Heart Vessels.* 2014;29(3):390-5.
- Kintscher U, Law RE. PPAR $\gamma$ -mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(2):E287-91.
- Kisanuki YY, Emoto N, Ohuchi T, Widyantoro B, Yagi K, Nakayama K, Kedzierski RM, Hammer RE, Yanagisawa H, Williams SC, Richardson JA, Suzuki T, Yanagisawa M. Low blood pressure in endothelial cell-specific endothelin 1 knockout mice. *Hypertension.* 2010;56(1):121-8.
- Kleinhenz JM, Kleinhenz DJ, You S, Ritzenthaler JD, Hansen JM, Archer DR, Sutliff RL, Hart CM. Disruption of endothelial peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reduces vascular nitric oxide production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(5):H1647-54.
- Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(15):7355-9.
- Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J $_2$  metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 1995;83(5):813-9.

- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007;59(3):251-87
- Kodama H, Fukuda K, Takahashi E, Tahara S, Tomita Y, Ieda M, Kimura K, Owada KM, Vuori K, Ogawa S. Selective involvement of p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src in endothelin-1-induced JNK activation. *Hypertension.* 2003;41(6):1372-9.
- Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev.* 2011;91(1):1-77.
- Kondeti V, Al-Azzam N, Duah E, Thodeti CK, Boyce JA, Paruchuri S. Leukotriene D<sub>4</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> signals synergize and potentiate vascular inflammation in a mast cell-dependent manner through cysteinyl leukotriene receptor 1 and E-prostanoid receptor 3. *J Allergy Clin Immunol.* 2015. pii: S0091-6749(15)00912-4.
- Kong X, Zhang Y, Wu HB, Li FX, Zhang DY, Su Q. Combination therapy with losartan and pioglitazone additively reduces renal oxidative and nitrative stress induced by chronic high fat, sucrose, and sodium intake. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:856085.
- Kong X, Ma MZ, Qin L, Zhang Y, Li XY, Wang GD, Su Q, Zhang DY. Pioglitazone enhances the blood pressure-lowering effect of losartan via synergistic attenuation of angiotensin II-induced vasoconstriction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014;15(3):259-70.
- Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):85-94.
- Krattinger N, Alonso F, Capponi A, Mazzolai L, Nicod P, Meda P, Haefliger JA. Increased expression of renal cyclooxygenase-2 and neuronal nitric oxide synthase in hypertensive Cx40-deficient mice. *J Vasc Res.* 2009;46(3):188-98.
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol.* 1997;11(6):779-91.
- Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlton V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *Bosentan Hypertension Investigators. N Engl J Med.* 1998;338(12):784-90.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.* 1986;59(6):612-9.
- Kurlak LO, Green A, Loughna P, Broughton Pipkin F. Oxidative stress markers in hypertensive states of pregnancy: preterm and term disease. *Front Physiol.* 2014;5:310.
- Kurosaka M, Suzuki T, Hosono K, Kamata Y, Fukamizu A, Kitasato H, Fujita Y, Majima M. Reduced angiogenesis and delay in wound healing in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *Biomed Pharmacother.* 2009;63(9):627-34.
- Lacy F, Gough DA, Schmid-Schönbein GW. Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(6):720-7.
- Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001;12(6):455-61.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holly SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1201-9.
- Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, Mueller M, Drexler H. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):943-8.
- Laplante MA, Wu R, Moreau P, de Champlain J. Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(5):589-96.

- Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: NOX-1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 2001;88(9):888-94.
- Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2012;110(10):1364-90.
- Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001;103(9):1282-8.
- Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;101(11):1311-8.
- Lee DL, Webb RC, Jin L. Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension.* 2004;44(6):796-9.
- Lee HK, Jeong S. Beta-Catenin stabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by interacting with AU-rich elements of 3'-UTR. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(19):5705-14.
- Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1045-59.
- Lee IT, Yang CM. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(5):581-90.
- Lee DY, Wauquier F, Eid AA, Roman LJ, Ghosh-Choudhury G, Khazim K, Block K, Gorin Y. NOX-4 NADPH oxidase mediates peroxynitrite-dependent uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase and fibronectin expression in response to angiotensin II: role of mitochondrial reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2013;288(40):28668-86.
- Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 2006;116(3):571-80.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995;270(22):12953-6.
- Lemberger T, Saladin R, Vázquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem.* 1996;271(3):1764-9.
- Lepailleur-Enouf D, Valdenaire O, Philippe M, Jyrot-Perrus M, Michel JB. Thrombin induces endothelin expression in arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(5):H1606-12.
- Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995;333(6):356-63
- Li JS, Larivière R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1994;24(2):183-8.
- Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol.* 2002;30(4):285-96.
- Li J, Li W, Liu W, Altura BT, Altura BM. Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 2004;499(1-2):171-8.
- Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T, Förstermann U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(12):2536-44.
- Li YB, Han JY, Jiang W, Wang J. Selenium inhibits high glucose-induced cyclooxygenase-2 and P-selectin expression in vascular endothelial cells. *Mol Biol Rep.* 2011;38(4):2301-6.

- Li MW, Mian MO, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(10):2306-15.
- Li YH, Xu Q, Xu WH, Guo XH, Zhang S, Chen YD. Mechanisms of protection against diabetes-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation by Tanshinone IIA. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(4):813-23.
- Lin CC, Hsieh HL, Shih RH, Chi PL, Cheng SE, Yang CM. Up-regulation of COX-2/PGE2 by endothelin-1 via MAPK-dependent NF- $\kappa$ B pathway in mouse brain microvascular endothelial cells. *Cell Commun Signal.* 2013;11(1):8.
- Lin CC, Hsieh HL, Chi PL, Yang CC, Hsiao LD, Yang CM. Upregulation of COX-2/PGE2 by ET-1 mediated through Ca<sup>2+</sup>-dependent signals in mouse brain microvascular endothelial cells. *Mol Neurobiol.* 2014;49(3):1256-69.
- Liu Y, Tian XY, Huang Y, Wang N. Rosiglitazone Attenuated Endothelin-1-Induced Vasoconstriction of Pulmonary Arteries in the Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension via Differential Regulation of ET-1 Receptors. *PPAR Res.* 2014;374075.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Llorens S, Mendizabal Y, Nava E. Effects of pioglitazone and rosiglitazone on aortic vascular function in rat genetic hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2007;575(1-3):105-12.
- Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol.* 1993;264(4 Pt 1):L406-12.
- Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(3):1058-64.
- Lopes LR, Dagher MC, Gutierrez A, Young B, Bouin AP, Fuchs A, Babior BM. Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry.* 2004;43(12):3723-30.
- Lorenz M, Wilck N, Meiners S, Ludwig A, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Proteasome inhibition prevents experimentally-induced endothelial dysfunction. *Life Sci.* 2009;84(25-26):929-34.
- Louis S, Saward L, Zahradka P. Both AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors mediate proliferation and migration of porcine vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(3):H746-56.
- Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol.* 2005;175(8):5423-9.
- Lu X, Murphy TC, Nanes MS, Hart CM. PPAR $\gamma$  regulates hypoxia-induced NOX-4 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells through NF- $\kappa$ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(4):L559-66.
- Lu Y, Ma D, Xu W, Shao S, Yu X. Effect and cardiovascular safety of adding rosiglitazone to insulin therapy in type 2 diabetes: A meta-analysis. *J Diabetes Investig.* 2015;6(1):78-86.
- Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H. Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension.* 1999;33(1 Pt 2):212-8.
- Luttrell DK, Luttrell LM. Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene.* 2004;23(48):7969-78.
- Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:269-80.

- Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1(1-31), in human mammary and coronary arteries in vitro. *Br J Pharmacol.* 2001;134(6):1360-6.
- Maguire JJ, Davenport AP. Endothelin receptors and their antagonists. *Semin Nephrol.* 2015;35(2):125-36.
- Mahaffey KW, Hafley G, Dickerson S, Burns S, Tourt-Uhlig S, White J, Newby LK, Komajda M, McMurray J, Bigelow R, Home PD, Lopes RD. Results of a reevaluation of cardiovascular outcomes in the RECORD trial. *Am Heart J.* 2013;166(2):240-249.
- Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JY. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci.* 2013;20:69.
- Malik RA, Schofield IJ, Izzard A, Austin C, Bermann G, Heagerty AM. Effects of angiotensin type-1 receptor antagonism on small artery function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Hypertension.* 2005;45(2):264-9.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press.* 2014;23(1):3-16.
- Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M, Simionescu M. AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):878-85.
- Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, NOX-1 and NOX-4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(4):901-7.
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(7):367-74.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol.* 1995;15(4):279-307.
- Marrachelli VG, Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Alborch E. Contribution of endothelin receptors and cyclooxygenase-derivatives to the altered response of the rabbit renal artery to endothelin-1 in diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2006;534(1-3):178-86.
- Martín A, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Palacios R, Briones AM, Fortuño A, Zalba G, Salaices M, Alonso MJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J Hypertens.* 2012;30(2):315-26.
- Martin-Nizard F, Furman C, Delerive P, Kyoussi A, Fruchart JC, Staels B, Duriez P. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 secretion in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;40(6):822-31.
- Martinez-Lemus LA, Galiñanes EL. Matrix metalloproteinases and small artery remodeling. *Drug Discov Today Dis Models.* 2011;8(1):21-28.
- Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(1):51-65.
- Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol.* 2000;164(12):6503-8.
- Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res.* 1998;39(3):530-3.

- Masuo Y, Ishikawa Y, Kozakai T, Uchide T, Komatsu Y, Saida K. Vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 gene expression in the murine central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(3):661-8.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1521-30.
- Matrougui K, Loufrani L, Heymes C, Lévy BI, Henrion D. Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension.* 1999;34(4 Pt 1):659-65.
- Mathiassen ON, Buus NH, Sihm I, Thybo NK, Mørn B, Schroeder AP, Thygesen K, Aalkjaer C, Lederballe O, Mulvany MJ, Christensen KL. Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens.* 2007;25(5):1021-6.
- Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K. Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(7):993-1007.
- Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Relationships among ET-1, PPARgamma, oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic animals. *J Smooth Muscle Res.* 2008;44(2):41-55
- Matsumoto T, Ishida K, Nakayama N, Kobayashi T, Kamata K. Involvement of NO and MEK/ERK pathway in enhancement of endothelin-1-induced mesenteric artery contraction in later-stage type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(5):H1388-97.
- Matsumura Y, Kita S, Okui T. Potentiation by endothelin-1 of vasoconstrictor response in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2001;415(1):45-9.
- Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C. NOX-1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in NOX-1-deficient mice. *Circulation.* 2005;112(17):2677-85.
- McGuire DK, Winterfield JR, Rytlewski JA, Ferrannini E. Blocking the renin-angiotensin-aldosterone system to prevent diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2008;5(1):59-66.
- McKinney CA, Fattah C, Loughrey CM, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(12):815-27.
- Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppänen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet.* 2007;3(4):e64.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C82-97.
- Mencarelli M, Pecorelli A, Carbotti P, Valacchi G, Grasso G, Muscettola M. Endothelin receptor A expression in human inflammatory cells. *Regul Pept.* 2009;158(1-3):1-5.
- Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. Hydrogen peroxide mediates interleukin-1beta-induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol.* 2003;19(4):203-14.
- Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Müller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten D, Luft FC. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension.* 2001;37(2 Pt 2):414-8.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):726-41
- Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Seta F, Capone ML, Tacconelli S, Degan M, Faccini G, Fornasiero A, Talamini G, Tommasoli R, Arosio E, Santonastaso CL, Lechi A, Patrono C. Determinants of platelet activation in human essential hypertension. *Hypertension.* 2004;43(1):64-70.

- Mistry M, Nasjletti A. Contrasting effect of thromboxane synthase inhibitors and a thromboxane receptor antagonist on the development of angiotensin II-salt-induced hypertension in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253(1):90-4
- Miura K, Yukimura T, Yamashita Y, Shimmen T, Okumura M, Yamanaka S, Imanishi M, Yamamoto K. Renal and femoral vascular responses to endothelin-1 in dogs: role of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;256(1):11-7.
- Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:391-415.
- Mizuguchi T, Nishiyama M, Moroi K, Tanaka H, Saito T, Masuda Y, Masaki T, de Wit D, Yanagisawa M, Kimura S. Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br J Pharmacol.* 1997;120(8):1427-30.
- Montagnani M, Potenza MA, Rinaldi R, Mansi G, Nacci C, Serio M, Vulpis V, Pirrelli A, Mitolo-Chieppa D. Functional characterization of endothelin receptors in hypertensive resistance vessels. *J Hypertens.* 1999;17(1):45-52.
- Montanari A, Biggi A, Carra N, Ziliotti M, Fasoli E, Musiari L, Perinotto P, Novarini A. Endothelin-A receptors mediate renal hemodynamic effects of exogenous Angiotensin II in humans. *Hypertension.* 2003;42(4):825-30.
- Montezano AC, Amiri F, Tostes RC, Touyz RM, Schiffrin EL. Inhibitory effects of PPAR-gamma on endothelin-1-induced inflammatory pathways in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *J Am Soc Hypertens.* 2007;1(2):150-60.
- Montezano AC, Burger D, Paravicini TM, Chignalia AZ, Yusuf H, Almasri M, He Y, Callera GE, He G, Krause KH, Lambeth D, Quinn MT, Touyz RM. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, rac-1-independent pathways in human endothelial cells. *Circ Res.* 2010;106(8):1363-73.
- Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol.* 2015;31(5):631-41.
- Moran JP, Cohen L, Greene JM, Xu G, Feldman EB, Hames CG, Feldman DS. Plasma ascorbic acid concentrations relate inversely to blood pressure in human subjects. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(2):213-7.
- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19-26.
- Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012;110(1):49-55.
- Münter K, Kirchengast M. The role of endothelin receptor antagonists in cardiovascular pharmacotherapy. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2001;6(1):3-11.
- Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1551-7.
- Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2008;40(3):180-96.
- Muñoz M, Sánchez A, Pilar Martínez M, Benedito S, López-Oliva ME, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats. *Free Radic Biol Med.* 2015;84:77-90.
- Murphy TJ, Alexy RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature.* 1991;351(6323):233-6
- Muzaffar S, Shukla N, Lobo C, Angelini GD, Jeremy JY. Iloprost inhibits superoxide formation and gp91phox expression induced by the thromboxane A2 analogue U46619, 8-isoprostane F2alpha, prostaglandin F2alpha, cytokines and endotoxin in the pig pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 2004;141(3):488-96.

- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93(2):229-40.
- Nakamura T, Sakamoto K. Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(1):203-10.
- Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. *Stroke*. 2007;38(11):3016-22.
- Nakao N, Kurokawa T, Nonami T, Tumurkhuu G, Koide N, Yokochi T. Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor-alpha in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate Immun*. 2008;14(3):190-6.
- Nakayama K, Ishigai Y, Uchida H, Tanaka Y. Potentiation by endothelin-1 of 5-hydroxytryptamine-induced contraction in coronary artery of the pig. *Br J Pharmacol*. 1991;104(4):978-86.
- Nakov R, Pfarr E, Eberle S; HEAT Investigators. Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens*. 2002;15(7 Pt 1):583-9.
- Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Den Hond E, Thijs L, Fagard RH, Dominiczak AF, Struijker-Boudier HA. Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. *Eur Heart J*. 2007;28(5):628-33.
- Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(8):1245-50.
- Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides*. 2011;32(10):2141-50.
- Nieminen R, Leinonen S, Lahti A, Vuolteenaho K, Jalonen U, Kankaanranta H, Goldring MB, Moilanen E. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(5):249-55.
- Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med*. 2010;170(14):1191-1201.
- Ocaranza MP, Lavyero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, Apablaza F, Gonzalez L, Heryez C, Varas M, Lopez R, Godoy I, Verdejo H, Chiong M. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens*. 2010;28(5):1054-64.
- Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension. *Curr Drug Targets*. 2014;15(2):164-74.
- On YK, Kim CH, Sohn DW, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS. Improvement of endothelial function by amlodipine and vitamin C in essential hypertension. *Korean J Intern Med*. 2002;17(2):131-7.
- Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 1):68-75.
- Oyekan A, Balazy M, McGiff JC. Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol*. 1997;273(1 Pt 2):R293-300.
- Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48403-9.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S170-80.
- Park KG, Lee KM, Chang YC, Magae J, Yo K, Kim KB, Kim YN, Kim HS, Park JY, Lee KU, Lee IK. The ascochlorin derivative, AS-6, inhibits TNF-alpha-induced adhesion molecule and chemokine expression in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 2006;80(2):120-6.
- Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation*. 2000;101(3):235-8.

- Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005;437(7059):759-63.
- Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):850-3.
- Paumelle R, Blanquart C, Briand O, Barbier O, Duhem C, Woerly G, Percevault F, Fruchart JC, Dombrowicz D, Glineur C, Staels B. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*. 2006;98(3):361-9.
- Pedraza-Chaverri J, Ibarra-Rubio ME, Cruz C, Tapia E. Intracellular messengers in the regulation of renin secretion. *Rev Invest Clin*. 1989;41(2):165-75.
- Pendyala S, Natarajan V. Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;174(3):265-71.
- Peng H, Chen P, Cai Y, Chen Y, Wu QH, Li Y, Zhou R, Fang X. Endothelin-1 increases expression of cyclooxygenase-2 and production of interleukin-8 in human pulmonary epithelial cells. *Peptides*. 2008;29(3):419-24.
- Peraza MA, Burdick AD, Marin HE, Gonzalez FJ, Peters JM. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicol Sci*. 2006;90(2):269-95.
- Pérez-Girón JV. Regulación por PPAR $\gamma$  de la expresión vascular de COX-2 asociada a la respuesta inflamatoria con la hipertensión. Tesis Doctoral 2009.
- Pérez-Vizcaíno F, Cogolludo A, Tamargo J. Fármacos vasodilatadores. Antagonistas de los canales de calcio. Fármacos antihipertensivos. En Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Moro Sánchez MA, Portolés Pérez A. (coords) Velázquez. *Farmacología Básica and Clínica* (18th ed.) Editorial Panamericana. 2009: 419-439.
- Peredo HA, Mayer MA, Carranza A, Puyó AM. Pioglitazone and losartan modify hemodynamic and metabolic parameters and vascular prostanoids in fructose-overloaded rats. *Clin Exp Hypertens*. 2008;30(2):159-69.
- Peskar BM. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. *Inflammopharmacology*. 2005;13(1-3):15-26.
- Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*. 2000;20(14):5119-28.
- Pinet F, Mizrahi J, Laboulyne I, Menard J, Corvol P. Regulation of prorenin secretion in cultured human transfected juxtaglomerular cells. *J Clin Invest*. 1987;80(3):724-31.
- Polikryotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(9):1810-6.
- Pollock DM. Renal endothelin in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000;9(2):157-64.
- Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Quon MJ, Montagnani M. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. *Diabetes*. 2006;55(12):3594-603.
- Ptasinska A, Wang S, Zhang J, Wesley RA, Danner RL. Nitric oxide activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma through a p38 MAPK signaling pathway. *FASEB J*. 2007;21(3):950-61.
- Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*. 2000;49(9):1561-70.

- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. 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.* 1996;97(8):1916-23.
- Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension.* 1997;30(1 Pt 1):29-34.
- Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Sheshgiri R, Miriuka S, Delgado DH, Ross HJ. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I319-26.
- Randall MD, Douglas SA, Hiley CR. Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat. *Br J Pharmacol.* 1989;98(2):685-99.
- Ranta V, Orpana A, Mikkola T, Ylikorkala O, Viinikka L. Culturing of human vascular endothelial cells strongly affects their endothelin-1 and prostacyclin production. *Mol Cell Biochem.* 1997;177(1-2):251-5.
- Rao GN, Lassègue B, Alexy RW, Griending KK. Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J.* 1994;299 ( Pt 1):197-201.
- Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003;41(5):1096-101.
- Reichetzedder C, Tsuprykov O, Hoher B. Endothelin receptor antagonists in clinical research--lessons learned from preclinical and clinical kidney studies. *Life Sci.* 2014;118(2):141-8.
- Reimunde FM, Castañares C, Redondo-Horcajo M, Lamas S, Rodríguez-Pascual F. Endothelin-1 expression is strongly repressed by AU-rich elements in the 3'-untranslated region of the gene. *Biochem J.* 2005;387(Pt 3):763-72.
- Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):926-35.
- Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, Muiesan ML, Kozàková M, La Canna G, Nardi M, Guelfi D, Salvetti M, Morizzo C, Vittone F, Rosei EA. Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J Hypertens.* 2003;21(3):625-31.
- Rizzoni D, Agabiti-Rosei E. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern Emerg Med.* 2012;7(3):205-12.
- Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007a;21(2):111-27.
- Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Guichard C, Bächler JP. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens Res.* 2007b;30(12):1159-67.
- Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Bächler JP. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2008;114(10):6.
- Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers.* 2013;35(6):773-90.
- Rodríguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sánchez RM, Merlos M, Palomer X, Laguna JC, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes.* 2008;57(8):2149-57.
- Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaíces M, Marín J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol.* 1998;125(6):1329-35.
- Rodríguez-Pascual F, Busnadiego O, Lagares D, Lamas S. Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacol Res.* 2011;63(6):463-72.

- Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):78-85.
- Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res*. 1999;43(2):300-7.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:27-33.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(2):159-66.
- Russell A, Banes A, Berlin H, Fink GD, Watts SW. 5-Hydroxytryptamine(2B) receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-L-arginine hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(1):179-87.
- Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD. PPAR(gamma) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. *Hypertension*. 2004;43(3):661-6.
- Ryoo S, Won M, Kim DU, Kim L, Han G, Park SK, Mukaida N, Maeng P, Yoo HS, Hoe KL. PPARalpha activation abolishes LDL-stimulated IL-8 production via AP-1 deactivation in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(2):329-34.
- Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem*. 1989;264(25):14613-6.
- Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990;322(3):205.
- Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(1):3-7.
- Sakai S, Miyauchi T, Irukayama-Tomobe Y, Ogata T, Goto K, Yamaguchi I. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit endothelin-1-related cardiac hypertrophy in rats. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103 Suppl 48:16S-20S.
- San José G, Fortuño A, Moreno MU, Robador PA, Bidegain J, Varo N, Beloqui O, Díez J, Zalba G. The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide generation: potential implication in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(3):233-40.
- Sánchez A, Contreras C, Martínez P, Muñoz M, Martínez AC, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. Endothelin A (ET(A)) receptors are involved in augmented adrenergic vasoconstriction and blunted nitric oxide-mediated relaxation of penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *J Sex Med*. 2014a;11(6):1463-74.
- Sánchez A, Martínez P, Muñoz M, Benedito S, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: role of ET(A) and ET(B) receptors. *Br J Pharmacol*. 2014b;171(24):5682-95.
- Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(12):1733-44.
- Sandhu H, Xu CB, Edvinsson L. Upregulation of contractile endothelin type B receptors by lipid-soluble cigarette smoking particles in rat cerebral arteries via activation of MAPK. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;249(1):25-32.

- Santiago E, Contreras C, García-Sacristán A, Sánchez A, Rivera L, Climent B, Prieto D. Signaling pathways involved in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced vasoconstriction of rat coronary arteries. *Free Radic Biol Med.* 2013;60:136-46.
- Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediel E, de Las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, Lahera V, Cachofeiro V. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(1):H111-5.
- Sarkis A, Roman RJ. Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in hypertension. *Curr Drug Metab.* 2004;5(3):245-56.
- Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185(1):253-9.
- Sato A, Ebina K. Endothelin-3 at low concentrations attenuates inflammatory responses via the endothelin B2 receptor. *Inflamm Res.* 2013;62(4):417-24.
- Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo N, Kimura S, Watanabe T. Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(3):757-63.
- Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006;15(2):152-8.
- Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NADPHoxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res.* 2000;87(12):1195-201.
- Schiffrin EL, Thibault G. Plasma endothelin in human essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1991;4(4 Pt 1):303-8.
- Schiffrin EL, Sventek P, Li JS, Turgeon A, Reudelhuber T. Antihypertensive effect of an endothelin receptor antagonist in DOCA-salt spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1995a;115(8):1377-81.
- Schiffrin EL, Lariviere R, Touyz RM. ETA and ETB receptors on vascular smooth muscle cells from mesenteric vessels of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1995b;22(1):S193-4.
- Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P, Day R. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens.* 1997;15(1):57-63.
- Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 Suppl 3:S2-13.
- Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens.* 2001;14(6 Pt 2):83S-89S.
- Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(2):H435-46.
- Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2005;43(1):19-29.
- Schorlemmer A, Matter ML, Shohet RV. Cardioprotective signaling by endothelin. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18(7):233-9.
- Schroner Z, Javorsky M, Kozarova M, Tkac I. Pharmacogenetics of oral antidiabetic treatment. *Bratisl Lek Listy.* 2011;112(8):441-6.
- Schuler M, Ali F, Chambon C, Duteil D, Bornert JM, Tardivel A, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab.* 2006;4(5):407-14.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1115-26.
- Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(2):308-24.

- Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(2):122-7.
- Seno T, Hamaguchi M, Ashihara E, Kohno M, Ishino H, Yamamoto A, Kadoya M, Nakamura K, Murakami K, Matoba S, Maekawa T, Kawahito Y. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$  prostaglandin  $J_2$  reduces the formation of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *PLoS One*. 2011;6(10):e25541.
- Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Lüscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation*. 1994;89(3):1203-8.
- Shad MN, Zaheer Z, Kausar S, Chiragh S. Comparative effects of losartan and pioglitazone on insulin resistance in rats. *Biomedica*. 2014;30 (3):1-5.
- Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY. Differential contractile actions of reactive oxygen species on rat aorta: selective activation of ATP receptor by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Life Sci*. 2000;66(21):PL291-6.
- Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res*. 2004;49(6):543-9.
- Shinzato T, Ohya Y, Nakamoto M, Ishida A, Takishita S. Beneficial effects of pioglitazone on left ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2007;30(9):863-73.
- Shreenivas S, Oparil S. The role of endothelin-1 in human hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;37(1-2):157-78.
- Sifflinger-Birnboim A, Goligorsky MS, Del Vecchio PJ, Malik AB. Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability. *Lab Invest*. 1992;67(1):24-30.
- Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol*. 1998;275(6 Pt 1):C1640-52.
- Simonin MA, Bordji K, Boyault S, Bianchi A, Gouze E, Bécuwe P, Dauça M, Netter P, Terlain B. PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(1):C125-33.
- Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*. 2001;107(12):1491-5.
- Smith MT. Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2003;16(6):679-87.
- Sorg H, Hoffmann JO, Hoffmann JN, Vollmar B. Analysis of the influence of antithrombin on microvascular thrombosis: anti-inflammation is crucial for anticoagulation. *Intensive Care Med Exp*. 2015;3(1):58.
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9886-93.
- Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR $\alpha$  but not by PPAR $\gamma$  activators. *Nature*. 1998;393(6687):790-3.
- Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005;54(8):2460-70.
- Step SE, Lim HW, Marinis JM, Prokesch A, Steger DJ, You SH, Won KJ, Lazar MA. Anti-diabetic rosiglitazone remodels the adipocyte transcriptome by redistributing transcription to PPAR $\gamma$ -driven enhancers. *Genes Dev*. 2014;28(9):1018-28.
- Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J*. 2011;25(1):16-28.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  inhibits multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(9):4844-9.

- Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12440-8.
- Sudano I, Flammer AJ, Roas S, Enseleit F, Noll G, Ruschitzka F. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, acetaminophen, and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2012;14(4):304-9.
- Sud N, Black SM. Endothelin-1 impairs nitric oxide signaling in endothelial cells through a protein kinase Cdelta-dependent activation of STAT3 and decreased endothelial nitric oxide synthase expression. *DNA Cell Biol*. 2009;28(11):543-53.
- Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, Sato K, Taniyama Y, Ito S. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 2001;142(7):3125-34.
- Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K, Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(2):462-7.
- Sugiyama T, Yoshimoto T, Sato R, Fukai N, Ozawa N, Shichiri M, Hirata Y. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression and generation of reactive oxygen species in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44 Suppl 1:S332-5.
- Sutcliffe AM, Clarke DL, Bradbury DA, Corbett LM, Patel JA, Knox AJ. Transcriptional regulation of monocyte chemotactic protein-1 release by endothelin-1 in human airway smooth muscle cells involves NF-kappaB and AP-1. *Br J Pharmacol*. 2009;157(3):436-50.
- Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, Jamshidi N, Granger DN, Ishii H, Suematsu M, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4754-9.
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egidio J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(6):881-900.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):274-9.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;97(22):2222-9.
- Takai S, Kirimura K, Jin D, Muramatsu M, Yoshikawa K, Mino Y, Miyazaki M. Significance of angiotensin II receptor blocker lipophilicities and their protective effect against vascular remodeling. *Hypertens Res*. 2005;28(7):593-600.
- Takano H, Komuro I. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009;73(2):214-20.
- Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe Y, Masaki T, Goto K. Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem*. 1995;228(1):102-8.
- Tang EH, Vanhoutte PM. Gap junction inhibitors reduce endothelium-dependent contractions in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(1):148-53.
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003;42(6):1075-81.
- Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, Weber DS, Alexyew RW, Griendling KK. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(2):C494-9.
- Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW. Cyclooxygenase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase MAPK, Rho kinase, and Src mediate hydrogen peroxide-induced contraction of rat thoracic aorta and vena cava. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(1):236-43.

- Tian J, Wong WT, Tian XY, Zhang P, Huang Y, Wang N. Rosiglitazone attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction by upregulating endothelial expression of endothelin B receptor. *Hypertension*. 2010;56(1):129-35.
- Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang YX, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 $\alpha$ ) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(4):363-73.
- Tomida T, Numaguchi Y, Nishimoto Y, Tsuzuki M, Hayashi Y, Imai H, Matsui H, Okumura K. Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF2 $\alpha$  formation in L-NAME-treated rats. *J Hypertens*. 2003;21(3):601-9.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):639-72.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Role of endothelin in human hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81(6):533-41.
- Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(11):860-6.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(4):339-52.
- Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(2):125-31.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol*. 2006;45(1):19-28.
- Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv*. 2011;11(1):27-35.
- Touyz RM, Montezano AC. Vascular NOX-4: a multifarious NADPH oxidase. *Circ Res*. 2012;110(9):1159-61.
- Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(5):H2971-6.
- Tsai KH, Wang WJ, Lin CW, Pai P, Lai TY, Tsai CY, Kuo WW. NADPH oxidase-derived superoxide anion-induced apoptosis is mediated via the JNK-dependent activation of NF- $\kappa$ B in cardiomyocytes exposed to high glucose. *J Cell Physiol*. 2012;227(4):1347-57.
- Tsatsanis C, Yroulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1654-61.
- Uemasu J, Munemura C, Fujihara M, Kawasaki H. Inhibition of plasma endothelin-1 concentration by captopril in patients with essential hypertension. *Clin Nephrol*. 1994;41(3):150-2.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 1995;252:38-53.
- Usuda D, Kanda T. Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. *World J Cardiol*. 2014;6(8):744-54.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:97-120.
- Venegas-Pont M, Sartori-Valinotti JC, Maric C, Racusen LC, Glover PH, McLemore GR Jr, Jones AV, Reckelhoff JF, Ryan MJ. Rosiglitazone decreases blood pressure and renal injury in a female mouse model of systemic lupus erythematosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(4):R1282-9.
- Viel EC, Benkirane K, Javeshghani D, Touyz RM, Schiffrin EL. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(1):H281-8.

- Vila JM, Medina P, Segarra G, Aldasoro M, Noguera I, Lluch S. Endothelin-1-induced potentiation of adrenergic responses in the rabbit pulmonary artery: role of thromboxane A<sub>2</sub>. *Eur J Pharmacol.* 2001;413(2-3):247-54.
- Villegas I, Martín AR, Toma W, de la Lastra CA. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *Eur J Pharmacol.* 2004;505(1-3):195-203.
- Viridis A, Colucci R, Neves MF, Rugani I, Aydinoglu F, Fornai M, Ippolito C, Antonioli L, Duranti E, Solini A, Bernardini N, Blyizzi C, Taddei S. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused mice: effects of cyclooxygenase-1 inhibition. *Eur Heart J.* 2012;33(17):2225-34.
- Viridis A, Bacca A, Colucci R, Duranti E, Fornai M, Materazzi G, Ippolito C, Bernardini N, Blyizzi C, Bernini G, Taddei S. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension.* 2013;62(2):337-44.
- Wakino S, Hayashi K, Kanda T, Tatematsu S, Homma K, Yoshioka K, Takamatsu I, Saruta T. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit Rho/Rho kinase pathway by inducing protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Circ Res.* 2004;95(5):e45-55.
- Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G. The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes.* 1999;48(7):1448-53.
- Wang LH, Hajibeigi A, Xu XM, Loose-Mitchell D, Wu KK. Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;190(2):406-11.
- Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM, Stemerman MB. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(37):34176-81.
- Wang LH, Yang XY, Zhang X, Farrar WL. Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPARgamma cross talk with NF-kappaB and C/EBP. *Blood.* 2007;110(13):4373-84.
- Wang M, Lee E, Song W, Ricciotti E, Rader DJ, Lawson JA, Puré E, FitzGerald GA. Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* 2008;117(10):1302-9.
- Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;13 Suppl 5:S85-8; discussion S102.
- Weber MA, Black H, Bakris G, Krum H, Linas S, Weiss R, Linseman JV, Wiens BL, Warren MS, Lindholm LH. A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2009;374(9699):1423-31.
- Wedgwood S, Black SM. Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(3):L480-7.
- Wei H, Mi X, Ji L, Yang L, Xia Q, Wei Y, Miyamori I, Fan C. Protein kinase C-delta is involved in induction of NOX-1 gene expression by aldosterone in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemistry (Mosc).* 2010;75(3):304-9.
- Weksler BB. Prostanoids and NSAIDs in cardiovascular biology and disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2015;17(7):41.
- Welch WJ, Patel K, Modlinger P, Mendonca M, Kawada N, Dennehy K, Aslam S, Wilcox CS. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, COX-1 and -2, and AT1, AT2, and TP receptors in a rat model of early 2K,1C hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(5):H2644-9.

- White JP, Baltgalvis KA, Puppa MJ, Sato S, Baynes JW, Carson JA. Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):R201-11.
- Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol*. 2003;140(5):809-24.
- Widlansky ME, Gutterman DD. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(6):1517-30.
- Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(3):H1033-H1043.
- Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem*. 1996;39(3):665-8.
- Wilson JL, Duan R, El-Marakby A, Alhashim A, Lee DL. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\alpha$  Agonist Slows the Progression of Hypertension, Attenuates Plasma Interleukin-6 Levels and Renal Inflammatory Markers in Angiotensin II Infused Mice. *PPAR Res*. 2012;2012:645969.
- Wingard CJ, Husain S, Williams J, James S. RhoA-Rho kinase mediates synergistic ET-1 and phenylephrine contraction of rat corpus cavernosum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(5):R1145-52.
- Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res*. 2002;39(3):191-207.
- Woods M, Wood EG, Bardswell SC, Bishop-Bailey D, Barker S, Wort SJ, Mitchell JA, Warner TD. Role for nuclear factor-kappaB and signal transducer and activator of transcription 1/interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced endothelin-1 release in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 2003;64(4):923-31.
- Wort SJ, Ito M, Chou PC, Mc Master SK, Badiger R, Jazrawi E, de Souza P, Evans TW, Mitchell JA, Pinhu L, Ito K, Adcock IM. Synergistic induction of endothelin-1 by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappaB binding and histone acetylation at specific kappaB sites. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24297-305.
- Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(5):R1343-60.
- Wu S, Gao J, Ohlemeyer C, Roos D, Niessen H, Köttgen E, Gessner R. Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med*. 2005;39(12):1601-10.
- Xavier FE, Rossoni LV, Alonso MJ, Balfagón G, Vassallo DV, Salaices M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*. 2004;143(1):215-25.
- Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, del Campo L, Salaices M, Rossoni LV, Ferrer M, Balfagón G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 2008;154(6):1225-35.
- Xiong C, Mou Y, Zhang J, Fu M, Chen YE, Akinbami MA, Cui T. Impaired expression of PPAR gamma protein contributes to the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2005;77(24):3037-48.
- Xu L, Shen S, Ma Y, Kim JK, Rodriguez-Agudo D, Heuman DM, Hylemon PB, Pyak WM, Ren S. 25-Hydroxycholesterol-3-sulfate attenuates inflammatory response via PPAR $\gamma$  signaling in human THP-1 macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(7):E788-99.
- Xu F, Liu Y, Shi L, Liu W, Zhang L, Cai H, Qi J, Cui Y, Wang W, Hu Y. NADPH oxidase p47phox siRNA attenuates adventitial fibroblasts proliferation and migration in apoE(-/-) mouse. *J Transl Med*. 2015;13:38.

- Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation*. 2003;107(7):1040-5.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411-5.
- Yang ZH, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Lüscher TF. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm? *Circulation*. 1990;82(1):188-95.
- Yang D, Félétou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2002;136(1):104-10.
- Yang W, Zhang J, Wang H, Shen W, Gao P, Singh M, Fang N. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  regulates angiotensin II-induced catalase downregulation in adventitial fibroblasts of rats. *FEBS Lett*. 2011;585(5):761-6.
- Yang J, Zhou Y, Guan Y. PPAR $\gamma$  as a therapeutic target in diabetic nephropathy and other renal diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(1):97-105.
- Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension*. 2002;39(3):777-80.
- Ye BH, Lee SJ, Choi YW, Park SY, Kim CD. Preventive effect of gomisin J from *Schisyra chinensis* on angiotensin II-induced hypertension via an increased nitric oxide bioavailability. *Hypertens Res*. 2015;38(3):169-77.
- Yin BL, Hao H, Wang YY, Jiang YJ, Xue S. Downregulating osteopontin reduces angiotensin II-induced inflammatory activation in vascular smooth muscle cells. *Inflamm Res*. 2009;58(2):67-73.
- Yu Y, Xue BJ, Wei SG, Zhang ZH, Beltz TG, Guo F, Johnson AK, Felder RB. Activation of central PPAR- $\gamma$  attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2015;66(2):403-11.
- Yuen CY, Wong WT, Tian XY, Wong SL, Lau CW, Yu J, Tomlinson B, Yao X, Huang Y. Telmisartan inhibits vasoconstriction via PPAR $\gamma$ -dependent expression and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. 2011;90(1):122-9.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NADPHoxidase. *Hypertension*. 2001a;38(6):1395-9.
- Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant*. 2001b;16 Suppl 1:2-5.
- Zarzuelo MJ, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, Nieto A, Romero M, Quintela AM, López-Sepúlveda R, Gómez-Guzmán M, Bailón E, Rodríguez-Gómez I, Zarzuelo A, Gálvez J, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta$  activation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2011;58(4):733-43.
- Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):201.
- Zerrouk A, Champeroux P, Safar M, Brisac AM. Role of endothelium in the endothelin-1-mediated potentiation of the norepinephrine response in the aorta of hypertensive rats. *J Hypertens*. 1997;15(10):1101-11.
- Zhang YM, Wei EQ, Hu X, Qiao WL, Shi Y, Xu M, Zhang JF. The role of nuclear factor-kappaB in the effect of angiotensin II in the paraventricular nucleus in protecting the gastric mucosa from ischemia-reperfusion injury in rats. *J Gastroenterol*. 2008a;43(9):687-98.

- Zhang J, Fang NY, Gao PJ, Wu LY, Han WQ, Guo SJ, Shen WL, Zhu DL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists attenuate angiotensin II-induced collagen type I expression in adventitial fibroblasts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008b;35(1):72-7.
- Zhang L, Xie P, Wang J, Yang Q, Fang C, Zhou S, Li J. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. *J Biol Chem*. 2010;285(18):13666-77.
- Zhao Q, Zhang J, Wang H. PGC-1 $\alpha$  limits angiotensin II-induced rat vascular smooth muscle cells proliferation via attenuating NOX-1-mediated generation of reactive oxygen species. *Biosci Rep*. 2015;35(5). pii: e0025.
- Zheng H, Pu SY, Fan XF, Li XS, Zhang Y, Yuan J, Zhang YF, Yang JL. Treatment with angiotensin-(1-9) alleviates the cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol*. 2015a;95(1):38-45.
- Zheng JP, Cheng Z, Jiang J, Ke Y, Liu Z. Cyclosporin A upregulates ETB receptor in vascular smooth muscle via activation of mitogen-activating protein kinases and NF- $\kappa$ B pathways. *Toxicol Lett*. 2015b;235(1):1-7.
- Zhou J, Wilson KM, Medh JD. Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor-gamma splice variants in monkey macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(1):274-83.
- Zhou Y, Mitra S, Varadharaj S, Parinandi N, Zweier JL, Flavahan NA. Increased expression of cyclooxygenase-2 mediates enhanced contraction to endothelin ETA receptor stimulation in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Circ Res*. 2006;98(11):1439-45.
- Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber AA. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol*. 1998;54(3):536-40.
- Zimmerman MC, Davisson RL. Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004;84(2-3):125-49.
- Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol*. 2003;171(12):6827-37.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002;109(6):817-26.

#### Enlaces

<http://bit.ly/1OYylq6>

<http://bit.ly/HTA2013OMS>

<http://bit.ly/OMSmuerte2008>

<http://bit.ly/rosiglitazone>

<http://bit.ly/WHO-2004update>

<http://bit.ly/WHO-HTA>

## Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from spontaneously hypertensive rats

Jose V. Pérez-Girón,<sup>1\*</sup> Roberto Palacios,<sup>1\*</sup> Angela Martín,<sup>1</sup> Raquel Hernanz,<sup>1</sup> Andrea Aguado,<sup>2</sup> Sonia Martínez-Revelles,<sup>2</sup> María T. Barrús,<sup>1</sup> Mercedes Salas,<sup>2</sup> and María J. Alonso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain;

and <sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Submitted 2 December 2013; accepted in final form 2 April 2014

**Pérez-Girón JV, Palacios R, Martín A, Hernanz R, Aguado A, Martínez-Revelles S, Barrús MT, Salas M, Alonso MJ.** Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H1582–H1593, 2014. First published April 11, 2014; doi:10.1152/ajpheart.00924.2013.—Glitazones have anti-inflammatory properties by interfering with the transcription of proinflammatory genes, such as cyclooxygenase (COX)-2, and with ROS production, which are increased in hypertension. This study analyzed whether pioglitazone modulates COX-2 expression in hypertension by interfering with ROS and endothelin (ET)-1. In vivo, pioglitazone (2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, 28 days) reduced the greater levels of COX-2, pre-pro-ET-1, and NADPH oxidase (NOX) expression and activity as well as O<sub>2</sub><sup>·-</sup> production found in aortas from spontaneously hypertensive rats (SHRs). ANG II increased COX-2 and pre-pro-ET-1 levels more in cultured vascular smooth muscle cells from hypertensive rats compared with normotensive rats. The ET<sub>A</sub> receptor antagonist BQ-123 reduced ANG II-induced COX-2 expression in SHR cells. ANG II also increased NOX-1 expression, NOX activity, and superoxide production in SHR cells; the selective NOX-1 inhibitor ML-171 and catalase reduced ANG II-induced COX-2 and ET-1 transcription. ANG II also increased c-Jun transcription and phospho-JNK1/2, phospho-c-Jun, and p65 NF-κB subunit nuclear protein expression. SP-600125 and lactacystin, JNK and NF-κB inhibitors, respectively, reduced ANG II-induced ET-1, COX-2, and NOX-1 levels and NOX activity. Pioglitazone reduced the effects of ANG II on NOX activity, NOX-1, pre-pro-ET-1, COX-2, and c-Jun mRNA levels, JNK activation, and nuclear phospho-c-Jun and p65 expression. In conclusion, ROS production and ET-1 are involved in ANG II-induced COX-2 expression in SHRs, explaining the greater COX-2 expression observed in this strain. Furthermore, pioglitazone inhibits ANG II-induced COX-2 expression likely by interfering with NF-κB and activator protein-1 proinflammatory pathways and downregulating ROS production and ET-1 transcription, thus contributing to the anti-inflammatory properties of glitazones.

angiotensin II; endothelin-1; reactive oxygen species; cyclooxygenase-2; hypertension; peroxisome proliferator-activated receptor-γ

PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR (PPAR)-γ, a member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the vascular wall, where it exerts a role in vascular biology (53).

\* J. V. Pérez-Girón and R. Palacios contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: M. J. Alonso, Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Avda. de Atenas s/n, Alcorcón 28922, Spain (e-mail: mariajesus.alonso@urjc.es).

PPARs have cardiovascular protective effects resulting from their anti-inflammatory and antioxidant actions (53). These protective effects have been associated with inhibition of expression of proinflammatory enzymes, such as the inducible isoform of cyclooxygenase (COX-2) (50, 52), with inhibition of expression of NADPH oxidase (NOX) components and subsequent ROS production (22, 34) and with the ability to antagonize the vascular damage and functional alterations induced by ANG II (15, 48, 57). In addition to the reported antioxidant properties, the anti-inflammatory mechanisms proposed for PPAR-γ ligands comprise interference with MAPK activation and/or with downstream activator protein (AP)-1 and NF-κB transactivation (42).

ANG II, the main effector peptide of the renin-angiotensin system (RAS), is increased in tissues and plasma of different hypertension models, where it actively contributes to the pro-inflammatory state observed in this pathology (46). Thus, ANG II induces cytokines and ROS production and the expression of adhesion molecules and proinflammatory enzymes such as COX-2 (4, 6, 16, 46). Increased COX-2 expression and activity could contribute to the vascular alterations found in hypertension. In this sense, we have described increased production of COX-2-derived contractile prostanoids and its participation in vasoconstrictor responses in vessels from hypertensive rats, which was reduced by treatment with ANG II type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor antagonists (4). COX-2 expression is highly regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels. Among the signaling pathways involved in COX-2 regulation, ROS, several transcription factors, such as NF-κB or AP-1, or different kinases involved in cell transduction signaling seem to play an important role (4, 6, 12).

Endothelin (ET)-1, a peptide of 21 amino acids, constitutes the most abundant and important member of the ET family (5, 43). Although ET-1 is primarily produced by endothelial cells (5, 43), its expression may also be induced in vascular smooth muscle cells (VSMCs) by proinflammatory mediators such as ANG II (23, 29) through AP-1 and NF-κB activation (10, 23, 24). In addition to its role on vascular tone regulation, ET-1 also acts as a mediator of the vascular inflammatory response by inducing the expression of proinflammatory enzymes, including COX-2 (14, 37), thereby contributing to the pathophysiological alterations observed in different vascular inflammatory disorders, such as hypertension (5, 41, 43). In addition, ET-1 has been proposed to mediate some of the deleterious cardiovascular effects of ANG II, such as renal effects, fibrosis, or cardiac hypertrophy (1, 7, 36, 40, 44).

Our hypothesis is that the reduction in the increased COX-2 expression observed in hypertension, associated with the augmented RAS activity, contributes to the described anti-inflammatory effects of glitazones. Among the mechanisms involved, a decrease in oxidative stress and in ET-1 transcription might contribute to this effect. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether PPAR- $\gamma$  agonists attenuate the increased COX-2 expression observed in hypertension by interfering with ROS production and ET-1 transcription as well as to determine the possible molecular mechanisms involved. The specific objectives were to analyze 1) the *in vivo* effect of pioglitazone in oxidative stress, ET-1 mRNA levels, and COX-2 expression in the aorta from spontaneously hypertensive rats (SHRs); 2) the effect of pioglitazone on ANG II-induced COX-2 expression and the involvement of oxidative stress and ET-1 in such effects in VSMCs from SHRs; and 3) the contribution of interference with the NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways in the pioglitazone effect.

## MATERIALS AND METHODS

All experiments were approved by the Ethical Committee of Research of the Universidad Autónoma de Madrid, Spain (CEI-UAM 31-759). All animal care and experimental procedures conformed with current Spanish and European laws on the use of animals (RD 223/88 MAPA and 609/86).

For experiments, aortas from 6-mo-old normotensive [Wistar Kyoto (WKY)] rats and SHRs untreated or treated with the PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone (2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) for 28 days suspended in 0.5% methylcellulose and administered in drinking water were used. This treatment did not modify blood pressure, as previously described (22). For some experiments, we also used SHRs treated with the AT<sub>1</sub> receptor antagonist losartan (15 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> in the drinking water for 12 wk). Rats were euthanized by decapitation, and the thoracic aorta was removed, frozen at -20°C, and kept at -80°C until used.

To obtain primary cultures of VSMCs, thoracic aortas from 5-mo-old SHRs or WKY rats were aseptically removed, cleaned of fat tissue and blood cells, and placed in DMEM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, 4°C) containing 2 mg/ml collagenase type 2 (Invitrogen Life Technologies), 0.1% BSA, 200 U/ml penicillin, and 200  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma Chemical, St. Louis, MO). After the adventitia had been carefully removed, VSMCs were obtained by the explant method (4, 32). Cells were identified as VSMCs by the typical spindle shape, by the typical "hills and valleys" distribution, and by positive immunocytochemical staining with specific monoclonal anti- $\alpha$ -actin antibody (Sigma Chemical). For experiments, cells from passages 3–8 were made quiescent by incubation in DMEM containing 0.2% FBS for 24 h. Cells were stimulated with ANG II (for the times indicated in the RESULTS) and with ET-1 (1 h) with or without pretreatment for 18 h with the PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone or for 45 min with the ET<sub>A</sub> receptor antagonist BQ-123, the ET<sub>B</sub> receptor antagonist BQ-788, the AT<sub>1</sub> receptor antagonist losartan, the presumed NOX inhibitor apocynin, the NOX-1 inhibitor ML-171, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger catalase, the JNK inhibitor SP-600125, or the proteasome inhibitor lactacystin.

**Western blot analysis.** Protein expression was determined in whole cell lysates (20–25  $\mu$ g protein) or nuclear extracts (15  $\mu$ g protein) by Western blot analysis, as previously described (32). Proteins were separated by 10% SDS-PAGE and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes overnight. Membranes were incubated with rabbit polyclonal antibodies for COX-2 (1:250, Cayman Chemical; Ann Arbor, MI), p65 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), phosphorylated (p)-c-Jun (1:500, Santa Cruz Biotechnology), and p-JNK1/2 (1:2,000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Immunoreactive bands were visualized using fluorescent secondary antibodies from the corresponding host (1:5,000, Bio-Rad Laborato-

ries, Hercules, CA) and the ECF Plus Western blot analysis system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Signals on the immunoblot were quantified using Typhoon 9210 quantification software (GE Healthcare). The same membrane was used to determine  $\alpha$ -actin (anti- $\alpha$ -actin monoclonal antibody, 1:20,000, Sigma Chemical) and JNK (anti-JNK monoclonal antibody, 1:1,000, Cell Signaling Technology) in cellular lysates or TATA-binding protein (TBP) expression in nuclear extracts (anti-TBP polyclonal antibody, 1:2,000, Santa Cruz Biotechnology).

Results are expressed as the ratio between signals on the immunoblot corresponding to the different proteins and  $\alpha$ -actin, total JNK, or TBP in the same preparation. None of the drugs used altered  $\alpha$ -actin expression. To compare results for protein expression within the same experiment and with others, we assigned a value of 1 in each gel to the expression of unstimulated control cells and used that value to calculate the relative density of other bands from the same gel.

**Quantitative real-time PCR assay.** The different mRNAs were determined by quantitative real-time PCR. Total RNA was obtained using TRIzol (Invitrogen Life Technologies). A total of 1  $\mu$ g of DNase I-treated RNA was reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a 20- $\mu$ l reaction. PCR was performed in duplicate for each sample using 0.5  $\mu$ l cDNA as template, 1 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), and 20 $\times$  Taqman Gene Expression Assays (COX-2: Rn00568225\_m1, pre-pro-ET-1: Rn00586652\_m1, c-Jun: Rn00440945\_m1, NOX-1: Rn00586652\_m1, NOX-4: Rn00585380\_m1, and p47<sup>phox</sup>: Rn00586945\_m1, Applied Biosystems) in a 20- $\mu$ l reaction. For quantification, quantitative real-time PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, from the Centro de Apoyo Tecnológico of Universidad Rey Juan Carlos) using the following conditions: 2 min at 50°C and 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. As a normalizing internal control, we amplified  $\beta_2$ -microglobulin (Rn00560865\_m1) or cyclophilin D (Rn01458749\_g1). To calculate the relative index of gene expression, we used the 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  method (where C<sub>t</sub> is threshold cycle) using WKY segments/cells or untreated samples as calibrators. mRNA levels of the housekeeping genes were not modified by any of the treatments used.

**NOX activity.** A lucigenin-enhanced chemiluminescence assay was used to determine NOX activity. Aortas or VSMCs were homogenized in lysis buffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, and 150 mM sucrose, pH 7.4). The reaction was started by the addition of NADPH (0.1 mM) to the suspension containing the sample, lucigenin (5  $\mu$ M), and assay phosphate buffer. Luminescence was measured in a plate luminometer (Auto-Lumat LB 953, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The buffer blank was subtracted from each reading. Activity was expressed as relative light units per milligram of protein. Samples from normotensive animals or untreated cells were used as controls, and variations of NOX activity were calculated as the amount relative to controls.

**Measurement of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production.** The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate *in situ* O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in both aortic segments and VSMCs, as previously described (32, 33). Hydroethidium freely permeates cells and is oxidized in the presence of O<sub>2</sub><sup>-</sup> to ethidium bromide, which is trapped by intercalation with DNA. Ethidium bromide is excited at 546 nm and has an emission spectrum at 600–700 nm.

For determination in aortic segments, frozen segments were cut into 14- $\mu$ m-thick sections and placed on a glass slide. Serial aortic sections were equilibrated in a Krebs-HEPES buffer [containing (in mM) 130 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.24 MgCl<sub>2</sub>, 8.3 HEPES, and 11 glucose, pH 7.4]. Fresh buffer containing DHE (2  $\mu$ M, 30 min, 37°C) was applied topically onto each tissue section, coverslipped, incubated for 30 min in a light-protected humidified chamber at 37°C, and then viewed by a fluorescent laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP2, Wetzlar, Germany, magnification:  $\times$ 40, excitation: 546 nm and emission: 600–700 nm) equipped with a krypton/argon laser, using the same imaging settings in each case. Four areas per ring for

each experimental condition were analyzed with MetaMorph image-analysis software (Molecular Devices, Downingtown, PA). The integrated optical densities in the target region were calculated.

VSMCs were plated onto glass coverslips inserted into six-well plates and cultured as described above. Subconfluent cells were stimulated with ANG II for 2 h in the absence and presence of pioglitazone or apocynin that were respectively added 18 h or 45 min before ANG II. Afterwards, cells were loaded with DHE (10  $\mu$ M) in serum-free DMEM with 0.1% BSA for 30 min at 37°C. Nonstimulated VSMCs were imaged daily in parallel using the same image settings. Images were captured with a fluorescent laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP2). The fluorescence intensity values of 10–20 nuclei per experiment were measured using the Metamorph Image Analysis Software.

**Immunofluorescence.** VSMCs were seeded in a 24-well culture plate with coverglasses in the bottom surface. After reaching 60% confluence, cultures were starved in DMEM with 0.2% FBS for 24 h. Cultures were stimulated with ANG II after treatment or not with pioglitazone. At the end of the treatment, cells were washed and fixed in 4% paraformaldehyde diluted in PBS and permeabilized in PBS containing 0.2% BSA and 0.5% Triton X-100. The rabbit polyclonal primary antibody against p65 was added to cells at 1:200 dilution and incubated overnight at 4°C. After cells had been washed, green FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes, Life Technologies, Paisley, UK) was added at 1:2,000 dilution in the dark. In control experiments, the primary antibody was omitted. After cells were washed and incubated for 15 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (1:10,000, Invitrogen Life Technologies) to stain nuclei, ProLong Gold antifade mounting reagent (Invitrogen Life Technologies) was added to the microscope slides. Cells fixed and treated in the coverglasses were placed and sealed in the slides and allowed to dry completely in the dark until the next day. Immunofluorescence-stained cells were observed under a laser scanning confocal microscope (Nikon, C1plus, Nikon Instruments, Melville, NY) and analyzed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). The fluorescence intensity of cells was measured at four preset areas per sample, and at least three independent experiments were performed.

**Additional reagents.** ANG II, ET-1, BQ-123, BQ-788, ML-171, apocynin, catalase, and lactacystin were obtained from Sigma Chemical. SP-600125 and losartan were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). DHE was from Molecular Probes (Invitrogen Life Technologies). Pioglitazone was generously supplied by Takeda-Lilly.

**Statistical analysis.** Results are expressed as means  $\pm$  SE. *n* denotes the number of animals used or the number of different cultures (each obtained from three different animals). Statistical analysis was performed using a paired Student's *t*-test and one-way ANOVA followed by the Bonferroni test or the Mann-Whitney nonparametric test using Graph Pad Prism software. *P* values of  $\leq 0.05$  were considered to indicate statistically significant differences.

## RESULTS

**In vivo treatment with pioglitazone reduced the increased COX-2 and ET-1 transcription as well as oxidative stress observed in aortas from hypertensive rats.** We (2, 4) have previously described that COX-2 protein expression and mRNA levels were greater in aortic segments from SHR compared with WKY rats. Now, we confirmed these results and also observed increased pre-pro-ET-1 mRNA levels in segments from SHR (Fig. 1, A and B). Treatment of hypertensive rats with pioglitazone (2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, 28 days) reduced the greater mRNA levels of both COX-2 and ET-1 observed in aortic segments (Fig. 1, A and B).

In aortas from SHR, mRNA levels of the NOX catalytic subunits NOX-1 and NOX-4, NOX activity, and vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup>

production were greater compared with WKY segments (Fig. 1, C–E), as previously described (3, 4, 33). We also observed increased mRNA levels of the NOX regulatory subunit p47<sup>phox</sup> (Fig. 1C). Pioglitazone treatment normalized the increased NOX expression and activity as well as the greater O<sub>2</sub><sup>-</sup> production observed in SHR (Fig. 1, C–E).

We have previously described increased COX-2 expression and oxidative stress in ANG II-infused mice (33) and that losartan treatment reduced the increased vascular COX-2 expression and oxidative stress observed in SHR (4). In addition, the greater mRNA levels of ET-1 found in aortic segments from SHR compared with WKY rats (relative expression: 0.92  $\pm$  0.12 in WKY rats, *n* = 6, compared with 1.99  $\pm$  0.37 in SHR, *n* = 6, *P* < 0.05) was reduced by losartan (0.94  $\pm$  0.26, *n* = 6, *P* < 0.05), suggesting the involvement of ANG II in such increases. In an attempt to clarify the mechanisms by which pioglitazone reduces the increased COX-2 and ET-1 transcription as well as the oxidative stress observed in hypertensive rats, the following experiments were carried out using cultured VSMCs stimulated with ANG II.

**Pioglitazone reduced ANG II-induced COX-2 expression in VSMCs.** Basal mRNA levels of COX-2 were also greater in VSMCs from SHR compared with WKY rats (data not shown), as previously described (32). ANG II (100 nM, 15 min to 3 h) time dependently increased COX-2 mRNA levels in VSMCs from WKY rats and SHR (Fig. 2A). The increase in both COX-2 mRNA levels and protein expression after 2-h ANG II incubation was higher (*P* < 0.05) in VSMCs from SHR compared with WKY rats (Fig. 2, A and B). Losartan treatment (10  $\mu$ M) reduced the increase in COX-2 mRNA levels in both WKY rats (relative expression: 2.34  $\pm$  0.45 for ANG II vs. 1.25  $\pm$  0.30 for ANG II + losartan, *n* = 5, *P* < 0.05) and SHR (relative expression: 6.27  $\pm$  1.24 for ANG II vs. 2.15  $\pm$  0.35 for ANG II + losartan, *n* = 5, *P* < 0.05), supporting the involvement of AT<sub>1</sub> receptors in such induction. Treatment of VSMCs with the PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone (10  $\mu$ M, 18 h) reduced ANG II-induced COX-2 protein and mRNA levels in cells from SHR (Fig. 2, C and D) and in those from WKY rats (COX-2 mRNA levels, relative expression: 2.76  $\pm$  0.50 for ANG II vs. 1.42  $\pm$  0.25 for ANG II + pioglitazone, *n* = 6, *P* < 0.05).

**Pioglitazone reduced ANG II-induced COX-2 expression by reducing ET-1 transcription in VSMCs from SHR.** Basal mRNA levels of pre-pro-ET-1 were greater in VSMCs from SHR compared with WKY rats (Fig. 3A). ANG II (100 nM, 15 min to 3 h) did not modify pre-pro-ET-1 mRNA levels in cultures from normotensive rats; however, in cells from SHR, ANG II increased those levels in a time-dependent manner, with a peak at 1 h (Fig. 3B). ANG II-induced pre-pro-ET-1 gene expression was dependent on AT<sub>1</sub> receptor activation since it was abolished by 10  $\mu$ M losartan (relative expression: 1.74  $\pm$  0.06 for ANG II vs. 1.08  $\pm$  0.10 for ANG II + losartan, *n* = 5, *P* < 0.05).

In VSMCs from SHR, the ET<sub>A</sub> receptor antagonist BQ-123 (1  $\mu$ M; Fig. 3C), but not the ET<sub>B</sub> receptor antagonist BQ-788 (1  $\mu$ M; data not shown), reduced, but not abolished, the increased COX-2 protein and mRNA levels induced by ANG II (2 h). These data suggest that ET-1, through ET<sub>A</sub> receptor activation, contributes, at least partially, to the ANG II-induced COX-2 expression. Accordingly, incubation of VSMCs from SHR with ET-1 (100 nM, 1 h) increased both COX-2 protein

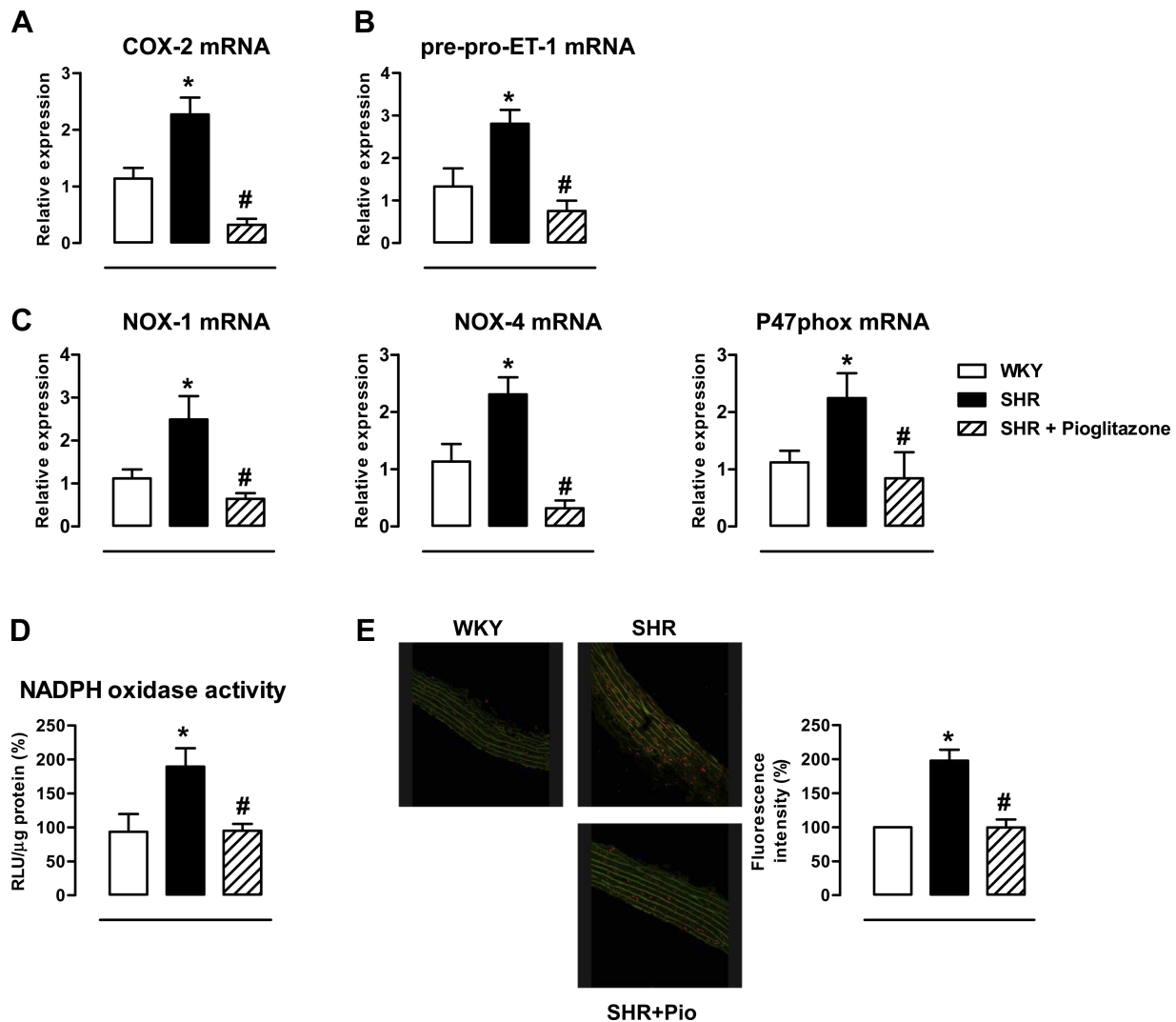


Fig. 1. A–E: cyclooxygenase (COX)-2, pre-pro-endothelin (ET)-1, NADPH oxidase (NOX)-1, NOX-4, and p47<sup>phox</sup> mRNA levels (A–C), NOX activity (D), and representative confocal photomicrographs and quantitative analysis of vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup> production (E) in aortic segments from Wistar Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHRs) untreated and treated with pioglitazone (Pio; 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, 28 days). Results are expressed as relative values compared with WKY rats.  $n = 4-7$ . \* $P < 0.05$  vs. WKY rats; # $P < 0.05$  vs. SHRs by a Mann-Whitney nonparametric test or one-way ANOVA.

and mRNA levels (Fig. 3D). The effect of ET-1 on COX-2 mRNA levels was reduced by BQ-123 (Fig. 3D), suggesting the involvement of ET<sub>A</sub> receptors in such induction.

As observed with COX-2 expression, treatment of VSMCs from SHRs with pioglitazone reduced ET-1 transcription induced by ANG II (1 h; Fig. 3E).

*Pioglitazone reduced ANG II-induced ET-1 and COX-2 expression by reducing oxidative stress in VSMCs from SHRs.* The specific NOX-1 inhibitor ML-171 (0.5  $\mu$ M) and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger catalase (1,000 U/ml) reduced the increase in COX-2 and pre-pro-ET-1 mRNA levels induced by ANG II in VSMCs from SHRs (Fig. 4, A and B), suggesting the involvement of oxidative stress in ANG II-induced COX-2 and ET-1 expression.

ANG II increased NOX-1 mRNA levels and NOX activity, and pioglitazone reduced these increases (Fig. 4, C and D). In keeping with this, pioglitazone also reduced the increase in O<sub>2</sub><sup>-</sup> production observed after ANG II incubation (Fig. 4E). NOX seems to be the source of this super-

oxide production based on the reduction elicited by apocynin (30  $\mu$ M; Fig. 4E).

*Pioglitazone reduced ANG II-induced ET-1 and COX-2 expression by reducing AP-1 and NF- $\kappa$ B activation in VSMCs from SHRs.* It has been previously described that ET-1 and COX-2 as well as NOX-1 genes have regulatory sites in their promoters to bind the proinflammatory transcription factor AP-1 (8, 12, 30, 43, 51). Therefore, we analyzed the involvement of AP-1 on NOX-1 and ET-1 expression and its contribution to the increased ANG II-induced COX-2 expression. Treatment of VSMCs from SHRs with the specific JNK inhibitor SP-600125 (20  $\mu$ M) diminished both pre-pro-ET-1 and NOX-1 expression as well as NOX activity induced by ANG II (Fig. 5, B–D). In agreement with the above results indicating the role of ROS and ET-1 in ANG II-induced COX-2 expression, we found that this expression was also reduced by SP-600125 (Fig. 5A).

ANG II increased JNK1/2 phosphorylation at 5 and 10 min (Fig. 5, E and F) in VSMCs from SHRs. Accordingly, mRNA

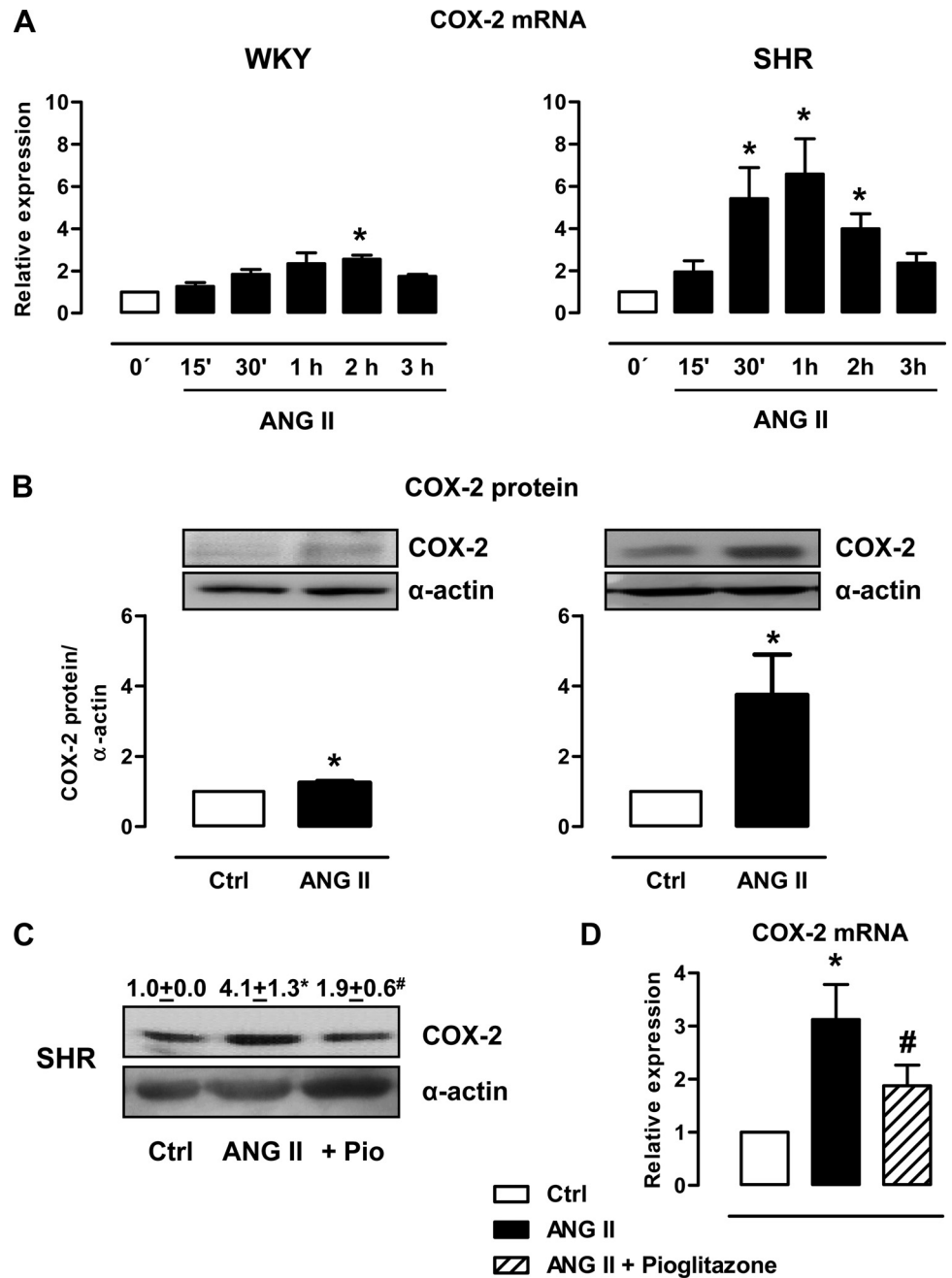


Fig. 2. *A*: time course of ANG II (100 nM)-induced COX-2 mRNA levels in vascular smooth muscle cells (VSMCs) from WKY rats and SHRs. *B*: effect of ANG II (2 h) on COX-2 protein expression in VSMCs from WKY rats and SHRs; representative blots are also shown. *C* and *D*: effect of Pio (10  $\mu$ M, 18 h) on ANG II-induced COX-2 protein expression (*C*) and mRNA levels (*D*) in SHR VSMCs. Results are expressed as relative values compared with untreated cells [0 min (0') or control (Ctrl)].  $n = 4-8$ . \* $P < 0.05$  vs. untreated cells. # $P < 0.05$  vs. ANG II by one-way ANOVA or a Student's *t*-test.

levels of c-Jun (Fig. 5G) and nuclear expression of p-c-Jun (Fig. 5H) were also increased in the presence of ANG II. It has been previously described that PPAR- $\gamma$  activation interferes with the AP-1 pathway (42). We then analyzed whether the effect of pioglitazone on COX-2 expression could be associated with negative regulation of this proinflammatory transcription factor. Pioglitazone treatment reduced p-JNK1/2 expression (Fig. 5F), c-Jun mRNA levels (Fig. 5G), and p-c-Jun nuclear expression (Fig. 5H) induced by ANG II.

NF- $\kappa$ B is another proinflammatory transcription factor that may regulate COX-2, ET-1, and NOX-1 expression (12, 31, 43, 51). Treatment of VSMCs from SHRs with the proteasome inhibitor lactacystin (10  $\mu$ M) reduced pre-pro-ET-1 and NOX-1 mRNA levels and NOX activity induced by ANG II

(Fig. 6, B–D), and, thus, the increased ANG II-induced COX-2 mRNA levels (Fig. 6A).

ANG II increased the nuclear expression of p65 (Fig. 6E). Immunofluorescence experiments confirmed the augmented localization of p65 in the nucleus (Fig. 6F). The interference by PPAR- $\gamma$  activators of the NF- $\kappa$ B signaling pathway has also been suggested (42). Accordingly, pioglitazone reduced ANG II-induced p65 nuclear expression in VSMCs from SHRs (Fig. 6, E and F).

**DISCUSSION**

This study shows, in conductance vessels from hypertensive animals, that the PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone reduces the

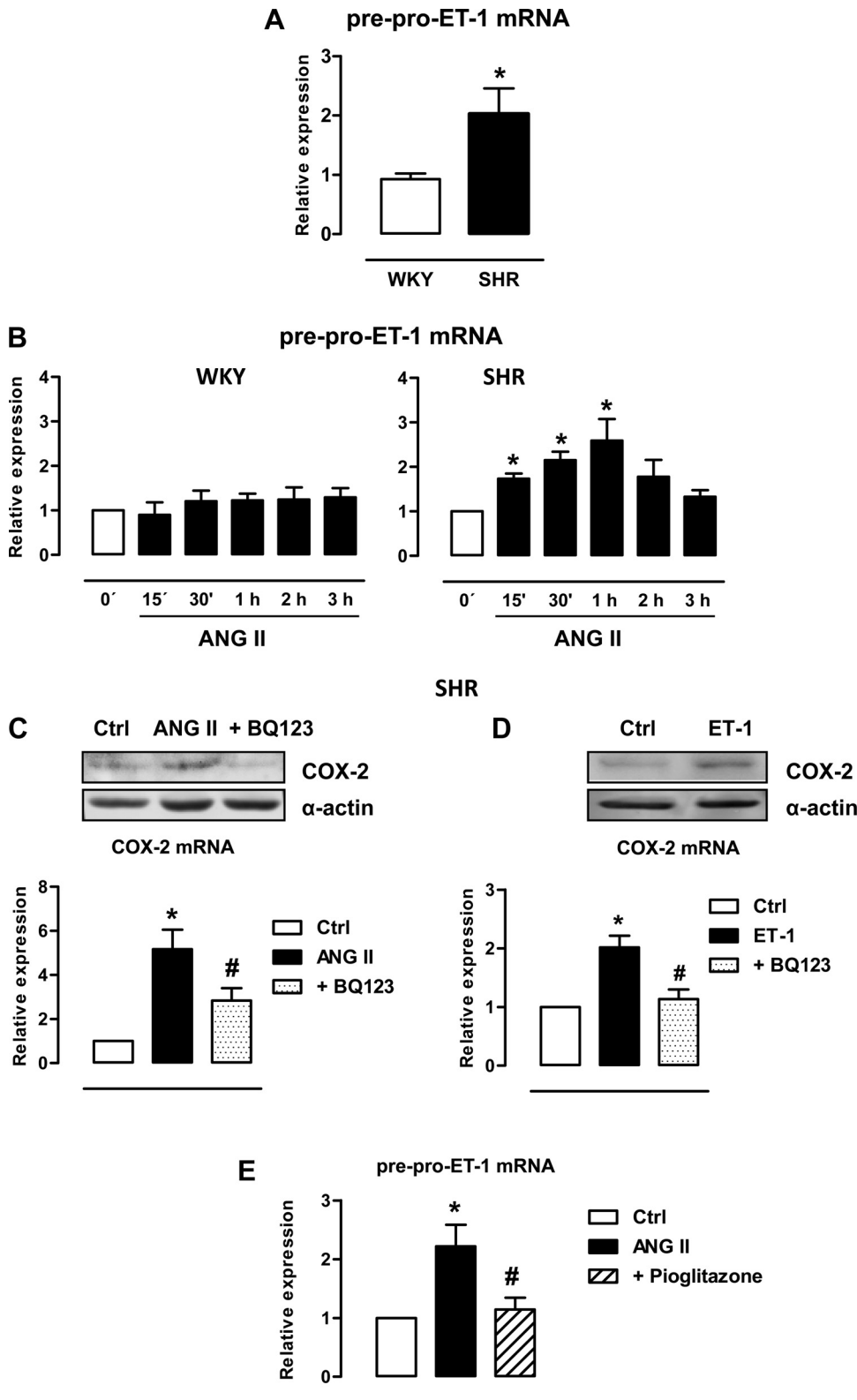


Fig. 3. *A*: basal pre-pro-ET-1 mRNA levels in VSMCs from WKY rats and SHRs. *B*: time course of ANG II (100 nM)-induced pre-pro-ET-1 mRNA levels in VSMCs from WKY rats and SHRs. *C*: effect of ANG II (100 nM, 2 h) on COX-2 protein expression (*top*) and mRNA levels (*bottom*) in the absence and presence of BQ-123 (1  $\mu$ M) in VSMCs from SHRs. *D*: effect of ET-1 (100 nM, 1 h) on COX-2 protein expression (*top*) and mRNA levels (*bottom*) in the absence and presence of BQ-123 in VSMCs from SHRs. *E*: effect of Pio (10  $\mu$ M, 18 h) on ANG II-induced pre-pro-ET-1 mRNA levels in VSMCs from SHRs. Results are expressed as relative values compared with WKY cells or untreated cells (0' or Ctrl).  $n = 4-7$ . \* $P < 0.05$  vs. WKY or untreated cells. # $P < 0.05$  vs. ANG II by one-way ANOVA or a Student's *t*-test.

increased proinflammatory enzyme COX-2, which is associated with the increased RAS activity observed in this pathology. Among the mechanisms involved, we propose that the glitazone, by interfering with NF- $\kappa$ B and AP-1, reduces the ANG II-elicited ROS production and ET-1 transcription, which

are involved in the increased COX-2 expression. These mechanisms could contribute to the well-documented anti-inflammatory properties of glitazones.

PPAR- $\gamma$  has cardioprotective effects associated, among others, with inhibition of vascular expression of proinflam-

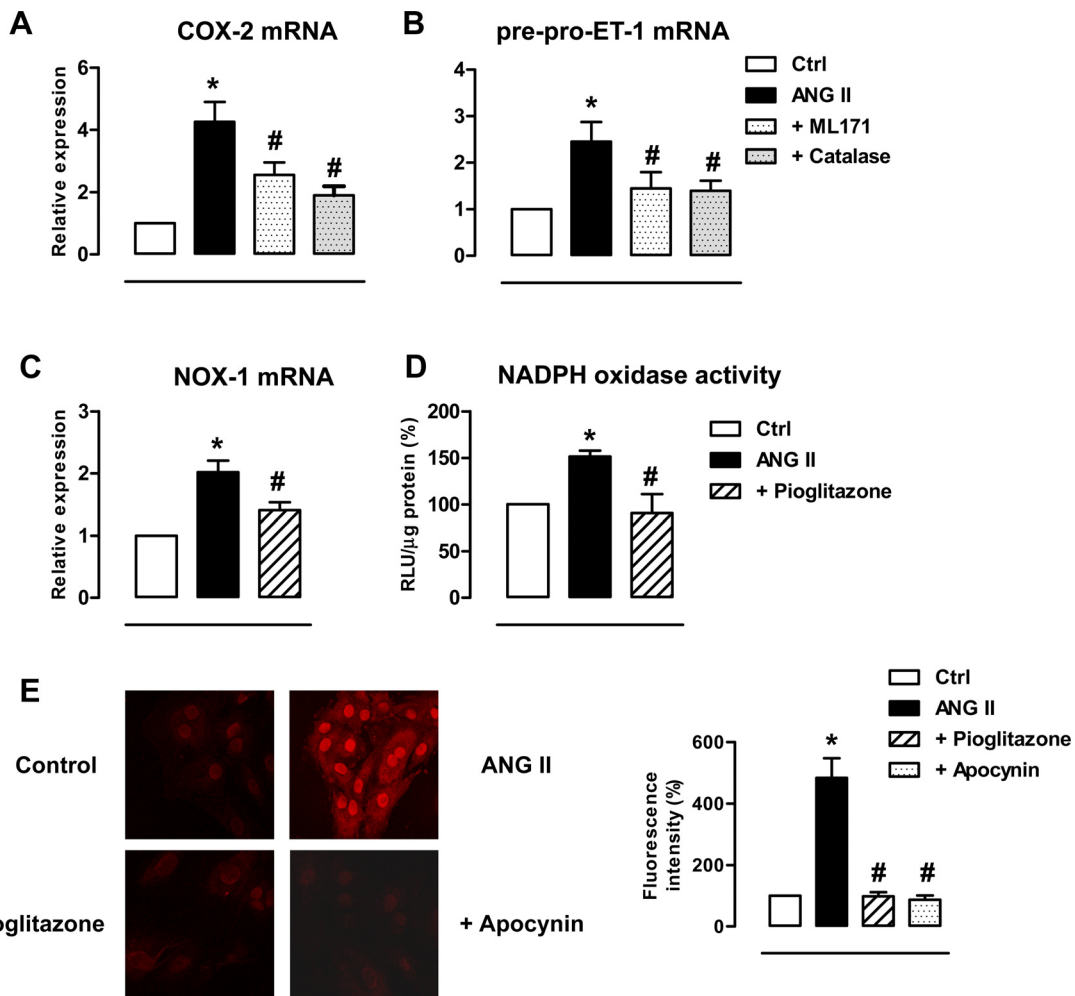


Fig. 4. *A* and *B*: effect of ML-171 (0.5  $\mu$ M) and catalase (1,000 U/ml) on ANG II-induced COX-2 (*A*) and pre-pro-ET-1 mRNA levels (*B*) in VSMCs from SHR. *C–E*: effect of Pio (10  $\mu$ M, 18 h) on ANG II-induced NOX-1 mRNA levels, NOX activity, and vascular  $O_2^{\cdot-}$  production in VSMCs from SHR. As a Ctrl, the effect of apocynin (30  $\mu$ M) on  $O_2^{\cdot-}$  production is also shown. Results are expressed as relative values compared with untreated (Ctrl) cells;  $n = 4–7$ . \* $P < 0.05$  vs. Ctrl; # $P < 0.05$  vs. ANG II by one-way ANOVA or a Student's *t*-test.

matory enzymes and improvement of vascular inflammation (53). Thus, PPAR- $\gamma$  agonists reduce the increased COX-2 expression found in different inflammatory models (13, 49), and we (32) have previously described that pioglitazone also reduces the increased COX-2 induced by IL-1 $\beta$  in SHR cells. In keeping with this, we found that pioglitazone treatment reduced the greater COX-2 expression observed in aortic segments from hypertensive rats. Surprisingly, increased COX-2 expression was observed in rat mesenteric resistance arteries after pioglitazone treatment (22); we do not have explanation for such contradictory results, but differences in the compensatory mechanisms occurring in resistance versus conductance arteries could explain them. Furthermore, PPAR- $\gamma$  agonists inhibit the expression of several components of NOX and the subsequent ROS production, therefore contributing to the anti-inflammatory and vascular protective effects of these drugs (22, 28, 32, 34). Accordingly, pioglitazone also reduced the increased mRNA levels of NOX-1, NOX-4, and p47<sup>phox</sup>, NOX activity, and vascular  $O_2^{\cdot-}$  production. These effects of pioglitazone could contribute to explain the improvement of

endothelium-dependent relaxation induced by glitazones in different pathologies (15, 22, 28, 35).

ET-1 is a peptide originally isolated from the supernatants of cultured endothelial cells that exerts a wide variety of biological effects in different tissues, including the vascular wall. Thus, endothelial ET-1 can act in a paracrine manner on adjacent smooth muscle cells affecting vascular reactivity and mitogenesis (5, 43). However, ET-1 has also an autocrine role in vasculature regulation, as it has been previously described to be released by VSMCs in response to growth factors and/or vasoactive hormones (21, 23, 29). Increased ET-1 levels have been previously described in several models of hypertension (20, 38). We found greater pre-pro-ET-1 mRNA levels in aortic segments and VSMCs from SHR compared with WKY rats. It has been proposed that PPAR- $\gamma$  agonists inhibit ET-1 expression, thus contributing to the improvement of cardiovascular alterations observed not only in hypertension but also in other pathological processes such as diabetes, atherosclerosis, or cardiac hypertrophy (34, 47, 55). In agreement, *in vivo* pioglitazone treatment of SHR reduced pre-pro-ET-1 mRNA levels in aortic seg-

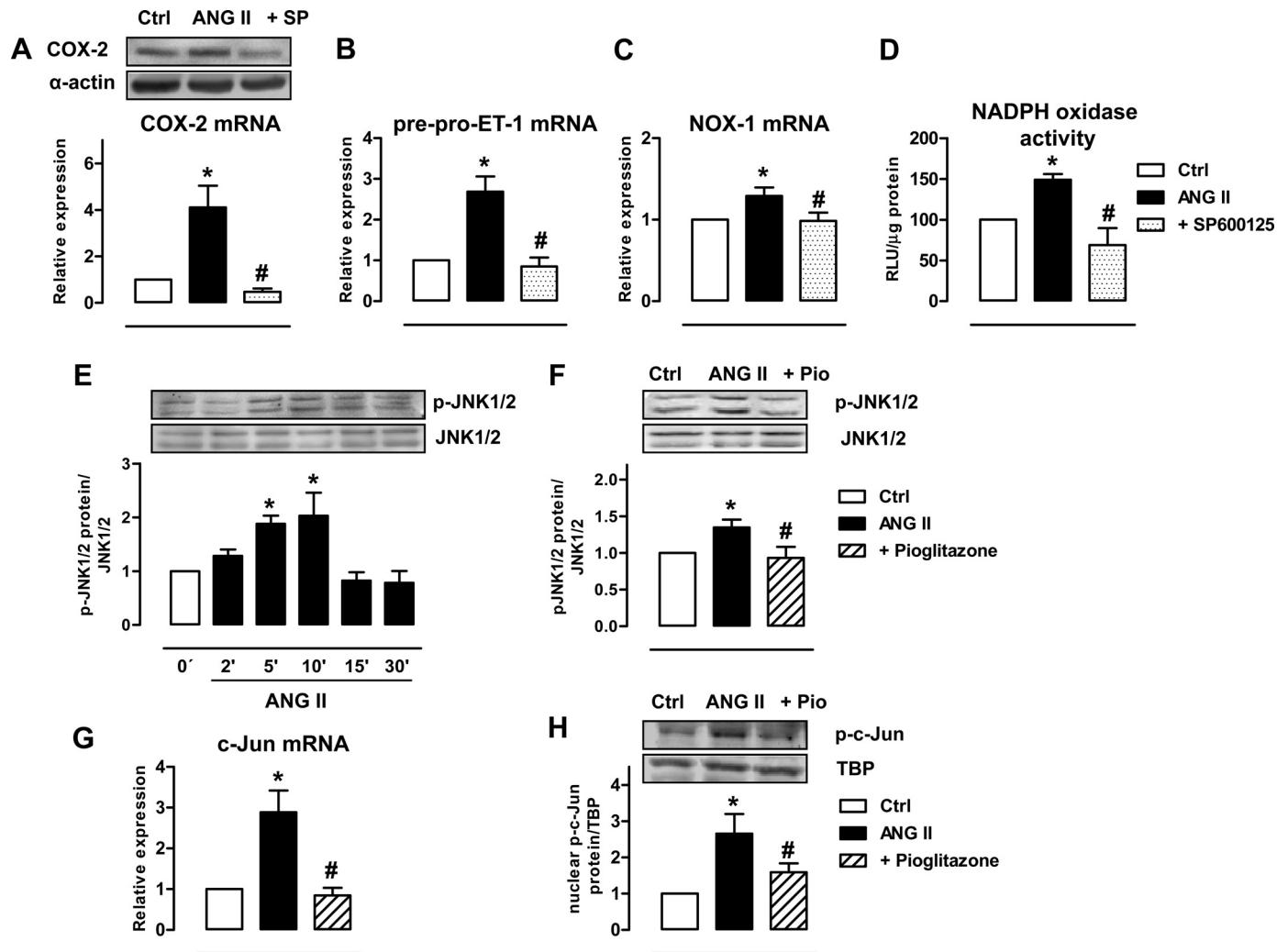


Fig. 5. *A–D*: effect of SP-600125 (20  $\mu$ M) on ANG II-induced COX-2 protein expression (*A*, top) and mRNA levels (*A*, bottom), pre-pro-ET-1 (*B*) and NOX-1 mRNA levels (*C*), and NOX activity (*D*) in VSMCs from SHR. *E*, bottom: effect of ANG II (100 nM) on phosphorylated (p-)JNK1/2 protein expression; a representative blot is shown (top). *F–H*: effect of Pio (10  $\mu$ M, 18 h) on ANG II-induced p-JNK1/2 protein expression (5 min; *F*), c-Jun mRNA levels (*G*), and nuclear p-c-Jun protein expression (*H*) in VSMCs from SHR. Results are expressed as relative values compared with untreated (0' or Ctrl) cells;  $n = 4–10$ . \* $P < 0.05$  vs. untreated cells. # $P < 0.05$  vs. ANG II by one-way ANOVA or a Student's *t*-test.

ments. Nevertheless, despite the above-mentioned effects of pioglitazone on COX-2, ET-1, and oxidative stress, no changes were observed in blood pressure in SHR. Glitazones have proven blood pressure-lowering effects in patients or animal models of diabetes and/or metabolic syndrome; however, in those conditions in which hypertension is not associated with diabetes or with other factors of metabolic syndrome, no changes in blood pressure have been generally described unless long-term treatment (28, 58) or high doses of PPAR- $\gamma$  agonists (9, 17, 28) were used. It is possible that, although in our model of well-established hypertension pioglitazone did reduce some proinflammatory markers, these mechanisms are before the blood pressure-lowering effect, which is likely to occur with long-term treatment.

Apart from its well-known physiological role, ANG II has been implicated in the pathophysiological processes that occur in hypertension through its significant proinflammatory actions in the vascular wall (45). Using different

models of hypertension, our group and others have previously described increased renal and vascular COX-2 expression, vascular  $O_2^{\cdot-}$  production, and plasmatic malondialdehyde levels (4, 26, 33), which were normalized by treatment with AT<sub>1</sub> receptor antagonists (4, 26), confirming the involvement of ANG II in these increases. Moreover, we (33) have recently shown increased COX-2 expression and oxidative stress in the hypertension model of ANG II-infused mice. Furthermore, it has been previously described that ANG II induces the release of ET-1 (25, 40) and that treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors normalized the increased ET-1 plasma levels found in hypertensive patients (54). The fact that losartan treatment reduced the increased levels of ET-1 found in aortas from SHR confirms that the increased RAS activity described in hypertension contributes to the elevated ET-1 levels in this pathology. The ability of PPAR- $\gamma$  agonists to antagonize the vascular damage promoted by ANG II (15, 48, 58) could contribute to their beneficial effects. In VSMCs, we found

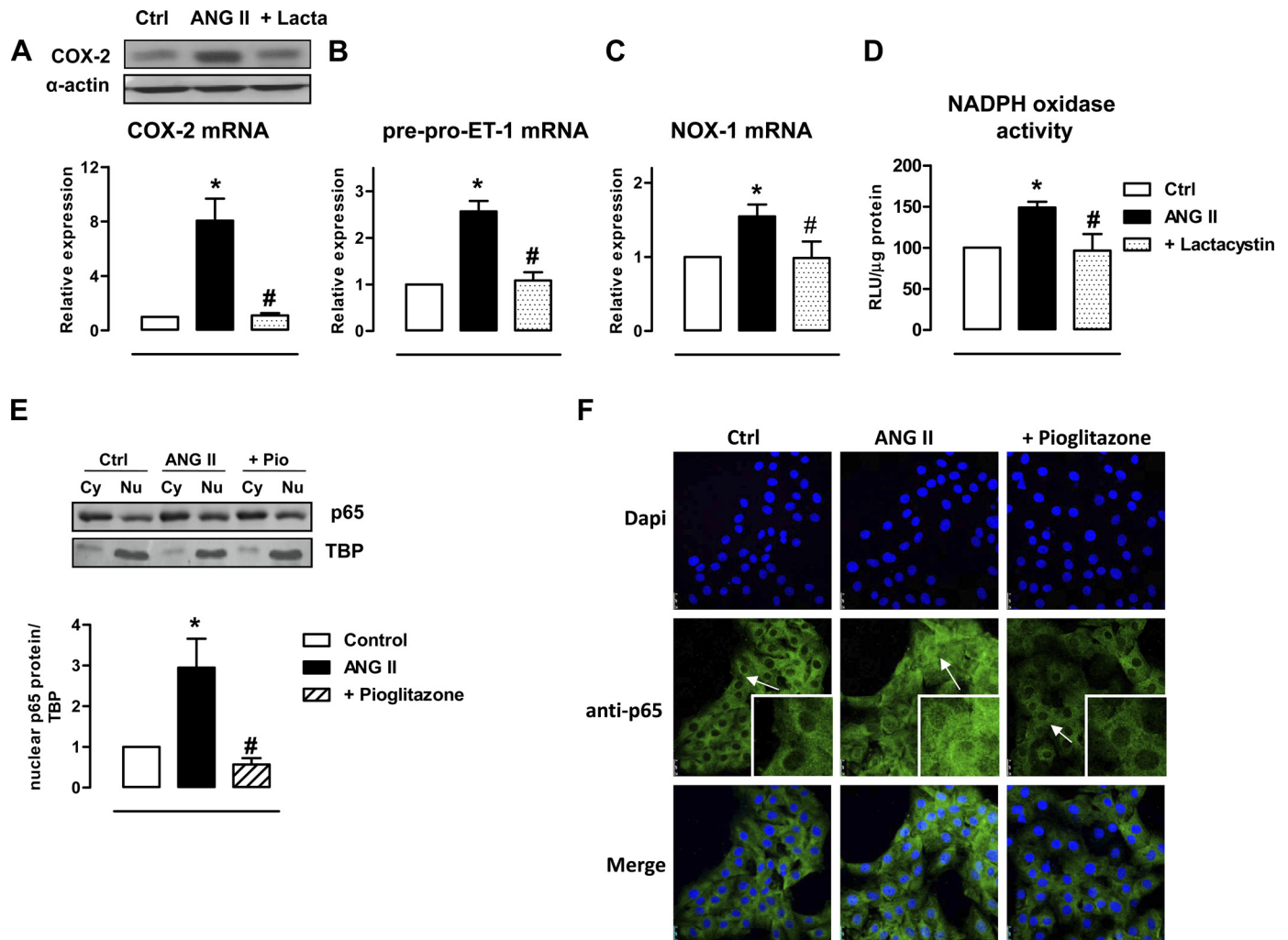


Fig. 6. *A–D*: effect of lactacystin (Lacta; 10  $\mu$ M) on ANG II-induced COX-2 protein expression (*A*, top) and mRNA levels (*A*, bottom), pre-pro-ET-1 (*B*) and NOX-1 mRNA levels (*C*), and NOX activity (*D*) in VSMCs from SHR rats. *E*, bottom: effect of Pio (10  $\mu$ M, 18 h) on nuclear p65 NF- $\kappa$ B protein expression induced by ANG II (100 nM, 40 min) in VSMCs from SHR rats; a representative blot of the cytosolic (Cy) and nuclear (Nu) expression is also shown (top). TATA-binding protein (TBP) cytosolic and nuclear expressions are also shown to guarantee the successful cellular fractioning. *F*: representative photomicrographs of p65 NF- $\kappa$ B immunofluorescence (green) in VSMCs from SHR rats in Ctrl and after incubation with ANG II (100 nM, 40 min) in the absence and the presence of pioglitazone. The insets in *F* are magnified images of the indicated areas (arrows). Results are expressed as relative values compared with untreated (Ctrl) cells;  $n = 4–8$ . \* $P < 0.05$  vs. untreated cells. # $P < 0.05$  vs. ANG II by one-way ANOVA.

that ANG II induced the proinflammatory enzyme COX-2, in a greater extent in cells from SHR rats compared with WKY rats, and pre-pro-ET-1 expression only in cells from SHR rats. In agreement with the *in vivo* data, in cells from SHR rats, pioglitazone reduced the ANG II-induced expression of both COX-2 and ET-1. These results could contribute to the above-mentioned anti-inflammatory effect of glitazones.

It has been proposed that ANG II-induced ET-1 production is important to explain the cardiovascular damage induced by this peptide. Thus, hypertension, proliferation, and renal effects observed after ANG II infusion were attenuated by ET-1 antagonists (7, 36, 40). Moreover, ANG II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis were reduced in endothelial cell-specific ET-1-deficient mice (1). We found that ET-1, acting on ET<sub>A</sub> receptors, contributes to the ANG II-induced COX-2 expression in VSMCs from SHR rats based on the following results: 1) ET-1, via ET<sub>A</sub> receptors, induced COX-2 expression and 2) blockade of ET<sub>A</sub> receptors reduced the ANG II-induced COX-2 expression; however, the

fact that this blocker did not completely abolish such expression suggests that additional mechanisms contribute to this increase. Similarly, ET-1 increases COX-2 expression in mesenteric resistance artery VSMCs from stroke-prone SHR rats but not in those from WKY rats (37). The fact that ET-1 levels were lower in WKY rats compared with SHR rats and that ANG II did not increase ET-1 expression in cells from normotensive rats could contribute to explain the lower COX-2 levels found in aortic segments and VSMCs from SHR rats as well as the lower increase in ANG II-induced COX-2 expression found in VSMCs from this strain.

Furthermore, a relationship between ROS and COX-derived products has been previously described. Thus, ROS can activate COX-2 expression and/or activity (4, 18, 27, 32). Additionally, ROS are also involved in ET-1 gene induction (10), although it has also been previously described that ET-1 can act as a mediator of the vascular inflammatory response by increasing ROS production (29). The specific NOX-1 inhibitor ML-171 (19) and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger catalase prevented the ANG II-induced COX-2

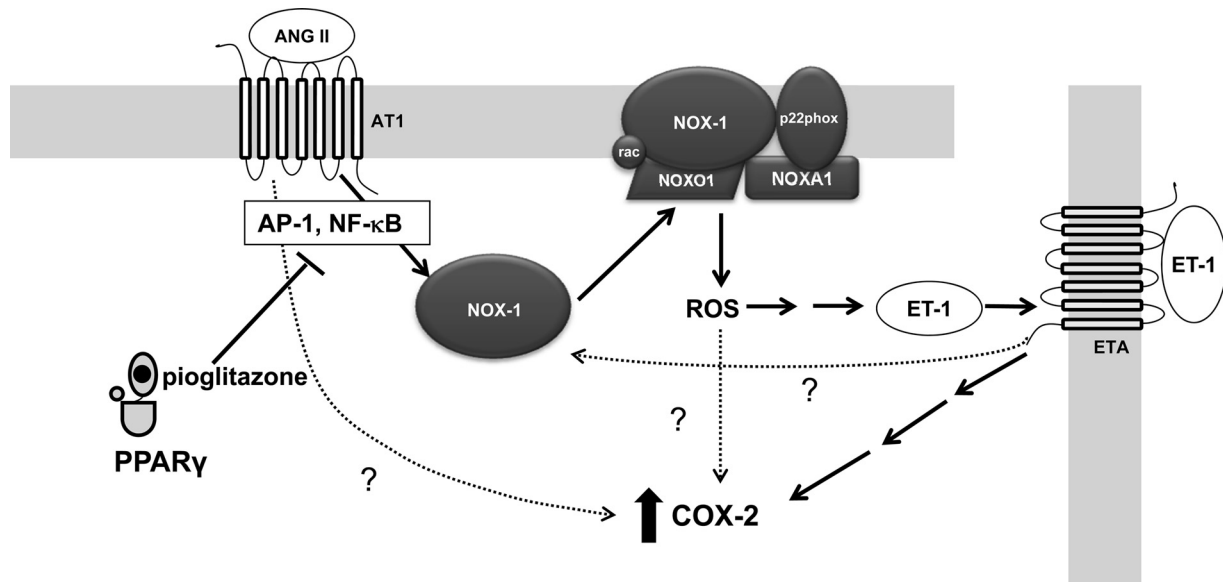


Fig. 7. Scheme illustrating the proposed mechanism by which Pio reduces the greater COX-2 expression observed in hypertension. ANG II, via ANG II type I (AT<sub>1</sub>) receptors, is able to increase both NOX-1 mRNA levels and NOX activity through activator protein (AP)-1 and NF- $\kappa$ B activation. This ROS production increases ET-1 levels, which, via the ET<sub>A</sub> receptor, contribute to the increased COX-2 expression. Pio, by interfering with AP-1 and NF- $\kappa$ B activation, reduces ROS production and ET-1 transcription and, therefore, the subsequent COX-2 expression. This mechanism could contribute to the described anti-inflammatory effects of glitazones. The dashed lines indicate additional mechanisms unexplored in our study. PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ .

and ET-1 gene expression, supporting the involvement of ROS in such inductions. As observed in our *in vivo* study, in SHR VSMCs, pioglitazone reduced the increase in NOX-1 mRNA levels, NOX activity, and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production induced by ANG II, confirming the antioxidant properties of glitazones.

Among the mechanisms proposed to explain the anti-inflammatory effects of PPAR- $\gamma$  activation, transrepression mechanisms by interfering with AP-1 and NF- $\kappa$ B signaling pathways have been proposed (42). AP-1 activation plays a relevant role in ET-1 induction (43, 51). In fact, mutational analysis of the ET-1 gene promoter showed that the AP-1-binding site is an important element in the ET-1 upregulation by different stimuli, such as ANG II (11). Furthermore, the ET-1 promoter also contains at least one functional NF- $\kappa$ B-binding site (43, 51). In support of this, overexpression of the NF- $\kappa$ B p65 subunit leads to an increase in ET-1 transcription levels, whereas overexpression of inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) decreases ET-1 promoter activity (39). On the other hand, activation of both AP-1 and NF- $\kappa$ B by ANG II has been previously described in different cell types (46, 56, 57). In agreement, ANG II increased p-JNK activation, c-Jun mRNA levels, and nuclear p-c-Jun expression in VSMCs from SHRs. Additionally, ANG II also increases nuclear expression of the NF- $\kappa$ B p65 subunit. The fact that treatment with the JNK inhibitor SP-600125 and the proteasome inhibitor lactacystin significantly decreased pre-pro-ET-1 mRNA levels suggests its dependence on both signaling pathways. In addition, the NOX-1 promoter contains AP-1-binding motifs (8, 30), and NF- $\kappa$ B is an essential regulator of NOX-1 (31). Accordingly, NOX-1 mRNA levels as well as NOX activity were reduced using SP-600125 and lactacystin. In support of the role of ROS and ET-1 on ANG II-elicited COX-2 expression, both AP-1 and NF- $\kappa$ B inhibitors also decreased ANG II-induced COX-2 at both mRNA and protein levels. The effect of pioglitazone on ROS and ET-1 seems to be mediated by interference with AP-1 activation, based

on the inhibitory effect of the glitazone on JNK phosphorylation, c-Jun transcription, and p-c-Jun nuclear expression; in addition, pioglitazone also interfered with the NF- $\kappa$ B pathway, as suggested by the reduction of p65 nuclear expression observed. Consequently, and considering that ROS and ET-1 participate in the increased ANG II-induced COX-2 expression in SHR VSMCs, we can conclude that the effect of pioglitazone on ANG II-induced COX-2 expression is due, at least in part, to interference with the AP-1 and NF- $\kappa$ B pathways.

One potential limitation of this study arises from the fact that due to the difficulty of analyzing *in vivo* the mechanisms involved in pioglitazone effects, the experiments were performed in cultured VSMCs. VSMCs in culture can dedifferentiate, and the results obtained might be not predictive of the mechanisms operating in VSMCs *in vivo*. However, despite the possible differences between the *in vivo* and *in vitro* situations, the effects of pioglitazone on COX-2, oxidative stress, and ET-1 were qualitatively similar, suggesting that this model of VSMC cultures mimics the *in vivo* situation; therefore, the results obtained would be similarly valid.

In summary, our study provides evidence that ROS-dependent mechanisms increase ET-1 and that this contributes, among others, to the greater ANG II-induced COX-2 expression observed in conductance vessels from hypertensive animals. In addition, we propose a new mechanism that would contribute to the cardioprotective effects of PPAR- $\gamma$  agonists and go further in knowledge about the involvement and relevance of PPAR- $\gamma$  in the improvement of vascular inflammation associated with hypertension. Thus, glitazones inhibit ANG II-induced COX-2 expression in cells from SHRs associated with downregulation of ROS production and ET-1 levels by interfering with the NF- $\kappa$ B and AP-1 activation pathways, although additional mechanisms cannot be discarded (Fig. 7).

## GRANTS

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación Grant SAF2012-36400 and Instituto de Salud Carlos III Grants Red RECAVA and RIC, RD06/0014/0011, and RD12/0042/0024.

## DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: J.V.P.-G., R.P., A.M., A.A., S.M.-R., and M.T.B. performed experiments; J.V.P.-G., R.P., and M.J.A. analyzed data; J.V.P.-G., R.P., R.H., and M.J.A. interpreted results of experiments; J.V.P.-G. and R.P. prepared figures; J.V.P.-G. and M.J.A. drafted manuscript; J.V.P.-G., R.P., A.M., R.H., A.A., M.T.B., M.S., and M.J.A. edited and revised manuscript; J.V.P.-G., R.P., A.M., R.H., A.A., S.M.-R., M.T.B., M.S., and M.J.A. approved final version of manuscript; R.H., M.S., and M.J.A. conception and design of research.

## REFERENCES

- Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N. ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci* 91: 651–657, 2012.
- Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens* 23: 767–777, 2005.
- Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 153: 926–935, 2008.
- Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 381–388, 2007.
- Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 485–498, 2008.
- Beltrán AE, Briones AM, García-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 27: 142–154, 2009.
- Boesen EI, Krishnan KR, Pollock JS, Pollock DM. ET<sub>A</sub> activation mediates angiotensin II-induced infiltration of renal cortical T cells. *J Am Soc Nephrol* 22: 2187–2192, 2011.
- Cevik MO, Katsuyama M, Kanda S, Kaneko T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Kakehi T, Cui W, Sasaki M, Yabe-Nishimura C. The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 351–355, 2008.
- Chan SH, Wu KL, Kung PS, Chan JY. Oral intake of rosiglitazone promotes a central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 55: 1444–1453, 2010.
- Cheng TH, Cheng PY, Shih NL, Chen IB, Wang DL, Chen JJ. Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. *J Am Coll Cardiol* 42: 1845–1854, 2003.
- Cheng TH, Lin JW, Chao HH, Chen YL, Chen CH, Chan P, Liu JC. Uric acid activates extracellular signal-regulated kinases and thereafter endothelin-1 expression in rat cardiac fibroblasts. *Int J Cardiol* 139: 42–49, 2010.
- Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68: 1089–1100, 2004.
- Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Benetti E, Gallicchio M, Dianzani C, Danni O, Thiemermann C, Fantozzi R. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- $\gamma$  agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 530: 70–80, 2006.
- Deacon K, Knox AJ. Endothelin-1 (ET-1) increases the expression of remodeling genes in vascular smooth muscle through linked calcium and cAMP pathways: role of a phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)/cyclooxygenase-2 (COX-2)/prostacyclin receptor-dependent autocrine loop. *J Biol Chem* 285: 25913–25927, 2010.
- Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Neves MF, Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Circulation* 105: 2296–2302, 2002.
- Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griending KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 45: 1340–1351, 2008.
- Dovinová I, Barancik M, Majzunova M, Zorad S, Gajdosechová L, Gresová L, Cacanyiova S, Kristek F, Balis P, Chan JY. Effects of PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone on redox-sensitive cellular signaling in young spontaneously hypertensive rats. *PPAR Res* 2013: 541871, 2013.
- Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95: 1669–1675, 1995.
- Gianni D, Taulet N, Zhang H, DerMardirossian C, Kister J, Martinez L, Roush WR, Brown SJ, Bokoch GM, Rosen H. A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS Chem Biol* 5: 981–993, 2010.
- Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Galindo P, Quintela AM, López-Sepúlveda R, Romero M, Tamargo J, Vargas F, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. 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, 2012.
- Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Bühler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1: 649–659, 1990.
- Hernanz R, Martín A, Pérez-Girón JV, Palacios R, Briones AM, Miguel M, Salaices M, Alonso MJ. Pioglitazone treatment increases COX-2 derived PGL<sub>2</sub> production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. *Br J Pharmacol* 166: 1303–1319, 2012.
- Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 61: 159–168, 2004.
- Hsu YH, Chen JJ, Chang NC, Chen CH, Liu JC, Chen TH, Jeng CJ, Chao HH, Cheng TH. Role of reactive oxygen species-sensitive extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. *J Vasc Res* 41: 64–74, 2004.
- Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 19: 753–757, 1992.
- Jaimes EA, Zhou MS, Pearse DD, Puzis L, Rajj L. Upregulation of cortical COX-2 in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II and reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F385–F392, 2008.
- Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes* 52: 2570–2577, 2003.
- Kong X, Ma MZ, Qin L, Zhang Y, Li XY, Wang GD, Su Q, Zhang DY. Pioglitazone enhances the blood pressure-lowering effect of losartan via synergistic attenuation of angiotensin II-induced vasoconstriction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*; doi:10.1177/1470320313489061.
- Laplante MA, Wu R, Moreau P, de Champlain J. Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med* 38: 589–596, 2005.
- Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M, Simionescu M. AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22<sup>phox</sup> subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 878–885, 2008.

31. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor- $\kappa$ B in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 901–907, 2010.
32. Martín A, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Palacios R, Briones AM, Fortuño A, Zalba G, Salices M, Alonso MJ. PPAR $\gamma$  activation reduces COX-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J Hypertens* 30: 315–326, 2012.
33. Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 18: 51–65, 2013.
34. Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K. Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 42: 993–1007, 2007.
35. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Relationships among ET-1, PPAR $\gamma$ , oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic animals. *J Smooth Muscle Res* 44: 41–55, 2008.
36. Montanari A, Biggi A, Carra N, Ziliotti M, Fasoli E, Musiari L, Perinotto P, Novarini A. Endothelin-A receptors mediate renal hemodynamic effects of exogenous angiotensin II in humans. *Hypertension* 42: 825–830, 2003.
37. Montezano AC, Amiri F, Tostes RC, Touyz RM, Schiffrin EL. Inhibitory effects of PPAR- $\gamma$  on endothelin-1-induced inflammatory pathways in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *J Am Soc Hypertens* 1: 150–160, 2007.
38. Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Quon MJ, Montagnani M. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. *Diabetes* 55: 3594–3603, 2006.
39. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor- $\kappa$ B in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 49: 1561–1570, 2000.
40. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 30: 29–34, 1997.
41. Rautureau Y, Schiffrin EL. Endothelin in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21: 128–136, 2012.
42. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771: 926–935, 2007.
43. Rodríguez-Pascual F, Busnadiego O, Lagares D, Lamas S. Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacol Res* 63: 463–472, 2011.
44. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res* 43: 300–307, 1999.
45. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15: 159–166, 2006.
46. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT $_1$  knockout mice. *Nephrol Dial Transplant* 16: 27–33, 2001.
47. Sakai S, Miyauchi T, Irukayama-Tomobe Y, Ogata T, Goto K, Yamaguchi I. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activators inhibit endothelin-1-related cardiac hypertrophy in rats. *Clin Sci (Lond)* 103: 16S–20S, 2002.
48. Sakamoto A, Hongo M, Furuta K, Saito K, Nagai R, Ishizaka N. Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model of angiotensin II-induced hypertension. *Int J Cardiol* 167: 409–415, 2013.
49. Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 69: 1733–1744, 2005.
50. Simonin MA, Bordji K, Boyault S, Bianchi A, Guoze E, Bécuwe P, Dauça M, Netter P, Terlain B. PPAR- $\gamma$  ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C125–C133, 2002.
51. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* 25: 16–28, 2011.
52. Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 276: 12440–12448, 2001.
53. Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 45: 19–28, 2006.
54. Uemasu J, Munemura C, Fujihara M, Kawasaki H. Inhibition of plasma endothelin-1 concentration by captopril in patients with essential hypertension. *Clin Nephrol* 41: 150–152, 1994.
55. Yang HB, Zhao XY, Zhang JY, Du YY, Wang XF. Pioglitazone induces regression and stabilization of coronary atherosclerotic plaques in patients with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 29: 359–365, 2012.
56. Yin BL, Hao H, Wang YY, Jiang YJ, Xue S. Downregulating osteopontin reduces angiotensin II-induced inflammatory activation in vascular smooth muscle cells. *Inflamm Res* 58: 67–73, 2009.
57. Zhang J, Fang NY, Gao PJ, Wu LY, Han WQ, Guo SJ, Shen WL, Zhu DL. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists attenuate angiotensin II-induced collagen type I expression in adventitial fibroblasts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 72–77, 2008.
58. Zhang L, Xie P, Wang J, Yang Q, Fang C, Zhou S, Li J. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. *J Biol Chem* 285: 13666–13677, 2010.