



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFFECTOS DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE
LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA
ALDOSTERONA EN UN MODELO *IN VITRO* DE
HIPERTROFIA CARDIACA**

**EFFECTS OF PROANTHOCYANIDINS ON THE
ALTERATIONS PRODUCED BY ALDOSTERONE
IN AN *IN VITRO* MODEL OF CARDIAC
HYPERTROPHY**

Autora: Sara Martín Wieringa

Tutora: Beatriz Martín Fernández

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	1
1.2. LA HIPERTENSIÓN	1
1.2.1. El SRAA.....	1
1.3. LA HIPERTROFIA CARDIACA	4
1.4. LOS POLIFENOLES	6
2. HIPÓTESIS.....	7
3. OBJETIVOS	7
3.1. OBJETIVO GENERAL	7
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. CULTIVOS CELULARES	8
4.1.1. Mantenimiento de la línea celular	8
4.1.2. Congelar y descongelar	9
4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	9
4.3. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR	10
4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL MEDIADOR APOPTÓTICO Bcl-2 Y DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	11
4.4.1. Extracción de RNA	11
4.4.2. Síntesis de cDNA	12
4.4.3. qPCR	12
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
6. RESULTADOS.....	14
6.1. EFECTOS DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR.....	14
6.2. EFECTOS DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MEDIADORES APOPTÓTICOS Y ANTIOXIDANTES	16
6.2.1. Expresión génica de Bcl-2.....	16
6.2.2. Expresión génica de Nrf2.....	17
6.2.3. Expresión génica de SOD-1 y SOD-2.....	18
7. DISCUSIÓN	20
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	23
9. REFERENCIAS.....	24

RESUMEN

La aldosterona presenta efectos oxidantes, pro-inflamatorios y pro-fibróticos que favorecen el desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC), cuyo agravamiento y mantenimiento desemboca en la pérdida de la correcta función del corazón. Por ello, su prevención y tratamiento son vitales. A pesar de que existen tratamientos en la actualidad, es necesario buscar nuevas sustancias que ayuden a frenar su progresión. En este sentido, la utilización de los polifenoles como potentes antioxidantes en el tratamiento de la HC ha cobrado gran importancia. El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos de las proantocianidinas, sobre las alteraciones producidas por la aldosterona en un modelo *in vitro* de HC. Para ello se estimularon cardiomioblastos H9c2 de rata con aldosterona y se co-incubaron con proantocianidinas. Se evaluó la supervivencia celular y la expresión génica de mediadores apoptóticos y antioxidantes. La estimulación con aldosterona redujo la supervivencia celular mientras que la co-incubación con proantocianidinas la normalizó. Además, la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y de enzimas antioxidantes disminuyó con aldosterona y se restauró con las proantocianidinas. Por tanto, podemos concluir que las proantocianidinas parecen estar controlando el aumento de estrés oxidativo inducido por la aldosterona previniendo así la apoptosis y aumentando la supervivencia celular en células H9c2.

PALABRAS CLAVE

Aldosterona, apoptosis, estrés oxidativo, hipertrofia cardíaca, proantocianidinas.

ABSTRACT

Aldosterone has oxidizing, pro-inflammatory and pro-fibrotic effects that favor the development of cardiac hypertrophy (HC), whose aggravation and maintenance results in the loss of correct heart function. Prevention and treatment are therefore vital. Although there are currently treatments, it is necessary to look for new substances that help slow their progression. In this sense, the use of polyphenols as potent antioxidants in the treatment of HC has become very important. The aim of this work is to study the effects of proanthocyanidins on aldosterone alterations in an *in vitro* model of HC. For this purpose, rat cardiomyoblasts H9c2 were stimulated with aldosterone and co-incubated with proanthocyanidins. Cell survival and gene expression of apoptotic and antioxidant mediators were evaluated. Aldosterone stimulation reduced cell survival while co-incubation with proanthocyanidins normalized it. In addition, the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and antioxidant enzymes decreased with aldosterone and was restored with proanthocyanidins. Therefore, we can conclude that proanthocyanidins seem to be controlling the increase in oxidative stress induced by aldosterone, thus preventing apoptosis and increasing cell survival in H9c2 cells.

KEY WORDS

Aldosterone, apoptosis, cardiac hypertrophy, oxidative stress, proanthocyanidins.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo (Jaén-Extremera *et al.*, 2023). Se trata de un término amplio que engloba enfermedades que afectan al sistema cardiovascular (Teo y Rafiq, 2021). Una de las ECV con más prevalencia es la hipertensión arterial (Al Ghorani *et al.*, 2021). A su vez, esta supone un factor de riesgo de accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, arterosclerosis y demencia (Harrison *et al.*, 2022).

1.2. LA HIPERTENSIÓN

El término hipertensión se refiere a valores de presión arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mm Hg y presión arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg (Di Palo y Barone 2022). La hipertensión tiene origen multifactorial, en el que la variación de uno de los factores afecta al resto de ellos (Harrison *et al.*, 2022). Entre estos factores se encuentran el estrés oxidativo y la inflamación, que conducen a la producción de agentes vasoconstrictores, la activación excesiva del sistema nervioso simpático y el manejo anormal del sodio por parte del riñón (Kuémierz *et al.*, 2021). En este sentido, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) juega un papel fundamental ya que se encuentra sobre activado de forma crónica en esta enfermedad (Ames *et al.*, 2019). En situaciones fisiológicas, el SRAA, es vital para mantener la homeostasis del organismo ya que mantiene la concentración plasmática de sodio, la presión arterial y el volumen extracelular en condiciones de equilibrio (Patel *et al.*, 2017).

1.2.1. EL SRAA

El SRAA (Figura 1) es una cascada hormonal que actúa como respuesta a situaciones de presión arterial baja, hipovolemia, privación de sodio y estimulación simpática (Ames *et al.*, 2019; Akhtar *et al.*, 2022).

Esta ruta de señalización comienza con la producción de renina en los riñones, en las células epiteloides yuxtaglomerulares (Sparks *et al.*, 2014). Cuando los barorreceptores detectan una reducción en la presión de perfusión renal se produce un aumento de la síntesis y liberación de renina (Akhtar *et al.*, 2022). Por otra parte, el hígado produce y libera de forma constitutiva

angiotensinógeno (Mirabito Colafella *et al.*, 2019). En general el angiotensinógeno se encuentra en exceso con relación a la renina, por lo que esta última molécula es el paso limitante del SRAA (Ames *et al.*, 2019). La renina escinde el extremo N-terminal del angiotensinógeno produciendo angiotensina I (AngI) (Fountain *et al.*, 2023). A continuación, la enzima convertidora de angiotensina (ACE), liberada por las células endoteliales pulmonares, sintetiza angiotensina II (AngII) a partir de AngI. La angiotensina II actúa a nivel del receptor de angiotensina de tipo 1 (AT₁R) y el de tipo 2 (AT₂R) (Wu *et al.*, 2018).

Se ha comprobado que la AngII tiene efectos sobre la remodelación miocárdica y vascular produciendo hipertrofia y fibrosis, aumenta las especies reactivas de oxígeno (ROS), tiene efectos proinflamatorios, produce disfunción endotelial y aumenta la reabsorción de sodio incrementando la actividad del antiportador H-Na en el túbulo contorneado distal (Fountain *et al.*, 2023). La AngII y una concentración extracelular elevada de K⁺ estimulan la síntesis y secreción de **aldosterona**, que actúa a través del receptor de mineralocorticoides (RM). Esta es la última hormona del sistema y se sintetiza en la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal a partir de colesterol (Ames *et al.*, 2019) aunque también se ha detectado su producción en otros tejidos como el corazón, los vasos sanguíneos y el cerebro (Cachofeiro *et al.*, 2008).

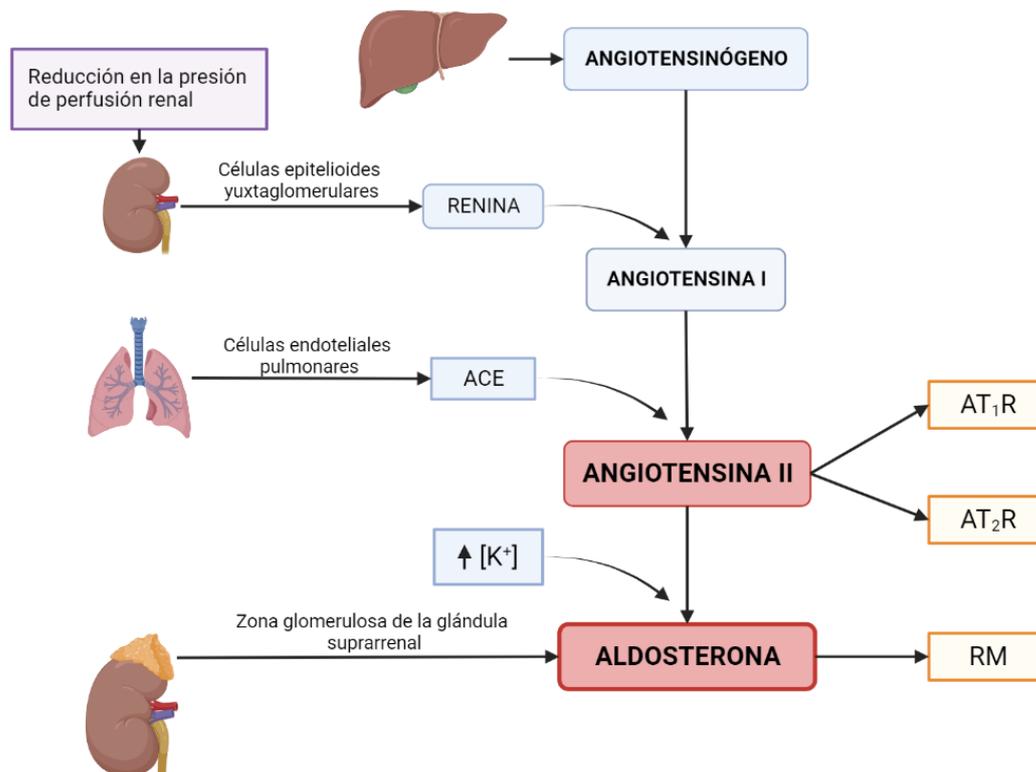


Figura 1. Esquema del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). ACE: Enzima convertidora de angiotensina; AT1R: Receptor de angiotensina de tipo 1; AT2R: Receptor de angiotensina de tipo 2; RM: Receptor de mineralocorticoides; K⁺: Potasio. Elaboración propia mediante Biorender.

El exceso de aldosterona en situaciones patológicas tiene consecuencias negativas sobre el sistema cardiovascular:

- Disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (NO). Se produce por una reducción en la producción de NO (inhibición de la enzima sintasa endotelial de NO) así como por la inactivación del NO por parte de ROS (Cachofeiro *et al.*, 2008). Esta molécula presenta diversas funciones biológicas entre las que destacan la modulación del tono vascular, la vasodilatación y la permeabilidad vascular y la reducción en su disponibilidad causa disfunción endotelial (Wu *et al.*, 2020).
- Aumento del estrés oxidativo incrementando la producción de ROS de las células, mediante la traslocación a la membrana de las subunidades p47phox y p67phox de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Cachofeiro *et al.*, 2008). Esta enzima tiene la capacidad de transportar electrones a través de la membrana plasmática y generar ROS (Bedard y Krause 2007) Además, la expresión de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa 1 y 2 (SOD-1 y 2) también se ve alterada (Hsieh *et al.*, 2022). Estas enzimas se pueden emplear como marcadores que permiten comprobar el estrés oxidativo al que se ven sometidas las células y su capacidad de respuesta. El aumento del estrés oxidativo va a suponer una reducción de la biodisponibilidad del NO, la activación de las metaloproteinasas y contribuye al daño tisular lo que conlleva disfunción endotelial y remodelación vascular (Pinheiro y Oliveira-Paula 2020).
- Activa la vía p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno), dando como respuesta un aumento del factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), el cual en última instancia ocasiona fibrosis (Vanderpool *et al.*, 2017). Otro efecto de la vía p38 MAPK es la producción de ROS (Tsai *et al.*, 2021).
- Activa la vía ERK1/2 (quinasa regulada por señal extracelular), que a su vez también se ve estimulada por las ROS (Okoshi *et al.*, 2004). En principio ERK1/2 es un factor favorable a la supervivencia celular y contribuye a la regulación positiva de la proliferación y diferenciación celular, pero se ha comprobado que también tiene funciones proapoptóticas (Xu *et al.*, 2016). El motivo por el cual toma dos caminos tan diferentes puede ser que los sustratos ERK1/2 aguas abajo presenten distintas funciones y la selección de estos sustratos dependa del tipo celular y la naturaleza de los estímulos (Xu *et al.*, 2016).

- Disfunción mitocondrial, la cual se ha asociado al desarrollo y progresión de la remodelación vascular (Tsai *et al.*, 2021).
- Activa el factor nuclear kappa (NF-k), activando la transcripción de genes proinflamatorios (Cachofeiro *et al.*, 2008). NF-k está formado por diferentes subunidades, una de ellas es p65 (Giridharan y Srinivasan 2018). Esta subunidad puede ser empleada como marcador de inflamación.
- Produce alteraciones en la actividad del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), un factor de transcripción implicado en la expresión de numerosas enzimas antioxidantes, como SOD-1 y SOD-2 y que inhibe la actividad de NF-κB al interferir con su actividad transcripcional y bloquear la unión de NF-κB a los promotores de genes proinflamatorios (Rodrigues *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2021; Vashi y Patel 2021; Binder *et al.*, 2022).
- Desarrollo del síndrome metabólico, el cual implica resistencia a insulina, alteraciones en el metabolismo de los lípidos, incremento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Petramala *et al.*, 2020). Estos factores afectan al metabolismo energético del miocardio y a la producción y consumo de ATP por parte de los cardiomiocitos.
- Induce la muerte celular por apoptosis en cardiomiocitos (Xiao *et al.*, 2013). Uno de los marcadores de apoptosis más importante es Bcl-2. Bcl-2 forma parte de la familia de proteínas Bcl-2, que se encargan de la regulación de la apoptosis ya que integran señales de supervivencia y muerte que se generan en el interior y exterior celular. Esta familia de proteínas divide en dos clases: miembros proapoptóticos como Bax, los cuales desencadenan la apoptosis y miembros antiapoptóticos como Bcl-2 que protegen a las células de la apoptosis (Borner 2003).

Cuando estos efectos se mantienen en el tiempo producen disfunción endotelial, inflamación, remodelado vascular y en última instancia **hipertrofia cardiaca** (Cachofeiro *et al.*, 2008).

1.3. LA HIPERTROFIA CARDIACA

La hipertrofia cardiaca (HC) consiste en el aumento del tamaño del corazón como respuesta al aumento de la presión arterial (Zhu *et al.*, 2019; Akhtar *et al.*, 2022).

Este proceso se puede dar en situaciones **fisiológicas**, como el embarazo o en deportistas, siendo en estos casos reversible, pero también se puede dar de forma **patológica** e irreversible (Nakamura y Sadoshima 2018).

En cuanto a la **HC patológica** existen diversos factores o situaciones que la promueven, como la activación del sistema simpático, la resistencia a la insulina y la sobre activación del RAAS, especialmente la aldosterona (Llancaqueo 2012). Esta hormona juega un papel clave en el desarrollo de HC. Por una parte, participa en la reabsorción de Na^+ y H_2O por el riñón y un exceso de esta reabsorción favorece que se mantenga la situación de hipertensión y consecuente HC (Figura 2). Por otra parte, a través de los RM de los cardiomiocitos produce inflamación, oxidación y fibrosis (Catena *et al.*, 2014).

La HC patológica se caracteriza por cambios tanto en el fenotipo de los cardiomiocitos como en la composición de la matriz extracelular (Zhu *et al.*, 2019). En cuanto a los cardiomiocitos se produce hipertrofia en todos sus diámetros. Por otra parte, se alteran la composición de la matriz extracelular, especialmente se aumenta considerablemente la síntesis de colágeno dando lugar a fibrosis. Esto supone una grave alteración de la arquitectura cardíaca, aumentando su rigidez y afectando a su correcto funcionamiento (Kruszewska *et al.*, 2022).

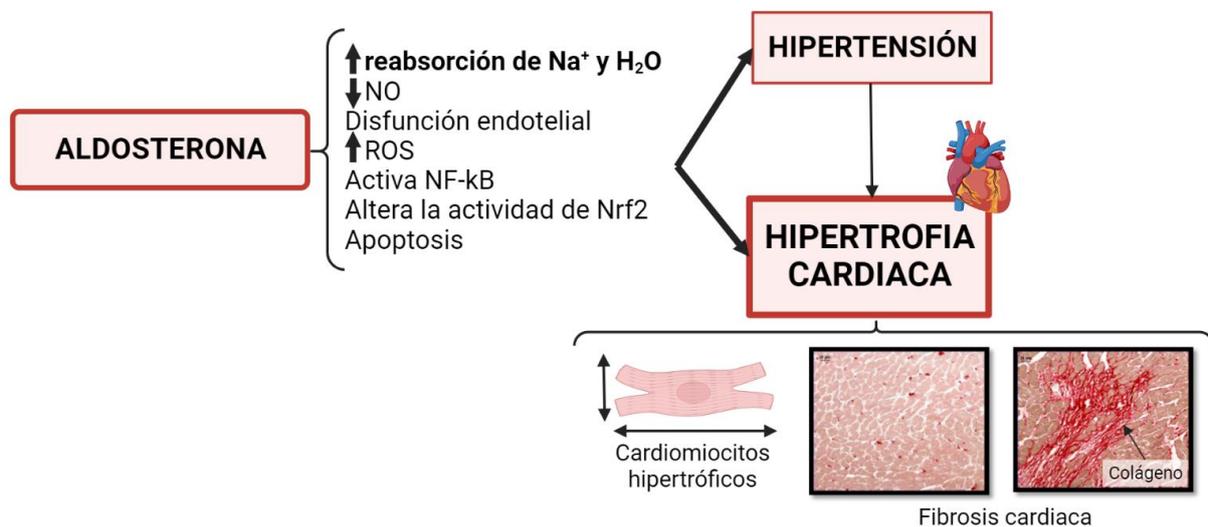


Figura 2. Principales efectos de la aldosterona y su influencia sobre la hipertensión e hipertrofia cardiaca. Principales características de la hipertrofia cardiaca. Elaboración propia mediante Biorender.

El agravamiento y mantenimiento de la HC desemboca en la pérdida de la correcta función del corazón: disfunción diastólica, sistólica y finalmente, insuficiencia cardiaca (Zhuang *et al.*, 2022). Por este motivo es importante la prevención y tratamiento de la hipertensión y la

HC. No obstante, la dificultad para frenar el avance y/o revertir la HC, y por tanto las alteraciones funcionales derivadas, a pesar de los tratamientos actuales disponibles, genera la necesidad de buscar mecanismos subyacentes y de identificar nuevas dianas terapéuticas. En este sentido, la utilización de los **polifenoles** como potentes antioxidantes en el tratamiento de las ECV ha cobrado gran importancia en los últimos años (Jenkins *et al.*, 2021).

1.4. LOS POLIFENOLES

Como se ha mencionado anteriormente, el estrés oxidativo y las ROS están aumentados en situaciones donde hay un exceso de aldosterona. Por este motivo reducir el estrés oxidativo y las ROS podría ser una diana terapéutica interesante.

Los polifenoles son un extenso grupo de metabolitos secundarios de las plantas los cuales se encuentran involucrados en la defensa de las plantas, incluyendo actividades antioxidantes y antibacterianas y se ha demostrado que algunos de ellos ejercen actividades biológicas en humanos (Grosso *et al.*, 2022). Dentro de los polifenoles encontramos las **proantocianidinas** (figura 3), un tipo de flavonoide altamente antioxidante encontrado generalmente en la piel de las uvas, las manzanas y los arándanos entre otros (Tsao. 2010).

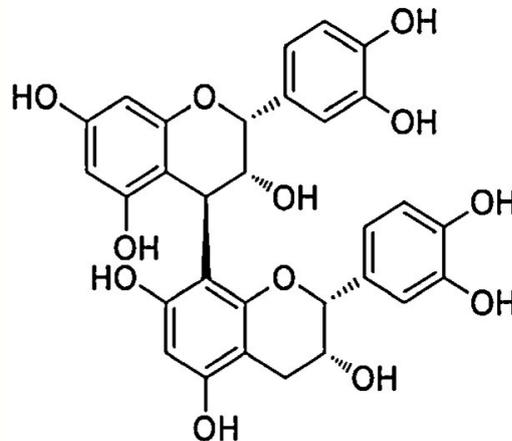


Figura 3. Estructura genérica de las proantocianidinas. Tomado de Rauf *et al.* (2019).

Las proantocianidinas actúan como potentes antioxidantes que neutralizan los radicales libres producidos (Shirasi-Tehrani *et al.*, 2022), además son solubles en agua y se pueden extraer de forma natural (Li *et al.*, 2015). Las células también producen sus propias enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa (Zinellu y Mangoni 2021). Dentro de estas últimas enzimas se encuentran la SOD-1 y SOD-2, las cuales

se ha comprobado que ven aumentada su expresión por la acción de las proantocianidinas (de Moraes Arnosó *et al.*, 2022).

Así mismo, en un modelo animal de HC producido por la administración de aldosterona a ratas, se ha demostrado que el tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas es capaz de mejorar la función cardíaca y disminuir todos los procesos patológicos asociados (fibrosis, inflamación y oxidación) (de Las Heras *et al.*, 2021). No obstante, aún no son bien conocidos los mecanismos a través de los cuales las proantocianidinas ejercen sus efectos beneficiosos en un contexto de ECV.

2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo nos planteamos la hipótesis de que las proantocianidinas podrían mejorar las alteraciones producidas por la aldosterona en un modelo *in vitro* de HC.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de las proantocianidinas sobre las alteraciones celulares y moleculares producidas por la aldosterona en células cardíacas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Valorar la supervivencia celular de las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas.
- 2- Analizar la expresión génica de mediadores apoptóticos y antioxidantes en las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CULTIVOS CELULARES

Se cultivaron cardiomioblastos H9c2 (CRL-1446™, ATCC, EE. UU) embrionarios de rata (figura 4) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU). El medio completo se preparó añadiendo al medio DMEM un 1% de glutamina 200 Mm (Gibco™, Paisley, Reino Unido), 10% de FBS (Gibco™, Paisley, Reino Unido) inactivado al 10 X y 200 μ L de penicilina y estreptomina (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) ambas a una concentración de 250000 μ g/mL.

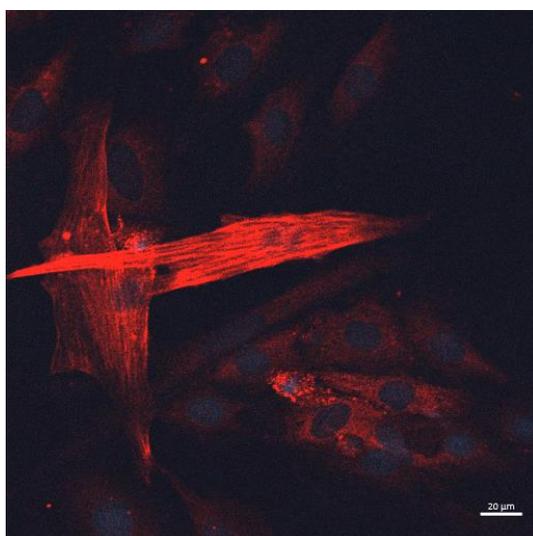


Figura 4. Imagen representativa de cardiomioblastos H9c2 embrionarios de rata incubados con troponina T tras una inmunocitoquímica para observar diferenciación celular.

Todos los procedimientos realizados con las células o con reactivos se realizaron en cabina de seguridad biológica. Todo fue desinfectado con alcohol 70%. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada, al 5% de CO₂ y 95% de aire.

4.1.1. Mantenimiento de la línea celular

El cultivo se mantuvo en placas p100, con un volumen final de 10 mL por placa, y se pasaban al alcanzar una confluencia del 80%. Para pasar las células se retiraba el medio, se lavaba con PBS 1X de modo que se retiraban los restos de medio para que no inhibieran la acción de la tripsina. Se añadían 1,5 mL de tripsina 2X (Gibco™, Paisley, Reino Unido) y se incubaba 5 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se inactivaba la tripsina añadiendo el mismo volumen de

medio completo. Las células se resuspendían en este volumen y se transferían a un tubo falcon. Se añadía medio adicional en función del pase a realizar. En este caso se realizaron pases con dilución 1:3, por lo que se añadía medio hasta 30 mL. En cada placa se sembraban 10 mL de esta dilución.

4.1.2. Congelar y descongelar

En pases bajos, cuando había exceso de células, estas se congelaban. Para ello se seguía el mismo protocolo que para pasar las células hasta el paso de bloquear la tripsina con el mismo volumen de medio completo. Tras esto, se transfería la suspensión de células a un tubo falcon y se centrifugaba durante 5 minutos a 1000 rpm. Se retiraba el sobrenadante y se resuspendía el pellet en medio completo con un 5% de DMSO (Sigma-Aldrich®, Madrid, España), obteniendo una concentración de 1000000 de células por mL. Se añadía 1 mL de esta dilución por criovial y se ponía rápidamente a -20 °C para evitar que las células se dañasen con el DMSO. Tras 24 horas se pasaban los crioviales a -80 °C y pasadas 24 horas más se ponían finalmente en nitrógeno líquido, donde se pueden almacenar por largos periodos de tiempo.

Para descongelar se ponía el criovial bajo agua templada durante no más de 2 minutos. Se añadía el contenido a un falcon con medio completo de modo que el volumen final eran 10 mL. Se centrifugaba durante 5 minutos a 1000 rpm y se descarta el sobrenadante. De esta forma se eliminaba el DMSO, que es tóxico para las células. El pellet se resuspendía en 10 mL de medio y se sembraba en una p100.

4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon cardiomioblastos H9c2 embrionarios de rata cultivados en medio completo en placas de 96 pocillos para los ensayos de supervivencia y de 12 para el análisis de la expresión génica del mediador apoptótico Bcl-2 y de enzimas antioxidantes. A las 24 horas se cambiaba el medio completo por medio de arresto, igual que el medio completo, pero sin FBS, de modo que se detenía el crecimiento celular. Tras 24 horas más se retiraba el medio de arresto y se aplicaban los siguientes estímulos:

- Control: medio de arresto.
- Aldosterona 800 nM.
- Proantocianidinas 100 nM.

- Proantocianidinas 1000 nM.
- Aldosterona 800 nM y Ppoantocianidinas 100 nM.
- Aldosterona 800 nM y Ppoantocianidinas 1000 nM.

Para preparar estos tratamientos se diluía el stock de aldosterona y proantocianidinas (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) en medio de arresto. Las células se incubaban con los estímulos durante 48 horas, tras las cuales se procedió a realizar las pruebas oportunas. El tamaño de la muestra era de seis muestras por tratamiento (n = 6).

4.3. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Para este estudio se empleó el kit de supervivencia XTT (Pan Reac ApplyCherm ITW Reagents, Darmstadt, Alemania). Se trata de un ensayo colorimétrico que detecta la actividad metabólica celular. Las células viables reducen mediante enzimas deshidrogenasas la sal amarilla de tetrazolio XTT (2,3,-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazolio sódico) a un colorante de formazán muy potente. La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células viables de la muestra. La cantidad de este colorante se cuantifica midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 475 nm empleando un lector de placas (SYNERGY H1, BioTek® Instruments Inc., Winooski, EE. UU). Así mismo, se mide la absorbancia del fondo a una longitud de onda de 660 nm.

Para obtener la dosis de trabajo de aldosterona y el tiempo de exposición, se realizaron una serie de estudios piloto. Para esto se sembraron 2 placas de 96 pocillos y se aplicaron los tratamientos: aldosterona 200 nM, aldosterona 500 nM y aldosterona 800 nM (6 pocillos por condición experimental). Una de las placas se analizó a las 24 horas de poner los tratamientos y la restante a las 48 horas.

Una vez determinada la concentración de aldosterona y el tiempo de exposición a emplear se aplicaron los tratamientos indicados en la figura 5. Pasadas 48 horas de la adición de los mismos, se siguieron los pasos del kit de supervivencia XTT indicados por el fabricante para la determinación del % de supervivencia de cada condición experimental.

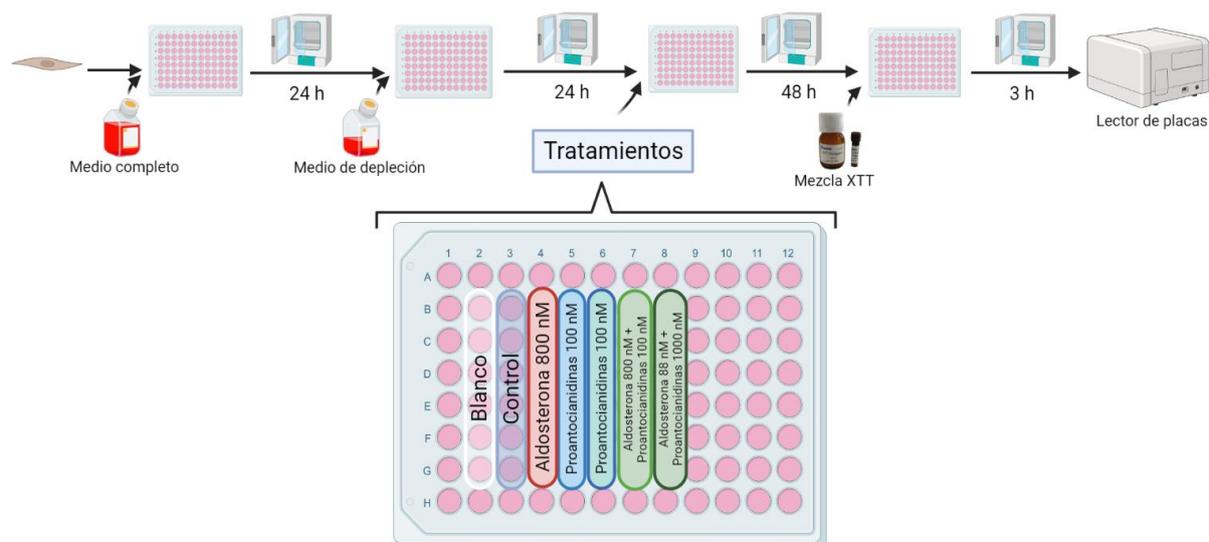


Figura 5. Esquema de la metodología y tratamientos empleados para la determinación de la supervivencia celular. Elaboración propia mediante Biorender.

La cuantificación de la supervivencia se realizó por medio de la absorbancia. La absorbancia final es la diferencia de la absorbancia a 475 nm, la absorbancia a 660 nm y la absorbancia del blanco.

$$Absorbancia = Absorbancia_{475} - Absorbancia_{blanco}_{475} - Absorbancia_{660}$$

El valor de la absorbancia del control (células sin tratamiento) se tomó como el 100% de supervivencia y de forma proporcional a este valor se calculó el porcentaje de supervivencia celular de cada una de las condiciones experimentales.

4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL MEDIADOR APOPTÓTICO Bcl-2 Y DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Se sembraron placas de 12 pocillos, con los tratamientos descritos en la figura 6. A las 24 horas de la siembra de las placas se aplicó medio de depleción. 24 horas después se añadieron los tratamientos y se dejaron 48 horas. Tras esto se procedió a la extracción del RNA.

4.4.1. Extracción de RNA

En primer lugar, se llevó a cabo el lisado de las células añadiendo 1 mL de TRI-REAGEN (Thermo Scientific™, Vilna, Lituania) en cada pocillo. Se pasó el contenido de cada pocillo a un tubo eppendorf. Se incubó durante 5 minutos a Tª ambiente de modo que se obtuvo una disociación completa.

A continuación, se produjo la separación en dos fases, para lo cual se añadieron 200 μL de cloroformo (Labbox labware s.l., Barcelona, España) en el eppendorf y se agitó en vórtex. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a T^{a} ambiente y después se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se recogió la fase acuosa (sobrenadante).

El siguiente paso fue la precipitación de RNA. Se añadió isopropilo (Labbox labware s.l., Barcelona, España) de forma que la proporción en el tubo era 1:1. Se agitó en el vórtex y se incubó durante 10 minutos a T^{a} ambiente. Después se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g a 4 $^{\circ}\text{C}$. Tras esto se llevó a cabo un lavado del RNA, para lo cual se desechó el sobrenadante y se añadió 1mL de etanol al 75% (Labbox labware s.l., Barcelona, España). Se agitó la mezcla en el vórtex y a continuación se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g a 4 $^{\circ}\text{C}$. Por último, se desechó el etanol (sobrenadante), se resuspendió el RNA en 100 μL de agua libre de RNAsa/DNAsa (InvitrogenTM, Paisley, Reino Unido) y se cuantificó la cantidad de RNA en el Nanodrop (NanoDropTM 1000, Thermo ScientificTM, Wilmington, DE, EE. UU).

4.4.2. Síntesis de cDNA

Se diluyeron las muestras de RNA de modo que la concentración final era de 100 ng/ μL . A continuación, en un tubo de PCR se mezclaron 9 μL de la muestra de RNA y 10 μL de 2X RT Buffer Mix y 1 μL de 20 X RT Enzyme Mix, del High-Capacity RNA-to-cDNATM Kit (Thermo ScientificTM, Vilna, Lituania). Luego se llevó al termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, Singapur), programado previamente con los siguientes ciclos de temperatura: 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min y finalmente 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta la recogida de las muestras.

4.4.3. qPCR

Se tomaron las muestras de cDNA obtenidas en el paso anterior y se añadieron 2 μL de estas diluidas 1:10 en la placa de qPCR. En cada pocillo también se añadieron 10 μL de SYBR Green (Thermo ScientificTM, Vilna, Lituania), 1 μL del oligo forward 10 μM , 1 μL del oligo reverse 10 μM (Thermo ScientificTM, Madrid, España), y 6 μL de agua libre de DNAsa/RNAsa. Una vez la placa estaba preparada se pone en la qPCR (QuantStudio 1, Applied Biosystems, Singapur). Se analizaron 4 muestras de cada condición por triplicado. Los oligos y tratamientos empleados fueron los indicados en la tabla 1 y figura 6 respectivamente.

Antes de llevar a cabo la qPCR se realizó un análisis bioinformático de los oligos mediante primer BLAST (National Library of Medicine, Bethesda, MD, EE. UU) para determinar su especificidad, temperatura de anillamiento y tamaño de amplicón (tabla 1). Además, se comprobó su especificidad realizando una primera qPCR de la que se obtuvieron las curvas de melting y llevando a cabo la reacción en ausencia de cDNA para detectar cualquier contaminación cruzada o amplificación.

Tabla 1. Secuencias de oligos (F: Forward; R: Reverse), temperatura de anillamiento y tamaño de amplicón de los genes GADPH, Bcl-2, SOD-1, SOD-2 y Nrf2 utilizados en la reacción de qPCR.

Nombre del oligo	Secuencia del oligo (5'-3')	Temperatura de anillamiento (C°)	Tamaño de amplicón (bp)
GADPH	F: ATGGGAAGCTGGTCATCAAC	58	221
	R: GTGGTTCACACCCATCACAA		
Bcl-2	F: GACTGAGTACCTGAACCGGCATC	62	135
	R: CTGAGCAGCGTCTTCAGAGACA		
SOD-1	F: GGTGAACCAGTTGTGTTGTC	57	203
	R: CCGTCCTTCCAGCAGTC		
SOD2	F: CAGACCTGCCTTACGACTATGG	61	113
	R: CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT		
Nrf2	F: ACTCCCAGGTTGCCACAT	60	106
	R: GCAAGCGACTCATGGTCAT		

En este análisis se emplea como gen de referencia el GADPH y se calcula la expresión relativa del resto de genes mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \frac{(Ct_{Gen\ diana} - Ct_{Gen\ referencia})_{Muestra\ tratada}}{(Ct_{Gen\ diana} - Ct_{Gen\ referencia})_{Control}}$$

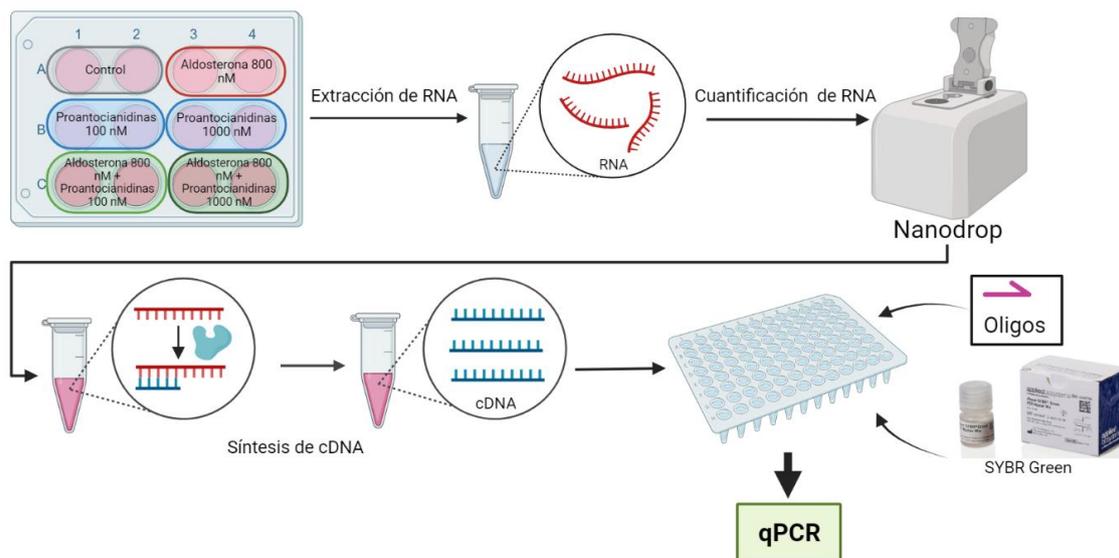


Figura 6. Esquema de la metodología y tratamientos empleados para el análisis de expresión génica de los principales mediadores pro-inflamatorios, oxidantes y apoptóticos mediante qPCR. Elaboración propia mediante Biorender.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó un ANOVA de una vía, además de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Un valor $p < 0.05$ se consideró significativo. Todos los análisis y los gráficos se realizaron en Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc. CA, USA).

6. RESULTADOS

6.1. EFECTOS DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

En los estudios piloto realizados para determinar la dosis de trabajo de aldosterona y el tiempo de exposición, se obtuvieron los resultados observados en la figura 7. La supervivencia de las células tratadas con aldosterona 800 nM durante 48 horas, fue menor ($p < 0,05$) que el control a 48 horas. Además, la supervivencia disminuía ($p < 0,05$) en las células tratadas con aldosterona 800 nM durante 48 horas con respecto a las células tratadas con aldosterona 800 nM durante 24 horas. En el caso de las células estimuladas con aldosterona 200 nM a las 24 y 48 horas, 500 nM a las 24 y 48 horas y 800 nM a las 24 horas, la supervivencia no varía respecto a los controles.

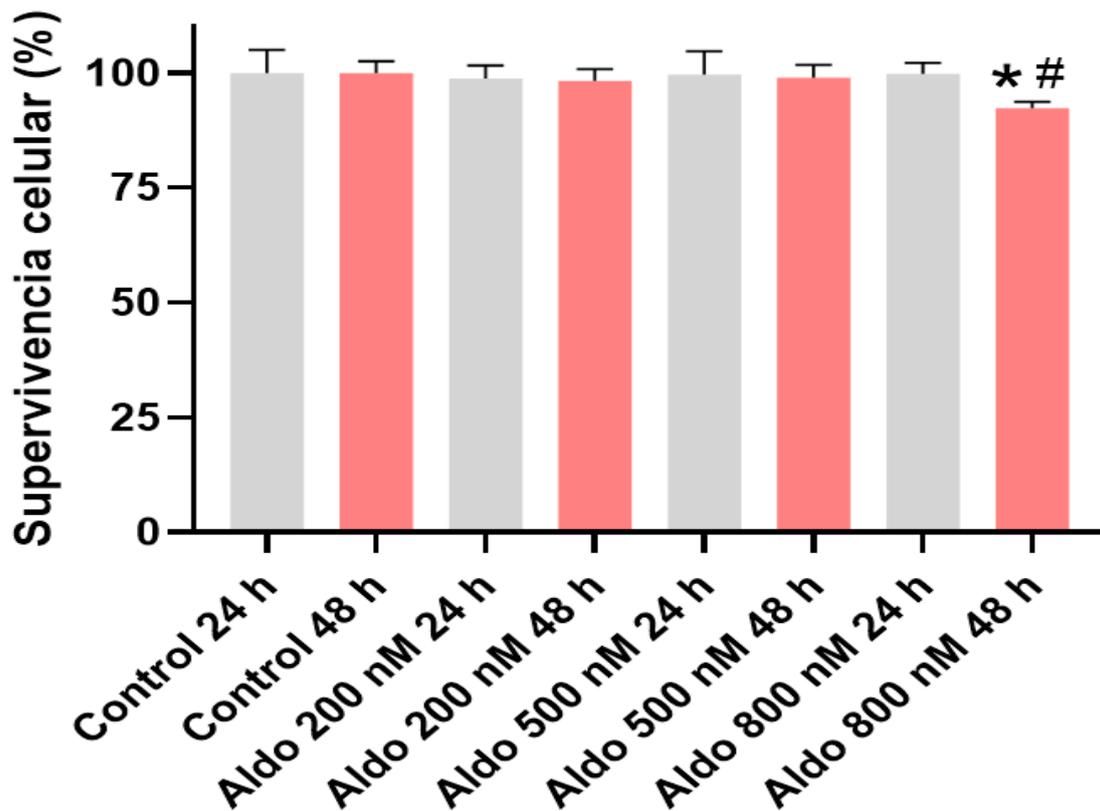


Figura 7. Supervivencia celular (%) en cultivos tratados estimuladas con aldosterona a diferentes concentraciones (200 nM, 500 nM y 800 nM) y distintos tiempos de exposición (24 y 48 horas). *P < 0,05 vs Control 48 h; # P < 0,05 vs Aldo 800 nM 24 h.

Como se observa en la figura 8, la supervivencia de las células tratadas con aldosterona 800 nM fue menor ($p < 0,05$) que el control. Además, no se vieron diferencias significativas entre el control y las células tratadas con proantocianidinas 100 nM y 1000 nM. En el caso de las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas la supervivencia aumentó ($p < 0,05$) respecto a las tratadas con aldosterona en el caso de la concentración de proantocianidinas más elevada, es decir, la supervivencia celular se normalizó.

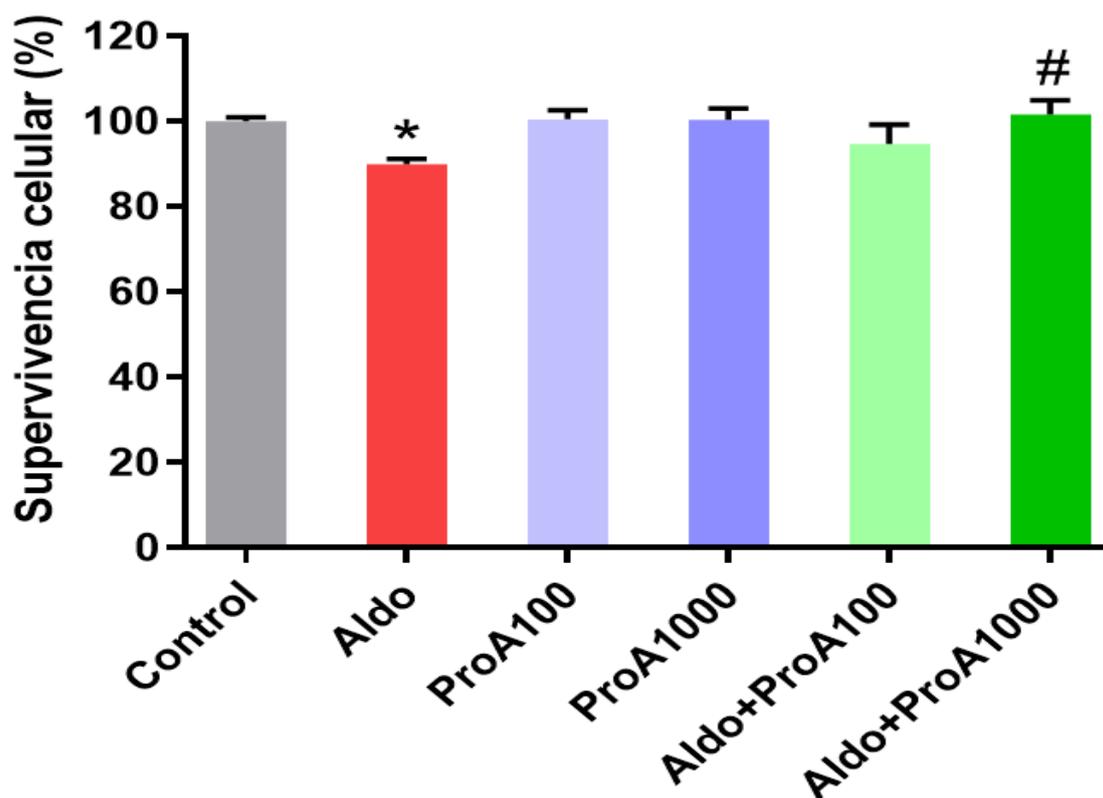


Figura 8. Supervivencia celular (%) en cultivos tratados estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas. Los tratamientos empleados son aldosterona 800 nM (Aldo), proantocianidinas 100 nM (ProA100), proantocianidinas 1000 nM (ProA1000), aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 100 nM (Aldo+ProA100) y aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 1000 nM (Aldo+ProA1000). *p < 0,001 vs Control; # P < 0,05 vs Aldo.

6.2. EFECTOS DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MEDIADORES APOPTÓTICOS Y ANTIOXIDANTES

6.2.1. Expresión génica de Bcl-2

Como se puede observar en la figura 9, el grupo Aldo muestra una clara tendencia a disminuir la expresión relativa de Bcl-2 comparado con el grupo Control. En cuanto a las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas la expresión de Bcl-2 aumentó hasta llegar a normalizar con proantocianidinas 1000 nM (p < 0,05).

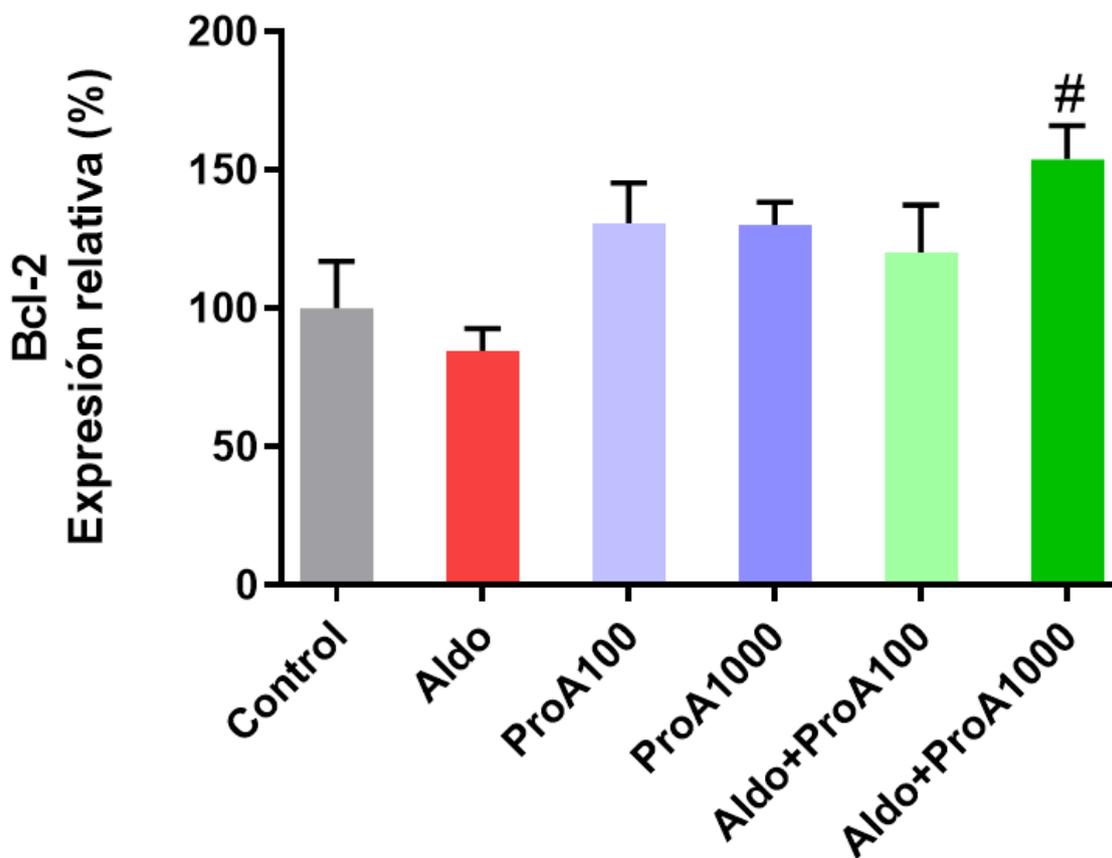


Figura 9. Expresión relativa de Bcl-2 (%) en cultivos tratados estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas. Los tratamientos empleados son aldosterona 800 nM (Aldo), proantocianidinas 100 nM (ProA100), proantocianidinas 1000 nM (ProA1000), aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 100 nM (Aldo+ProA100) y aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 1000 nM (Aldo+ProA1000). # $P < 0,05$ vs Aldo.

6.2.2. Expresión génica de Nrf2

En la figura 10 se puede comprobar que la expresión relativa de Nrf2 aumentó ($p < 0,05$) en las células estimuladas con aldosterona con respecto al control. En células tratadas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas se pudo apreciar un claro descenso ($p < 0,05$) de la expresión de Nrf2 en ambas concentraciones de proantocianidinas respecto a las células incubadas solamente con aldosterona.

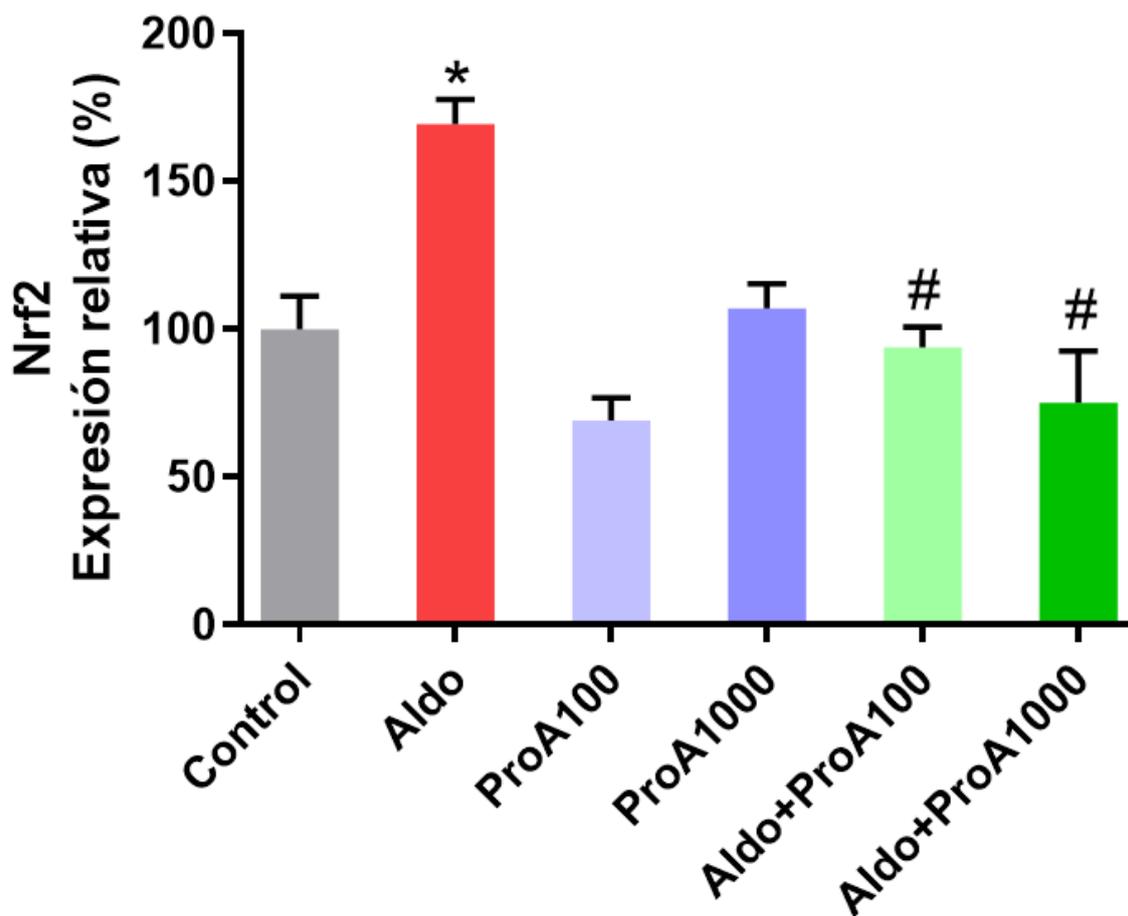


Figura 10. Expresión relativa de Nrf2 (%) en cultivos tratados estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas. Los tratamientos empleados son aldosterona 800 nM (Aldo), proantocianidinas 100 nM (ProA100), proantocianidinas 1000 nM (ProA1000), aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 100 nM (Aldo+ProA100) y aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 1000 nM (Aldo+ProA1000). * $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs Aldo.

6.2.3. Expresión génica de SOD-1 y SOD-2

La expresión relativa de la SOD-1 disminuyó ($p < 0,05$) en las células estimuladas con aldosterona con respecto al control (figura 11). En células tratadas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas se pudo apreciar un claro aumento ($p < 0,05$) de la expresión de SOD-1 en ambas concentraciones de proantocianidinas respecto a las células tratadas con aldosterona. También se pudo apreciar que tanto el tratamiento con proantocianidinas, como el tratamiento con aldosterona y co-incubación con proantocianidinas aumentaron la expresión de SOD-1 ($p < 0,05$) respecto al control.

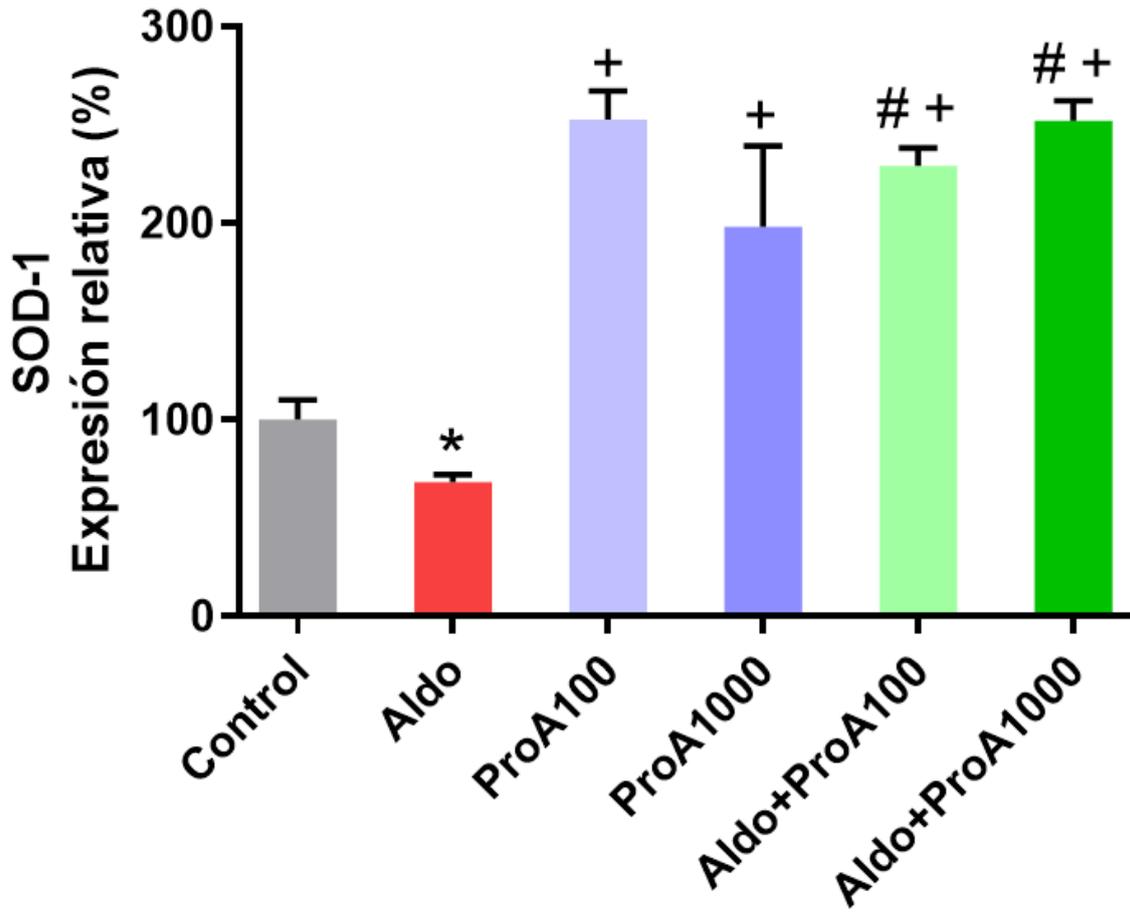


Figura 11. Expresión relativa de SOD-1 (%) en cultivos tratados estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas. Los tratamientos empleados son aldosterona 800 nM (Aldo), proantocianidinas 100 nM (ProA100), proantocianidinas 1000 nM (ProA1000), aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 100 nM (Aldo+ProA100) y aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 1000 nM (Aldo+ProA1000). * $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs Aldo; + $p < 0,05$ vs Control.

De forma similar, la expresión de SOD-2 disminuyó ($p < 0,05$) en las células tratadas con aldosterona respecto al control (figura 12). A diferencia de SOD-1, en este caso no se advirtieron diferencias significativas entre el control y las células tratadas con proantocianidinas 100 nM y 1000 nM. Las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas la expresión de SOD-2 aumentó hasta llegar a normalizar con proantocianidinas 1000 nM ($p < 0,05$).

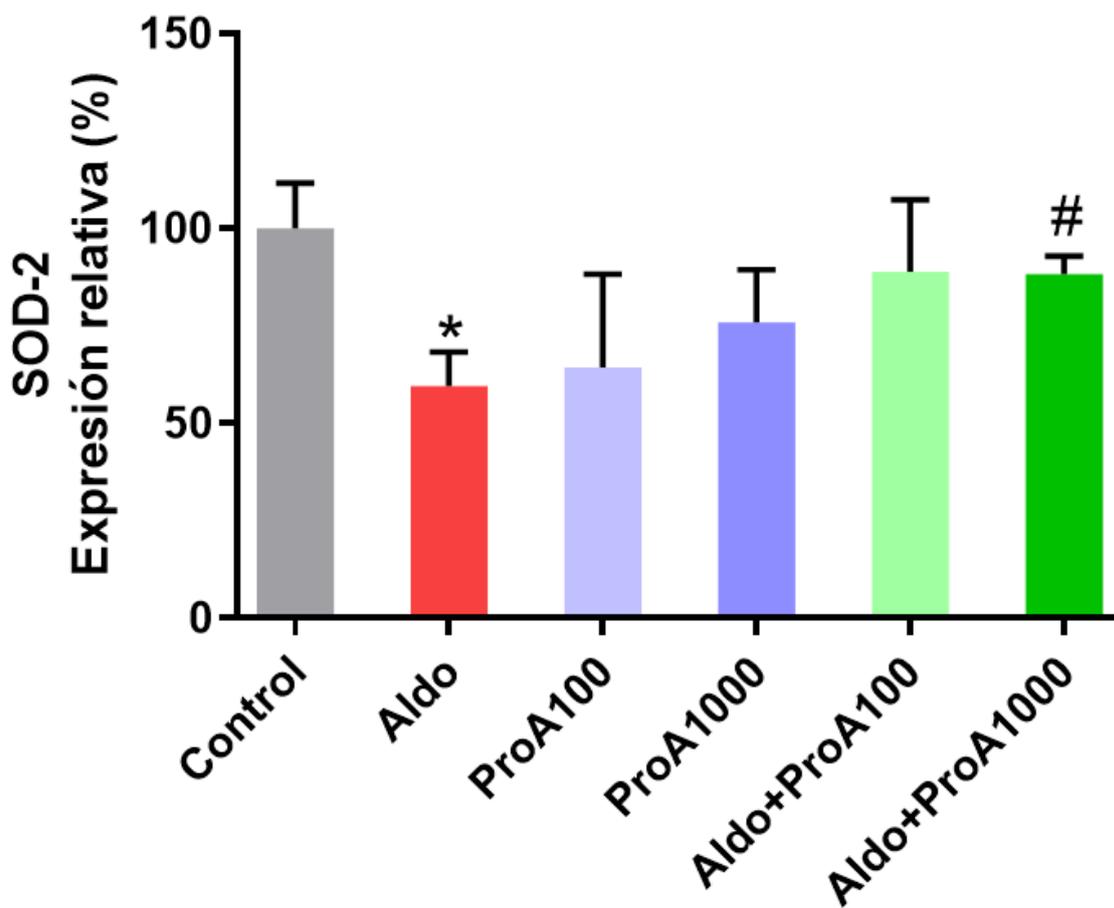


Figura 12. Expresión relativa de SOD-2 (%) en cultivos tratados estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas. Los tratamientos empleados son aldosterona 800 nM (Aldo), proantocianidinas 100 nM (ProA100), proantocianidinas 1000 nM (ProA1000), aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 100 nM (Aldo+ProA100) y aldosterona 800 nM co-incubado con proantocianidinas 1000 nM (Aldo+ProA1000). *p < 0,05 vs Control; # p < 0,05 vs Aldo.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha observado que la co-incubación con proantocianidinas de células estimuladas con aldosterona previene la disminución de la supervivencia celular. Este efecto parece estar mediado por la estimulación de la expresión génica de Bcl-2, del factor de transcripción Nrf2 y de las enzimas antioxidantes SOD-1 y SOD-2.

La co-incubación con proantocianidinas 1000 nM normalizó la supervivencia celular de las células estimuladas con aldosterona.

Los resultados del trabajo muestran que la estimulación de las células H9c2 con aldosterona reduce su supervivencia. Esto concuerda con lo visto en estudios previos, en los que se observó que la aldosterona induce la muerte celular en cardiomiocitos, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Xiao *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017; de Las Heras *et al.*, 2021). Esta pérdida de cardiomiocitos es un paso clave en el desarrollo de HC patológica (Li *et al.*, 2017). Además, en el ensayo de supervivencia celular se vio que el tratamiento con proantocianidinas aumenta la supervivencia celular en células estimuladas con aldosterona hasta llegar a normalizar con proantocianidinas a concentración 1000 nM. Estudios previos han señalado los beneficios de los polifenoles frente a la pérdida de supervivencia celular en la HC. Por ejemplo, en el estudio de Sheng *et al.* (2013) se determinó que la supervivencia celular aumentaba en un modelo *in vivo* de HC producido por constricción aórtica, cuando se trataba con galato de epigallocatequina, el componente principal de los polifenoles presentes en el té verde. Raut *et al.* (2020) determinaron que la supervivencia celular disminuía en células H9c2 estimuladas con H₂O₂ y aumentaba cuando eran co-incubadas con resveratrol. Ren *et al.* (2022) comprobaron que este último polifenol aumentaba la supervivencia celular en un modelo animal de HC producido por la administración de isoprenalina, un agonista de los receptores β -adrenérgicos. En el presente trabajo se muestra que las proantocianidinas son capaces de prevenir la muerte celular inducida por la aldosterona en las células H9c2 hasta niveles normalizados.

Los cambios en la supervivencia celular observados en nuestro trabajo parecen estar mediados, al menos en parte, por la proteína antiapoptótica Bcl-2. Bcl-2 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 y protege a las células de la apoptosis favoreciendo la supervivencia celular (Borner 2003). En nuestro trabajo observamos que, aunque no se alcanzaron diferencias significativas, las células estimuladas con aldosterona presentaron una clara tendencia a tener niveles de Bcl-2 menores respecto al control. En un estudio previo llevado a cabo en cardiomiocitos de rata neonatal incubados con aldosterona, Ferron *et al.* (2011) observaron que la expresión proteica de Bcl-2 se reducía considerablemente. En un estudio similar, pero en células endoteliales de la vena umbilical humana incubadas con aldosterona Zhang *et al.* (2021) comprobaron que la expresión de Bcl-2 se reducía.

Por otra parte, las proantocianidinas fueron capaces de aumentar la expresión relativa de Bcl-2 hasta valores normalizados. Se ha visto que el resveratrol aumenta la expresión de Bcl-2 en un modelo animal de HC producido por la administración de isoprenalina (Ren *et al.*, 2022). Este resultado nos indica que los efectos beneficiosos de las proantocianidinas frente a la

muerte celular inducida por exceso de aldosterona pueden estar mediados, al menos en parte, por la regulación de la expresión génica de Bcl-2.

La aldosterona aumenta la expresión de Nrf2 y la co-incubación con proantocianidinas normaliza la expresión de este factor de transcripción.

Las células estimuladas con aldosterona presentaron una expresión relativa de Nrf2 aumentada en comparación con el grupo Control. En esta misma línea, Queisser *et al.* (2014), comprobaron que el tratamiento con aldosterona aumenta la actividad de Nrf2 en células renales tanto *in vivo* como *in vitro*. La co-incubación con proantocianidinas 100 nM y 1000 nM normalizó la expresión de Nrf2. En este sentido, nuestros resultados contrastan con los obtenidos en el estudio de Liao *et al.* (2019), en el que se determinó que el tratamiento con miricetina, un tipo de polifenol, aumentaba la actividad de Nrf2 en un modelo *in vivo* de HC producido por constricción aórtica. Esta diferencia en los resultados obtenidos puede deberse a que las vías oxidativas/antioxidantes son complejas, unido a los distintos modelos de estudio utilizados y compuestos antioxidantes utilizados. Además, la disminución en la expresión de Nrf2 en las células co-incubadas con proantocianidinas se puede deber a que el estrés oxidativo se ve aliviado por otras vías ya que se observa que SOD-1 y SOD-2 sí aumentan su expresión y por tanto no se activaría la expresión de este factor de transcripción.

Las proantocianidinas aumentan la capacidad antioxidante de las células estimuladas con aldosterona.

En el estudio de la expresión de SOD-1 y SOD-2 se observó que la aldosterona disminuye la expresión de ambas enzimas. En un estudio de Ren *et al.* (2019) se comprobó que la expresión de SOD-1 y SOD-2 disminuía en un modelo *in vivo* de HC inducida por isoprenalina respecto a los animales (ratas Sprague Dawley) control. En un estudio similar, pero generando el modelo mediante constricción aórtica, Choudhary *et al.* (2008) obtuvieron resultados similares. Además, la aldosterona podría ser uno de los principales autores de la disminución de la capacidad antioxidante de las células en estos modelos, ya que, tanto la isoprenalina como la constricción aórtica, producirían una sobreactivación del RAAS y, por ende, una mayor cantidad de aldosterona.

Por otra parte, la co-incubación con proantocianidinas aumentó la expresión de SOD-1 y SOD-2 en células estimuladas con aldosterona. Esto coincide con lo visto en el estudio de de Moraes Arnoso *et al.* (2022) en el que empleaban un extracto rico en proantocianidinas, que

mejoraba el remodelado cardiovascular en ratones obesos acompañado de un aumento de la expresión de SOD-1 y SOD-2. SOD-1 y SOD-2 son enzimas antioxidantes, que se encargan de descomponer las ROS. Estas inducen daños graves en las células y promueven la activación de ERK1/2 y p38 MAPK (Son *et al.*, 2013). Se ha comprobado que la activación de la cascada de señalización ERK1/2 presenta un papel clave en el desarrollo de HC y fibrosis (Xu *et al.*, 2016). También se ha comprobado que la estimulación de ERK1/2 produce la activación de proteínas proapoptóticas como las Bax (Lu y Xu 2006). En nuestro trabajo, la co-incubación con proantocianidinas 1000 nM llegó a normalizar los niveles de SOD-2. En el caso de la SOD-1 su expresión relativa aumentó muy por encima del control en las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas tanto con proantocianidinas 100 nM como con 1000 nM. Así mismo, se observó que la incubación exclusivamente con proantocianidinas aumentaba la expresión de SOD-1 significativamente respecto al control. Por tanto, los resultados sugieren que las proantocianidinas aportan una gran capacidad antioxidante disminuyendo el estado pro-oxidante inducido por la aldosterona en nuestro modelo de HC *in vitro*. Por tanto, una reducción de la expresión de enzimas antioxidantes como son las SOD-1 y SOD-2 conllevaría un aumento de las ROS y activación de la vía ERK1/2 y como consecuencia de esto un aumento de la expresión de proteínas proapoptóticas.

Además, hemos observado que las proantocianidinas restauran e incluso aumentan la expresión de SOD-1 y SOD-2, enzimas que se encargan de eliminar ROS y por tanto no se activaría por esta vía ERK1/2 y consecuentemente no estimularía la expresión de proteínas proapoptóticas. Por tanto, las proantocianidinas podrían estar favoreciendo la supervivencia celular a través de la expresión de Bcl-2 o indirectamente estimulando la expresión de SOD-1 y SOD-2. Estos resultados van en el mismo sentido que el estudio de Chu *et al.* (2017), en el que comprobaron que el ácido tánico, un polifenol presente en vino tinto y té, aumentaba la actividad de SOD y la expresión de Bcl-2 mientras que regulaba a la baja la activación de ERK1/2 en un modelo de HC *in vivo* producido por constricción aórtica.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

1. En este trabajo se ha comprobado que las proantocianidinas aumentan la supervivencia celular en células H9c2 estimuladas con aldosterona. Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por el aumento de la expresión génica de Bcl-2 y de las enzimas antioxidantes SOD-1 y SOD-2.

2. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se podría proponer que la generación de un ambiente más antioxidante debido a la presencia de las proantocianidinas, contribuye al aumento de la expresión génica de Bcl2 lo que se traduciría en un aumento de la supervivencia celular disminuida por la aldosterona.
3. Siguiendo esta línea de investigación se deberían llevar a cabo nuevos experimentos para determinar la oxidación total, la localización celular de Nrf2 y analizar otros posibles marcadores que induzcan la transcripción de SOD-1 y SOD-2. Por otra parte, sería realmente interesante comprobar el efecto de las proantocianidinas en modelos *in vivo* de hipertrofia cardíaca, en los que se puedan analizar sus efectos a nivel fisiológico.

9. REFERENCIAS

- Akhtar, H., Al Sudani, H., Hussein, M., Farhan, M. U. N. y Elkholy, K. (2022) “Effects of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibition on Left Ventricular Hypertrophy, Diastolic Function, and Functional Status in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy: A Systematic Review”, *Cureus*, 14(7): 26642. doi: 10.7759/cureus.26642.
- Al Ghorani H., Kulenthiran S., Lauder L., Böhm M. y Mahfoud, F. (2021) “Hypertension trials update”, *J Hum Hypertens*, 35(5), pp. 398-409. doi: 10.1038/s41371-020-00477-1.
- Ames, M. K., Atkins, C. E. y Pitt, B. (2019) “The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression”, *J Vet Intern Med*, 33(2), pp.363-382. doi: 10.1111/jvim.15454.
- Bedard, K. y Krause, K. H. (2007) “The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology”, *Physiological reviews*, 87(1), pp. 245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
- Binder, P., Nguyen, B., Collins, L., Zi, M., Liu, W., Christou, F., Luo, X., Hille, S. S., Frey, N., Cartwright, E. J., Chernoff, J., Müller, O. J., Guan, K. y Wang, X. (2022) “Pak2 Regulation of Nrf2 Serves as a Novel Signaling Nexus Linking ER Stress Response and Oxidative Stress in the Heart”, *Frontiers in cardiovascular medicine*, 9: 851419. doi: 10.3389/fcvm.2022.851419.
- Borner, C. (2003) “The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions”, *Molecular immunology*, 39(11), pp. 615–647. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00252-3.
- Cachofeiro, V., Miana, M., de Las Heras, N., Martín-Fernández, B., Ballesteros, S., Fernández-Tresguerres, J. y Lahera, V. (2008) “Aldosterone and the vascular system”, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 109(3-5), pp. 331-5. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.03.005.
- Catena, C., Colussi, G., Nait, F., Martinis, F., Pezzutto, F. y Sechi, L. A. (2014) “Aldosterone and the heart: still an unresolved issue?”, *Front Endocrinol*, 5:168. doi: 10.3389/fendo.2014.00168.
- Chen, F., Wang, H., Zhao, J., Yan, J., Meng, H., Zhan, H., Chen, L. y Yuan, L. (2019) “Grape seed proanthocyanidin inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via attenuating inflammation: in vivo and in vitro studies”, *J Nutr Biochem*, 67, pp. 72-77. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.01.013.
- Choudhary, R., Palm-Leis, A., Scott, R. C., 3rd, Guleria, R. S., Rachut, E., Baker, K. M. y Pan, J. (2008) “All-trans retinoic acid prevents development of cardiac remodeling in aortic banded rats by inhibiting the renin-

angiotensin system. American journal of physiology”, *Heart and circulatory physiology*, 294(2), pp. 633–644. doi: 10.1152/ajpheart.01301.2007.

Chu, L., Li, P., Song, T., Han, X., Zhang, X., Song, Q., Liu, T., Zhang, Y. y Zhang, J. (2017) “Protective effects of tannic acid on pressure overload-induced cardiac hypertrophy and underlying mechanisms in rats”, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 69(9), pp. 1191–1207. doi: 10.1111/jphp.12763.

de Las Heras, N., Galiana, A., Ballesteros, S., Olivares-Álvaro, E., Fuller, P.J., Lahera, V. y Martín-Fernández, B. (2021) “Proanthocyanidins Maintain Cardiac Ionic Homeostasis in Aldosterone-Induced Hypertension and Heart Failure”, *Int J Mol Sci*, 22(17):9602. doi: 10.3390/ijms22179602.

de Moraes Arnosso, B. J., Magliaccio, F. M., de Araújo, C. A., de Andrade Soares, R., Santos, I. B., de Bem, G. F., Fernandes-Santos, C., Ognibene, D. T., de Moura, R. S., Resende, A. C., Daleprane, J. B. y Costa, C. A. D. (2022) “Açaí seed extract (ASE) rich in proanthocyanidins improves cardiovascular remodeling by increasing antioxidant response in obese high-fat diet-fed mice”, *Chemico-biological interactions*, 351: 109721. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109721.

Di Palo, K. E. y Barone, N. J. (2022) “Hypertension and Heart Failure: Prevention, Targets, and Treatment”, *Cardiol Clin*, 40(2), pp. 237-244. doi: 10.1016/j.ccl.2021.12.011.

Ferron, L., Ruchon, Y., Renaud, J. F. y Capuano, V. (2011) “T-type Ca²⁺ signalling regulates aldosterone-induced CREB activation and cell death through PP2A activation in neonatal cardiomyocytes”, *Cardiovasc Res*, 90(1), pp. 105-12. doi: 10.1093/cvr/cvq379.

Fountain, J. H., Kaur, J. y Lappin, S. L. (2023) “Physiology, Renin Angiotensin System”, *StatPearls Publishing*. PMID: 29261862.

Giridharan, S. y Srinivasan, M. (2018) “Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation” *J Inflamm Res*, 11, pp. 407-419. doi: 10.2147/JIR.S140188.

Grosso, G., Godos, J., Currenti, W., Micek, A., Falzone, L., Libra, M., Giampieri, F., Forbes-Hernández, T. Y., Quiles, J. L., Battino, M., La Vignera, S. y Galvano, F. (2022) “The Effect of Dietary Polyphenols on Vascular Health and Hypertension: Current Evidence and Mechanisms of Action”, *Nutrients*, 14(3), pp. 545. doi: 10.3390/nu14030545.

Harrison, D. G., Coffman, T. M. y Wilcox, C. S. (2021) “Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond”, *Circ Res*, 128(7), pp. 847-863. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318082.

Hsieh, P. L., Chu, P. M., Cheng, H. C., Huang, Y. T., Chou, W. C., Tsai, K. L. y Chan, S. H. (2022) “Dapagliflozin Mitigates Doxorubicin-Caused Myocardium Damage by Regulating AKT-Mediated Oxidative Stress, Cardiac Remodeling, and Inflammation”, *Int J Mol Sci*, 23(17), pp. 10146. doi: 10.3390/ijms231710146.

Jaén-Extremera, J., Afanador-Restrepo, D. F., Rivas-Campo, Y., Gómez-Rodas, A., Aibar-Almazán, A., Hita-Contreras, F., Carcelén-Fraile, M. D. C., Castellote-Caballero, Y. y Ortiz-Quesada, R. (2023) “Effectiveness of Telemedicine for Reducing Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *J Clin Med*, 12(3), pp. 841. doi: 10.3390/jcm12030841.

Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C. y Sievenpiper, J. L. (2021) “Plant Polyphenols Lignans and Cardiovascular Disease”, *J Am Coll Cardiol*. 78(7), pp.679-682. doi: 10.1016/j.jacc.2021.06.014.

Kruszewska, J., Cudnoch-Jedrzejewska, A. y Czarzasta, K. (2022) “Remodeling and Fibrosis of the Cardiac Muscle in the Course of Obesity-Pathogenesis and Involvement of the Extracellular Matrix”, *Int J Mol Sci*, 23(8), pp. 4195. doi: 10.3390/ijms23084195.

Kuémierz, J., Frąk, W., Młynarska, E., Franczyk, B. y Rysz, J. (2021) “Molecular Interactions of Arterial Hypertension in Its Target Organs”, *Int J Mol Sci*, 22(18), pp. 9669. doi: 10.3390/ijms22189669.

Li, S., Xu, M., Niu, Q., Xu, S., Ding, Y., Yan, Y., Guo, S. y Li, F. (2015) “Efficacy of Procyanidins against In Vivo Cellular Oxidative Damage: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *PLoS One*, 10(10), pp. 0139455. doi: 10.1371/journal.pone.0139455.

- Li, X., Lan, Y., Wang, Y., Nie, M., Lu, Y. y Zhao, E. (2017) “Telmisartan suppresses cardiac hypertrophy by inhibiting cardiomyocyte apoptosis via the NFAT/ANP/BNP signaling pathway”, *Mol Med Rep*, 15(5), pp. 2574-2582. doi: 10.3892/mmr.2017.6318.
- Liao, H. H., Zhang, N., Meng, Y. Y., Feng, H., Yang, J. J., Li, W. J., Chen, S., Wu, H. M., Deng, W. y Tang, Q. Z. (2019) “Myricetin Alleviates Pathological Cardiac Hypertrophy via TRAF6/TAK1/MAPK and Nrf2 Signaling Pathway”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 6304058. doi: 10.1155/2019/6304058.
- Llancaqueo, V. M. (2012) “Left ventricular hipertrophy and cardiovascular risk factor in hypertensive patients”, *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(6), pp. 707-714.
- Lu, Z. y Xu, S. (2006) “ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis”, *IUBMB Life*, 58, pp. 621-631. doi: 10.1080/15216540600957438.
- Mirabito Colafella, K. M., Bovée, D. M. y Danser, A. H. J. (2019) “The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets”, *Exp Eye Res*, 186:107680. doi: 10.1016/j.exer.2019.05.020.
- Nakamura, M. y Sadoshima, J. (2018) “Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy”, *Nat Rev Cardiol*, 15, pp. 387–407.
- Okoshi, M. P., Yan, X., Okoshi, K., Nakayama, M., Schuldt, A. J., O'Connell, T. D., Simpson, P. C. y Lorell, B. H. (2004) “Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy”, *Journal of cardiac failure*, 10(6), pp. 511–518. doi: 10.1016/j.cardfail.2004.03.002.
- Patel S., Rauf A., Khan H. y Abu-Izneid T. (2017) “Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies”, 94, pp. 317-325. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.091.
- Petramala, L., Concistrè, A., Olmati, F., Saracino, V., Chimenti, C., Frustaci, A., Russo, M. A. y Letizia, C. (2020) “Cardiomyopathies and Adrenal Diseases”, *Int J Mol Sci*, 21(14), pp. 5047. doi: 10.3390/ijms21145047.
- Pinheiro, L. C. y Oliveira-Paula, G. H. (2020) “Sources and Effects of Oxidative Stress in Hypertension”, *Curr Hypertens Rev*, 16(3), pp. 166-180. doi: 10.2174/1573402115666190531071924.
- Queisser, N., Oteiza, P. I., Link, S., Hey, V., Stopper, H. y Schupp, N. (2014) “Aldosterone activates transcription factor Nrf2 in kidney cells both in vitro and in vivo”, *Antioxidants & redox signaling*, 21(15), pp. 2126–2142. doi: 10.1089/ars.2013.5565.
- Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Iahtisham-Ul-Haq., Patel, S., Pan, X., Naz, S., Sanches Silva, A., Saeed, F. y Rasul Suleria, H. A. (2019) “Proanthocyanidins: A comprehensive review”, *Biomed Pharmacother*, 116:108999. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108999.
- Raut, G. K., Manchineela, S., Chakrabarti, M., Bhukya, C. K., Naini, R., Venkateshwari, A., Reddy, V. D., Mendonza, J. J., Suresh, Y., Nallari, P. y Bhadra, M. P. (2020) “Imine stilbene analog ameliorate isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and hydrogen peroxide-induced apoptosis”, *Free Radic Biol Med*, 153, pp. 80-88. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.014.
- Ren, S., Shen, L., Lin, S., Xiao, D., Xiao, W., Yan, P. M., Zhang, Y. Y., Jia, W. W. y Lin, Y. (2022) “Mechanistic analysis of resveratrol in cardiac hypertrophy by network pharmacology and animal experiments”, *Mol Med Rep*, 26(5), pp. 324. doi: 10.3892/mmr.2022.12840.
- Ren, Y., Chen, X., Li, P., Zhang, H., Su, C., Zeng, Z., Wu, Y., Xie, X., Wang, Q., Han, J., Guo, S., Liu, B. y Wang, W. (2019) “Si-Miao-Yong-An decoction ameliorates cardiac function through restoring the equilibrium of SOD and NOX2 in heart failure mice”, *Pharmacological research*, 146, 104318. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104318.
- Rodrigues, D., Costa, T. J., Silva, J. F., Neto, J. T. O., Alves, J. V., Fedoce, A. G., Costa, R. M. y Tostes, R. C. (2021) “Aldosterone Negatively Regulates Nrf2 Activity: An Additional Mechanism Contributing to Oxidative Stress and Vascular Dysfunction by Aldosterone”, *Int J Mol Sci*, 22(11), pp. 6154. doi: 10.3390/ijms22116154.

- Sheng, R., Gu, Z. L. y Xie, M. L. (2013) “Epigallocatechin gallate, the major component of polyphenols in green tea, inhibits telomere attrition mediated cardiomyocyte apoptosis in cardiac hypertrophy”, *Int J Cardiol*, 162(3), pp. 199-209. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.07.083.
- Shirazi-Tehrani, E., Chamasemani, A., Firouzabadi, N. y Mousaei, M. (2022) “ncRNAs and polyphenols: new therapeutic strategies for hypertension”, *RNA Biol*, 19(1), pp. 575-587. doi: 10.1080/15476286.2022.2066335.
- Son, Y., Kim, S., Chung, H. T. y Pae, H. O. (2013) “Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases”, *Methods in enzymology*, 528, pp. 27–48. doi: 10.1016/B978-0-12-405881-1.00002-1.
- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsoy, M. y Coffman, T. M. (2014) “Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology”, *Compr Physiol*, 4(3), pp. 1201-28. doi: 10.1002/cphy.c130040.
- Tan, Y., Wan, H. H., Sun, M. M., Zhang, W. J., Dong, M., Ge, W., Ren, J. y Peng, H. (2021) “Cardamonin protects against lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction in mice through Nrf2-regulated mechanism”, *Acta Pharmacol Sin*, 42(3), pp. 404-413. doi: 10.1038/s41401-020-0397-3.
- Teo, K. K. y Rafiq, T. (2021) “Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries”, *Can J Cardiol*, 37(5), pp. 733-743. doi: 10.1016/j.cjca.2021.02.009.
- Tsai, C. H., Pan, C. T., Chang, Y. Y., Peng, S. Y., Lee, P. C., Liao, C. W., Shun, C. T., Li, P. T., Wu, V. C., Chou, C. H., Tsai, I. J., Hung, C. S. y Lin, Y. H. (2021) “Aldosterone Excess Induced Mitochondria Decrease and Dysfunction via Mineralocorticoid Receptor and Oxidative Stress In Vitro and In Vivo”, *Biomedicines*, 9(8), pp. 946. doi: 10.3390/biomedicines9080946.
- Tsao, R. (2010) “Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols”, *Nutrients*, 2(12), pp. 1231-46. doi: 10.3390/nu2121231.
- Vanderpool, R. R., Tang, H., Rischard, F. y Yuan, J. X. (2017) “Is p38 MAPK a Dark Force in Right Ventricular Hypertrophy and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension?”, *57(5)*, pp. 506-508. doi: 10.1165/rcmb.2017-0197ED.
- Vashi, R. y Patel, B. M. (2021) “NRF2 in Cardiovascular Diseases: a Ray of Hope!” *Journal of cardiovascular translational research*, 14(3), pp. 573–586. doi: 10.1007/s12265-020-10083-8.
- Wu, C. H., Mohammadmoradi, S., Chen, J. Z., Sawada, H., Daugherty, A. y Lu, H. S. (2018) “Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Functions”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38(7), pp. 108-116. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311282.
- Wu, Y., Ding, Y., Ramprasath, T. y Zou, M. H. (2020) “Oxidative Stress, GTPCH1, and Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling in Hypertension”, *Antioxid Redox Signal*, 34(9), pp. 750-764. doi: 10.1089/ars.2020.8112.
- Xiao, T., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, Y., Yu, Z. y Shen, X. (2013) “Activation of an apoptotic signal transduction pathway involved in the upregulation of calpain and apoptosis-inducing factor in aldosterone-induced primary cultured cardiomyocytes”, *Food Chem Toxicol*, 53, pp. 364-70. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.022.
- Xu, Z., Sun, J., Tong, Q., Lin, Q., Qian, L., Park, Y. y Zheng, Y. (2016) “The Role of ERK1/2 in the Development of Diabetic Cardiomyopathy”, *International journal of molecular sciences*, 17(12), pp. 2001. doi: 10.3390/ijms17122001.
- Yang, X., Yang, R., Li, X. y Zheng, X. (2017) “Danshensu attenuates aldosterone-induced cardiomyocytes injury through interfering p53 pathway”, *Mol Med Rep*, 16(4), pp. 4994-5000. doi: 10.3892/mmr.2017.7137.
- Zhang, Q., Pan, Y., Ma, X., Yang, H., Chang, J., Hong, L., Yan, H. y Zhang, S. H. (2021) “Elevated Secretion of Aldosterone Increases TG/HDL-C Ratio and Potentiates The Ox-LDL-Induced Dysfunction of HUVEC”, *Cell J*, 23(1), pp. 61-69. doi: 10.22074/cellj.2021.7033.
- Zhu, L., Li, C., Liu, Q., Xu, W. y Zhou, X. (2019) “Molecular biomarkers in cardiac hypertrophy”, *J Cell Mol Med*, 23(3), pp. 1671-1677. doi: 10.1111/jcmm.14129.

Zhuang, L., Jia, K., Chen, C., Li, Z., Zhao, J., Hu, J., Zhang, H., Fan, Q., Huang, C., Xie, H., Lu, L., Shen, W., Ning, G., Wang, J., Zhang, R., Chen, K. y Yan, X. (2022) “DYRK1B-STAT3 Drives Cardiac Hypertrophy and Heart Failure by Impairing Mitochondrial Bioenergetics”, *Circulation*, 145(11), pp. 829-846. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055727.

Zinellu, A. y Mangoni, A. A. (2021) “A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effect of Statins on Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase, and Catalase”, *Antioxidants (Basel)*, 10(11), pp. 1841. doi: 10.3390/antiox10111841.