



universidad  
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFFECTOS DE LAS PROANTOCIANIDINAS  
SOBRE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS  
POR LA ESTIMULACIÓN CON  
ALDOSTERONA EN CÉLULAS CARDÍACAS**

**EFFECTS OF PROANTHOCYANIDINS ON  
ALTERATIONS PRODUCED BY STIMULATION  
WITH ALDOSTERONE IN CARDIAC CELLS**

Carlos Arroyo Ríos

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Julio, 2022

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Aldosterona</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Aldosterona e hipertrofia cardiaca</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3. Polifenoles como cardioprotectores en casos de HC</b> .....	<b>4</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
<b>4.1. Mantenimiento de la línea celular</b> .....	<b>6</b>
<b>4.2. Diseño experimental</b> .....	<b>6</b>
<b>4.3. Supervivencia celular</b> .....	<b>7</b>
<b>4.4. Análisis de radicales superóxido mitocondriales y actividad mitocondrial</b> .....	<b>8</b>
<b>4.5. Análisis de daño en el genoma y diferenciación celular</b> .....	<b>9</b>
<b>4.6. Análisis estadístico</b> .....	<b>10</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
<b>5.1. El tratamiento con proantocianidinas aumenta la supervivencia celular</b> .....	<b>13</b>
<b>5.2. El tratamiento con proantocianidinas no reduce la presencia de radicales superóxido en mitocondrias</b> .....	<b>14</b>
<b>5.3. Las proantocianidinas reducen el daño al ADN</b> .....	<b>15</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>22</b>

## RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son desde hace tiempo la primera causa de muerte a nivel mundial. Investigar los principales mecanismos de acción de estas patologías ayuda a conocer, tratar e incluso poder prevenir este tipo de enfermedades. La aldosterona, una hormona esteroidea que ejerce su acción a través de la unión con el receptor de mineralocorticoide (RM), es una pieza fundamental en la regulación de la reabsorción de agua y la presión arterial. El exceso de aldosterona está asociado con enfermedades cardiovasculares y metabólicas, dentro de las que las que podemos encontrar anormalidades vasculares como la disfunción endotelial, remodelado vascular y cardiaco, aumento de la presión arterial, estrés oxidativo y fibrosis. En este trabajo se estudiarán las proantocianidinas como un posible agente cardioprotector en células de miocardio ventricular de rata H9c2, actuando como antagonista del RM y disminuyendo los efectos deletéreos del exceso de aldosterona sobre distintos aspectos relacionados con la hipertrofia cardiaca, una patología asociada con la hipertensión. Los resultados obtenidos sugieren que las proantocianidinas contrarrestan los efectos negativos de la aldosterona sobre las células H9c2 a nivel de supervivencia celular, daño en el genoma y diferenciación celular. Son necesarias nuevas investigaciones sobre este sistema para poder llegar a utilizar este agente como tratamiento en casos de hipertrofia cardiaca asociada a hiperaldosteronismo.

**Palabras clave:** Aldosterona, Antagonista del receptor de mineralocorticoide, Cardioprotector, Hipertrofia cardiaca, Proantocianidinas.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases have long been the leading cause of death worldwide. Investigating the main mechanisms of action of these pathologies helps to understand, treat and even prevent this type of disease. Aldosterone, a steroid hormone that exerts its action through binding to the mineralocorticoid receptor (RM), is a key player in the regulation of water reabsorption and blood pressure. Aldosterone excess is associated with cardiovascular and metabolic diseases, among which we can find vascular abnormalities such as endothelial dysfunction, vascular and cardiac remodeling, increased blood pressure, oxidative stress and fibrosis. In this work, proanthocyanidins will be studied as a possible cardioprotective agent in H9c2 rat ventricular myocardial cells, acting as an antagonist of the RM and reducing the deleterious effects of excess aldosterone on different aspects related to cardiac hypertrophy, a pathology associated with hypertension. The results obtained suggest that proanthocyanidins counteract the negative effects of aldosterone on H9c2 cells at a cell survival level, genome damage and cell differentiation. New research on this system is necessary to be able to use this agent as a treatment in cases of cardiac hypertrophy associated with hyperaldosteronism.

**Key words:** Aldosterone, Mineralocorticoid receptor antagonist, Cardiac hypertrophy, Cardioprotector, Proanthocyanidins,

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad a nivel mundial, representando en el año 2017 un 16% de las muertes totales globales (Amini *et al.*, 2021). Dentro del ámbito nacional, las enfermedades cardiovasculares fueron la causa de fallecimiento de un total de 253.091 personas en España en el año 2020 (Instituto Nacional De Estadística, 2021).

Es fundamental conocer los mecanismos de acción de este tipo de enfermedades, para ayudar a su rápido diagnóstico y descubrir posibles nuevos tratamientos y dianas terapéuticas. Este trabajo se centrará en una de las principales hormonas que participa en el desarrollo de este tipo de patologías.

### 1.1. Aldosterona

La aldosterona es la principal hormona esteroidea mineralocorticoide endógena, producida en la zona glomerular de la corteza suprarrenal dentro de las glándulas suprarrenales. Además, existen evidencias actuales que confirman la producción de aldosterona a nivel local en tejidos vasculares, miocardio o cerebro (Greca, 2006). Como toda hormona esteroidea es sintetizada a partir de su precursor, el colesterol (Felpeto-Santero, 2016).

Esta hormona ejerce su acción a través de la unión al RM, un receptor citoplasmático englobado dentro de la superfamilia de los receptores nucleares, más concretamente dentro de la subfamilia de los receptores esteroideos (Rossier, 1989). Este RM tiene la capacidad de activación de la transcripción mediante un dominio altamente conservado de unión al ADN, que interacciona con los promotores de los genes diana (Yang and Young, 2009).

El RM se expresa en células musculares lisas y endoteliales vasculares, en los túbulos distales renales, epitelios del colon distal y pulmonar, en canales excretores de las glándulas sudoríparas y salivales, células del sistema nervioso central y cardiomiocitos (Farman and Rafestin-Oblin, 2001).

La aldosterona es de naturaleza liposoluble, de manera que es capaz de difundir al interior celular. Una vez allí se produce la unión con el RM, que sufre un cambio conformacional y pasa de formar un complejo con inmunofilinas y proteínas de choque térmico a unirse con su ligando, liberándose de estas proteínas asociadas (Figura 1). (Hermidorff *et al.*, 2017).

Tras la unión de la aldosterona con el RM, el complejo es traslocado al interior del núcleo a través de los poros nucleares. Allí forma un dímero con otro complejo hormona-receptor del mismo tipo a través de la unión de sus secuencias GRE, para actuar como un factor de transcripción. Los genes diana sobre los que actúa modulan el transporte de iónico, principalmente a nivel renal por medio de la acción de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, el canal epitelial de sodio (ENaC) y el canal transportador de  $\text{K}^+$  a nivel renal ROMK (Figura 1). A partir de los primeros 30 minutos tras la acción de la aldosterona se expresan genes reguladores entre los que destaca SGK-1, una kinasa regulada por suero y por glucocorticoides. Más tarde, entorno a las 3 horas, comienza la expresión de las proteínas formadoras de los propios canales de transporte iónico (González-Núñez and Poch, 2006).

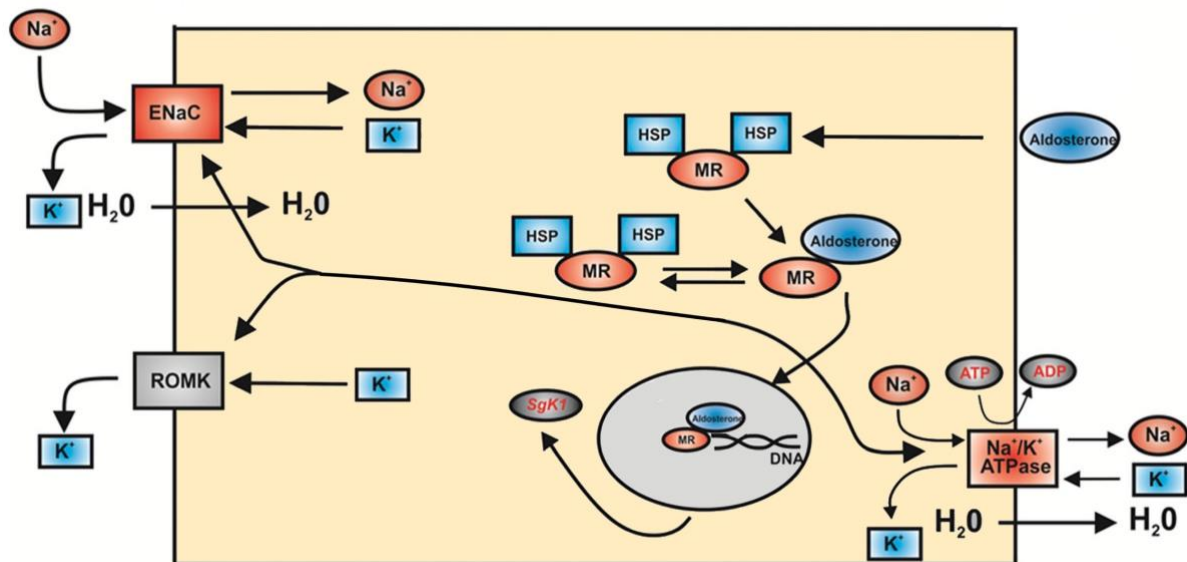


Figura 1. Esquema general de las acciones genómicas de la aldosterona. La unión de la aldosterona con el RM libera al receptor de las proteínas de choque térmico y actúan en conjunto como factor de transcripción de genes como SGK-1. Se activa el transporte iónico a través de canales como ROMK, ENaC y la Bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Hermidorff et al., 2017).

Debido a su acción como reguladora del transporte iónico, la aldosterona es una pieza fundamental en la regulación del volumen extracelular, la presión arterial y el equilibrio electrolítico, actuando sobre la reabsorción de sodio y el agua que este arrastra gracias al mecanismo de ósmosis, y la secreción de potasio en diferentes epitelios (Gutiérrez, A. Ponte, G. Leyva, A y Valdés, 2016).

Esta hormona forma parte del sistema renina – angiotensina – aldosterona (SRAA), que juega un papel central en la regulación de los niveles de aldosterona. Está formado por una serie de reacciones biosintéticas, en la que participan enzimas, péptidos y receptores (Freel and Connell, 2004)(Lacerda *et al.*, 2018).

Los desajustes en el SRAA y los niveles elevados de aldosterona pueden ser una causa para el desarrollo de patologías cardiovasculares. Altos niveles de esta hormona producen una regulación al alza de la expresión de genes diana. Concretamente, niveles elevados de aldosterona producen un aumento de la reabsorción de sodio y como consecuencia directa de agua también. Este proceso desencadena un aumento de la presión arterial o hipertensión prologado en el tiempo, con una probabilidad 3 veces mayor de sufrir un evento de riesgo cardiovascular (Haze *et al.*, 2021).

Este trabajo se centrará mas a fondo en una patología cardiovascular derivada de un alto nivel de presión arterial, la hipertrofia cardiaca (HC).

## **1.2. Aldosterona e hipertrofia cardiaca**

La HC se define como el aumento de tamaño de los cardiomiocitos, y por ende un aumento tanto del tamaño como del peso del corazón. En casos de hiperaldosteronismo esta HC se desarrolla como respuesta a un aumento de la presión arterial y del volumen que el corazón ha de manejar. Esta HC puede derivar en insuficiencia cardiaca (IC), donde el corazón no es capaz de bombear la sangre suficiente como para mantener un aporte correcto a los tejidos (Ulate and Ulate Campos, 2009). En las situaciones de IC se observan niveles elevados de aldosterona en el organismo, que están directamente relacionados con episodios isquémicos agudos en pacientes con enfermedad arterial coronaria. (Briet and Schiffrin, 2011).

En la HC encontramos un alto nivel de producción de aldosterona a nivel local en el miocardio, además de un aumento en la producción de colágeno en fibroblastos que engrosa la matriz extracelular, produciendo una fibrosis en el tejido cardiaco (Jiménez-Navarro *et al.*, 2005). Este proceso es consecuencia de la expresión de genes como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), que funciona como mediador fibrótico, y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que es un conocido profibrótico (Martín-Fernández *et al.*, 2016).

Otro de los procesos que participan en el desarrollo de una HC y que está directamente relacionado con una excesiva reabsorción de sodio y agua es la inflamación de los tejidos, debido a la expresión de genes como el factor de necrosis tumoral (TNF-

$\alpha$ ) o la interleukina  $1\beta$ . La expresión de serin-treonin kinasa 1 (SGK-1) también se ve aumentada, que a su vez desencadena varias cascadas de señalización. Entre estas activa la ruta del fosfatidilinositol (IP) 3-kinasa (Figura 1) que señala para procesos celulares como el tráfico a través de la membrana y la apoptosis (Martín-Fernández *et al.*, 2012).

Por otro lado, los efectos derivados de la activación de los RM dan lugar a una señalización redox y una producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), principalmente por la enzima NADPH oxidasa productora de anión superóxido ( $O_2^-$ ). También aumenta la expresión de genes que participan en este tipo de vías, como p22phox (Ibarrola *et al.*, 2018). Este proceso aumenta el estrés oxidativo que también es responsable de un efecto deletéreo en el endotelio al modular varios genes implicados en el daño vascular, como el factor de crecimiento de plaquetas, las metalotioninas 1 y 2 o el CTGF; produciendo una disfunción endotelial y un remodelado vascular (Briones *et al.*, 2020).

En los cardiomiocitos las mitocondrias suponen una fuente básica de ERO, que funciona como una molécula de señalización. Los niveles elevados de aldosterona producen una mayor producción de estos en la mitocondria, que tiene como consecuencia la activación de transportadores de membrana gracias a la activación de la vía MAP Kinasa sensible a ERO, dando como resultado daño mitocondrial y una reducción en la producción de ATP (De Giusti *et al.*, 2013).

Todos estos procesos que tienen lugar en el desarrollo de la HC tienen como punto final la apoptosis celular y la disfunción de la función cardíaca (Kuzmicic *et al.*, 2011).

### **1.3. Polifenoles como cardioprotectores en casos de HC**

Una de las propuestas actuales para el tratamiento de casos de hiperaldosteronismo se basa en la administración de compuestos con capacidad antagonista del RM que funcionan de manera competitiva con la aldosterona. Son utilizados la espironolactona y eplerenona en este tipo de tratamientos, con estudios previos que confirmaron su función como antagonistas del RM (Núñez *et al.*, 2006) (Tagle and Michea, 2013). A pesar de la existencia de estos tratamientos estándar aún no es posible detener el avance y empeoramiento de la HC. Por tanto, es clave profundizar en la búsqueda de nuevos tratamientos.

Los polifenoles se proponen como un posible cardioprotector. Son un tipo de flavonol polimérico formado por unidades de antocianidinas, con una alta capacidad

antioxidante y con competencia bioactiva (Martín-Fernández, de las Heras, *et al.*, 2014)(Pons Vila, 2016).

Este trabajo se centrará en el estudio de las proantocianidinas, un compuesto clasificado dentro de los polifenoles, como cardioprotector en casos de HC. Se encuentran en una gran diversidad de plantas como los arándanos, semillas de uva, manzana o cacao; destacando por su gran capacidad antioxidante, con varios estudios previos que demuestran su actividad cardioprotectora (Martín-Fernández, De Las Heras, *et al.*, 2014)(Adrián Galiana Rodríguez-Barbero, 2016).

## **2. HIPÓTESIS**

La co-incubación con proantocianidinas podría prevenir el desarrollo de alteraciones celulares y moleculares producidas por la estimulación de células cardíacas de rata con aldosterona.

## **3. OBJETIVOS**

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

Objetivos concretos:

- 1- Valorar la supervivencia celular de las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas.
- 2- Analizar el grado de oxidación y la presencia de mitocondrias activas en las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas.
- 3- Analizar el grado de diferenciación celular en las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se utilizaron células H9c2 de miocardio ventricular de rata (H9c2(2-1), ATCC CRL-1446, ATCC, Londres, Reino Unido), que presentan un comportamiento propio de células de músculo esquelético (Kimes and Brandt, 1976).

### 4.1. Mantenimiento de la línea celular

Las células se cultivaron en unas condiciones de 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> en medio base Dulbecco *Eagle* modificado (DMEM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con un 10% V/V de suero bovino fetal (FBS, Gibco, United Kingdom) inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos. A este medio se adicionaron los antibióticos penicilina (Sigma Aldrich, United Kingdom) y estreptomina (Sigma Aldrich, United Kingdom) a una concentración final de 100 µg/ml ambos dos, además de L-glutamina (Sigma Aldrich, United Kingdom) a 2 mM. A este medio lo llamaremos medio completo (MC).

El subcultivo se realizó cuando las células tuvieron una confluencia del 80 %; aproximadamente cada 48 horas. Para llevar a cabo este cambio primeramente se retiró el medio y se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma Aldrich, United Kingdom). Después, se incubaron con tripsina-EDTA con una concentración 2X (Gibco, Berlín, Alemania) durante 5 minutos a una temperatura de 37°C dentro del incubador. Tras este paso se añadió el mismo volumen que se utilizó de tripsina-EDTA 2X de MC. Por último se subcultivaron en una proporción 1:3 (Adrián Galiana Rodríguez-Barbero, 2016).

### 4.2. Diseño experimental

Inicialmente, para llevar a cabo el cultivo y los diferentes análisis se sembraron las células con una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en MC durante 24 horas. Para el cálculo de la concentración celular se utilizó un recuento en cámara de Neubauer. Consiste en un contaje manual para partículas en suspensión en el que se utiliza la cámara de Neubauer, formada por un grueso portaobjetos con dos cuadrículas grabadas de 3x3 mm conformadas por cuatro sectores de 1 mm<sup>2</sup>, divididos a su vez en 16 diferentes cuadrantes de 0,25 mm de lado, y una cruz central. Si una partícula se sitúa sobre los

bordes delimitantes del sector, solo tendremos en cuenta aquellas sobre dos de los bordes, el superior e izquierdo de forma general. Sobre este se coloca un cubreobjetos que se apoya en unos soportes laterales que deja un espacio de 0,1 mm con el fondo del portaobjetos; creando un volumen total de  $0,1 \text{ mm}^3$  por cada sector. Por último, debemos tener en cuenta que el número de partículas que podemos contar en un sector debe encontrarse por debajo de 50 para reducir el error de medida (Barbedo, 2013). Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de las células una vez añadida la tripsina y el MC en el proceso de subcultivo o una dilución de este. Se hizo un recuento en los cuatro sectores de cada cuadrícula, y se tomó como resultado la media aritmética de estas, obteniendo una concentración celular.

Se cambiaron a medio 1% V/V FBS, también llamado medio de arresto (MA), durante otras 24 horas. Tras esto se añadieron los compuestos a estudiar diluidos en MA dejando un último periodo de co-incubación de 24 horas antes de realizar cualquier medida (Figura 2). Se utilizaron diferentes grupos experimentales, cada uno de ellos repetido un total de 3 veces:

- Control: las células recibían los cambios a MA sin ningún compuesto diluido.
- Aldosterona: 100 nM
- Proantocianidinas: 10 nM, 100 nM y 1000 nM
- Aldosterona + Proantocianidinas: 100nM de aldosterona + 10, 100 o 1000 nM de proantocianidinas.

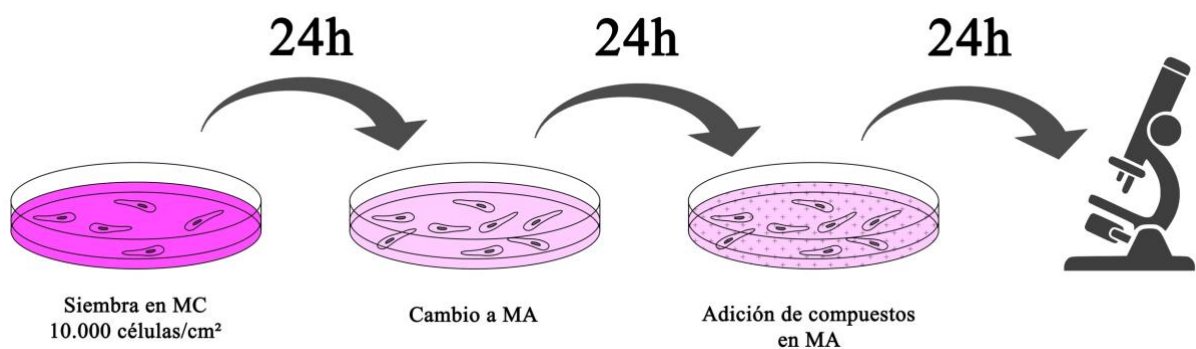


Figura 2. Esquema del diseño experimental utilizado en el trabajo

### 4.3. Supervivencia celular

Para realizar este análisis de viabilidad debemos tener en cuenta que las células una vez muertas pierden la adhesión a la placa, por lo que al subcultivarlas eliminamos aquellas muertas retirando el MC.

Se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa p96 con un volumen final de 100µl por pocillo, donde se realizaron los tratamientos indicados en el diseño experimental. El kit XTT de análisis colorimétrico utilizado consta de dos reactivos que han de mezclarse homogéneamente en proporción 1:50; para una placa p96 completa se añadieron 0,1 ml de la solución de activación a 5 ml de reactivo XTT (Roche Manual, 2005).

Se añadieron 50 µl de la solución de reacción a cada pocillo y se agitó la placa suavemente para su correcta distribución por el medio. Como blanco se utilizó únicamente MC. Se dejó incubar durante 3 horas a unas condiciones de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Por último, se leyó la absorbancia en un lector de placas (Synergy™ HT- ThermoFisher, Madrid, España) a una longitud de onda de 475 nm y 660 nm de background.

#### **4.4. Análisis de radicales superóxido mitocondriales y actividad mitocondrial**

Se cultivaron las células en placa p24 a una densidad de 70.000 células por pocillo con un volumen total de 500 µl de MC. Tras los diferentes tratamientos y periodos de incubación se procedió a levantar las células retirando el medio, lavando con PBS, añadiendo 250µl de tripsina-EDTA 2X durante 3 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, y añadiendo otros 250 µl de MC.

Se homogenizó la mezcla y se pasó a un eppendorf de 1,5 ml para centrifugarla a 1000G durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante en 250 µl de PBS con una concentración al 2,5% V/V de FBS. Tras esto pasamos este volumen a una placa p96.

Por último, se añadieron las siguientes sondas fluorescentes previamente descongeladas a temperatura ambiente:

→ MitoSOX (Invitrogen M36008)(Thermo Fisher, Oregon, EEUU): Se utilizó una concentración 5 mM. Permite analizar la producción de radicales anión superóxido dentro del interior mitocondrial (Kauffman *et al.*, 2016).

→ MitoTracker deep red 633 (Invitrogen M22426)(Thermo Fisher, Oregon, EEUU): Se utilizó una concentración 1mM. Tiñe específicamente las mitocondrias y permite realizar un cálculo del volumen mitocondrial (Hallap *et al.*, 2005).

→ YO-PRO-1 iodide (491/509)(Thermo Fisher, Oregon, EEUU): Se utilizó una concentración 1mM. Tinción impermeable a membranas celulares de células vivas que

se une al DNA de células en proceso de apoptosis, es utilizado para analizar la supervivencia celular (Idziorek *et al.*, 1995).

Tras añadir estas sondas se incubaron un total de 15 minutos y se procedió inmediatamente al análisis por citometría de flujo en el citómetro (Synergy™ HT-TermoFisher, Alemania) sobre un portaplastas previamente calentado en una estufa a una temperatura de 37°C.

#### **4.5. Análisis de daño en el genoma y diferenciación celular**

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos redondos desinfectados con rayos UVA durante una noche. Estos cubreobjetos se colocan en el fondo de los pocillos de una placa p24 donde se sembraron de  $10^5$  células por pocillo con un volumen total de 500  $\mu$ L. Posteriormente se realizó el cultivo y tratamiento detallado en el diseño experimental.

Se retiró el medio donde crecían las células y se lavaron con PBS. Tras esto se fijaron las células utilizando 500  $\mu$ L de una solución al 4% W/V de paraformaldehído (PFA) (Sigma Aldrich, USA) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las células tras retirar la solución de PFA un total de 3 veces con PBS, y se permeabilizaron con una 500  $\mu$ L de una solución detergente de 0,1% Triton-X-100 (Sigma Aldrich, USA) en PBS durante 30 minutos en agitación. Siguiendo el protocolo, se lavó la muestra con solución bloqueante formada por una proteína seroalbúmina Bovina (BSA) (Sigma Aldrich, USA) al 1% W/V en PBS durante 1,5 horas en agitación con el fin de evitar uniones inespecíficas.

Se continuó lavando 3 veces con PBS, con la adición del anticuerpo primario anti-Troponina I diluido 1:2000 en solución de bloqueo, incubando con 250  $\mu$ L durante 24 horas a una temperatura de 4°C con una suave agitación. El control negativo únicamente se incubó con solución de bloqueo.

Se lavó el anticuerpo primario 3 veces con PBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (Alexa 488) diluido 1:500 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Por último, se volvieron a lavar las muestras 3 veces con PBS y los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI 250  $\mu$ L 1  $\mu$ g/ml diluido en PBS un total de 20 minutos en agitación y condiciones de oscuridad. Por último, los cubreobjetos fueron montados sobre una gota ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher, USA) en un portaobjetos, teniendo en

cuenta colocar el lado donde crecieron las células hacia el portaobjetos. Tras esto se observaron al microscopio confocal (Zeiss lsm800, Alemania).

Tras el proceso de tinción, se realizó un análisis del daño al ADN a través de recuento de micronúcleos. Los micronúcleos son una anomalía nuclear conformados por parte o incluso cromosomas completos que durante el proceso de mitosis se quedan fuera del núcleo, dando lugar a células con una menor cantidad de ADN. Se observan como pequeños puntos en la cercanía del núcleo teñidos por DAPI (Zalacain *et al.*, 2005).

De la misma forma se realizó un recuento de los núcleos picnóticos, de un tamaño 1/3 más pequeños comparándolos con un núcleo ordinario, teñidos intensamente con DAPI y con una conformación irregular. Este tipo de núcleos es un indicador claro de muerte celular (Torres-Bugarín and Ramos-Ibarra, 2013).

Por último, se analizó la morfología de las células gracias a la tinción de la troponina I, proteína que conforma parte de la tropomiosina de unión a actina. Las células H9c2 utilizadas para estos análisis presentan una morfología piramidal característica de un nivel bajo de diferenciación. Si estas células sufren estrés, entran en un proceso de diferenciación y modifican su morfología hacia una mucho más alargada (Oyama *et al.*, 2009).

#### **4.6. Análisis estadístico**

##### Supervivencia celular

Para comprobar la fiabilidad de los datos del análisis de supervivencia celular se realizó un análisis de normalidad de tipo Shapiro-Wilk, tomando como hipótesis nula que los resultados de cada condición provienen de una población normalmente distribuida. En este análisis se rechazará la hipótesis nula si el valor de  $p$  es menor a  $\alpha$  (Yap and Sim, 2011). En este análisis se consideró  $\alpha = 0,05$ . Todos los grupos pasaron el test de normalidad Shapiro-Wilk. Los datos de este análisis se recogen en la Figura 1 del Anexo. Los datos se representaron en un gráfico Q-Q (Cuantil – Cuantil) comparando la distribución de probabilidad de cada grupo frente a una distribución de probabilidad normal, Figura 3 del Anexo.

Para este análisis se repitió cada condición un total de tres veces, tomando como resultado la media de las tres medidas. Se calcularon en forma de porcentaje; calculándolos frente a la media de los resultados del control, tomando este dato como el 100% de viabilidad

Además, se realizó un análisis comparativo de Bonferroni entre los grupos Aldosterona 100 y Proantocianidina 1000 con el control; y otro entre Aldosterona 100 y Aldosterona 100 + Proantocianidina 1000. Los resultados de este análisis se en la Figura 2 del Anexo.

Por último, se representaron en forma de gráfico los resultados finales con una barra superior e inferior indicando el error estándar como la desviación estándar de la distribución muestral.

### Análisis de radicales superóxido mitocondriales y actividad mitocondrial

Tras la citometría de flujo realizada en las diferentes condiciones, se utilizó el programa Weasel (WEHI, 1995 *Weasel (Versión 3.2.1)[Programa de ordenador]*) para acotar la población de células que queremos estudiar. Se eliminó el denominado debrie, eventos no viables por su tamaño y rugosidad.

En la Figura 3 podemos observar los resultados de la citometría para células control, en las que se espera una actividad mitocondrial normal. Para realizar estos gráficos dotplot se enfrentaron las sondas YO-PRO-1 y MitoTracker, y YO-PRO-1 y MitoSOX. Este análisis se centró en dos tipos de eventos diferentes; eventos que fueron negativos para la sonda YO-PRO-1 y positivos para la sonda MitoTracker, zona inferior derecha de la Figura 3-A, que representan células viables con una actividad mitocondrial viable también; y eventos negativos para la sonda YO-PRO-1 y positivos para la sonda MitoSOX, zona inferior derecha de la Figura 3-B, que se corresponden con células viables con presencia de radicales superóxido en sus mitocondrias.

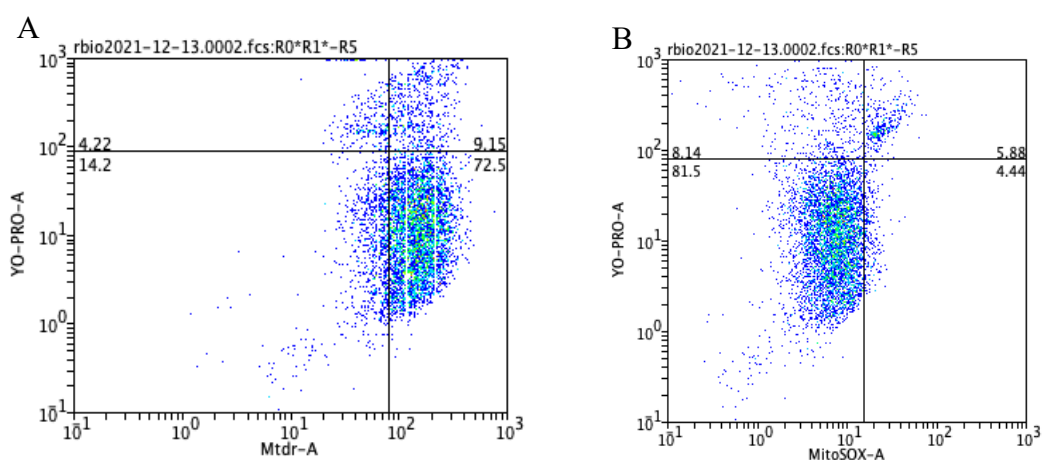


Figura 3. Representación de los diferentes eventos tras el análisis por citometría de flujo de células control para la sonda YO-PRO-1 Y MitoSOX (A) y YO-PRO-1 y MitoTracker (B).

Para obtener los resultados de la citometría se enfrentaron las sondas a estudiar y se utilizó el programa Weasel para acotar las diferentes ventanas de valoración para delimitar que eventos son positivos y cuales negativos para las diferentes sondas. El resultado final tras el análisis es un porcentaje de eventos respecto del total situados en cada ventana. Se calculó la media las repeticiones de las diferentes condiciones de los eventos de interés ya nombrados. Finalmente, se representaron en un gráfico de barras con una barra de error estándar superior.

#### Análisis de diferenciación celular

Para este análisis se realizó un recuento de micronúcleos, núcleos picnóticos y células diferenciadas en cinco fotografías diferentes tomadas aleatoriamente por condición; abarcando todas estas la misma área. Los resultados se tomaron como la media aritmética de los diferentes eventos presentes en las fotografías por condición. Estos resultados se representaron en un gráfico de barras con una barra de error estándar superior.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. El tratamiento con proantocianidinas aumenta la supervivencia celular

Los resultados calculados como porcentajes de viabilidad comparados con el control se recogen en la Tabla 1:

Control	A100	P10	P100	P1000	A100+P10	A100+P100	A100+P1000
102,742	88,719	102,876	107,326	108,944	106,652	95,326	105,978
101,528	77,079	105,708	107,730	107,730	99,236	111,775	108,944
95,730	83,551	89,258	108,809	108,809	95,326	106,787	106,787

Tabla 1. Resultados de viabilidad medidos con el ensayo colorimétrico XTT como porcentajes respecto del control

Los anteriores resultados se representan en la Figura 5, donde se pueden observar los diferentes valores de viabilidad por condición y su error estándar, además del test de comparación múltiple entre las diferentes condiciones.

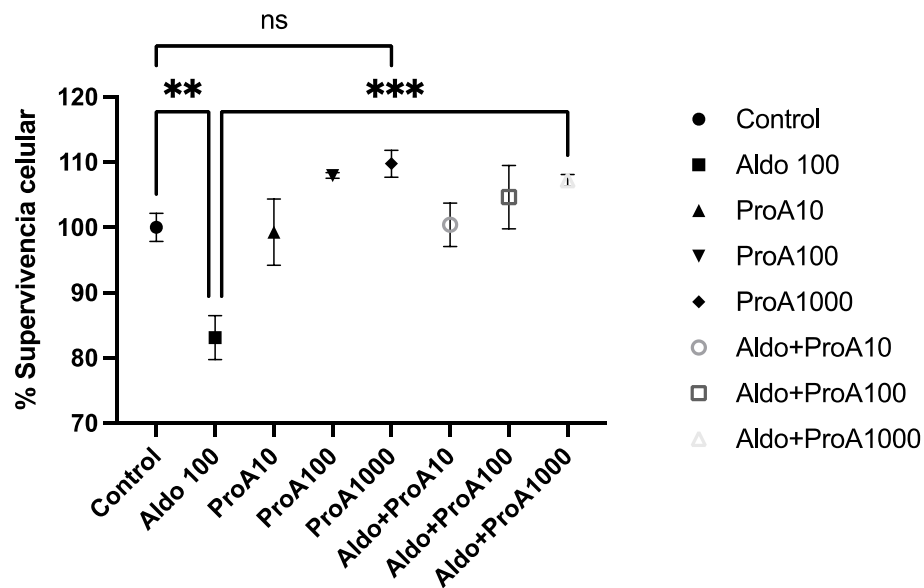


Figura 5. Resultados de supervivencia celular representados como porcentajes respecto del control.

Se puede observar como la adición de las proantocianidinas al medio no supone un cambio significativo en la supervivencia celular respecto al control. De forma contraria la adición de aldosterona al medio reduce la supervivencia celular, presentando una diferencia bastante significativa ( $p < 0,005$ ). La condición Aldo100 + ProA1000 ve aumentada su supervivencia celular, presentando una diferencia muy significativa respecto a Aldo100 ( $p < 0,0005$ ).



## 5.2. El tratamiento con proantocianidinas no reduce la presencia de radicales superóxido en mitocondrias

En la Figura 6 se encuentran representados los diferentes resultados como porcentajes de eventos positivos para la sonda MitoSOX y negativos para YO-PRO-1, así como los eventos positivos para MitoTracker y negativos para YO-PRO-1, respecto del total de eventos.

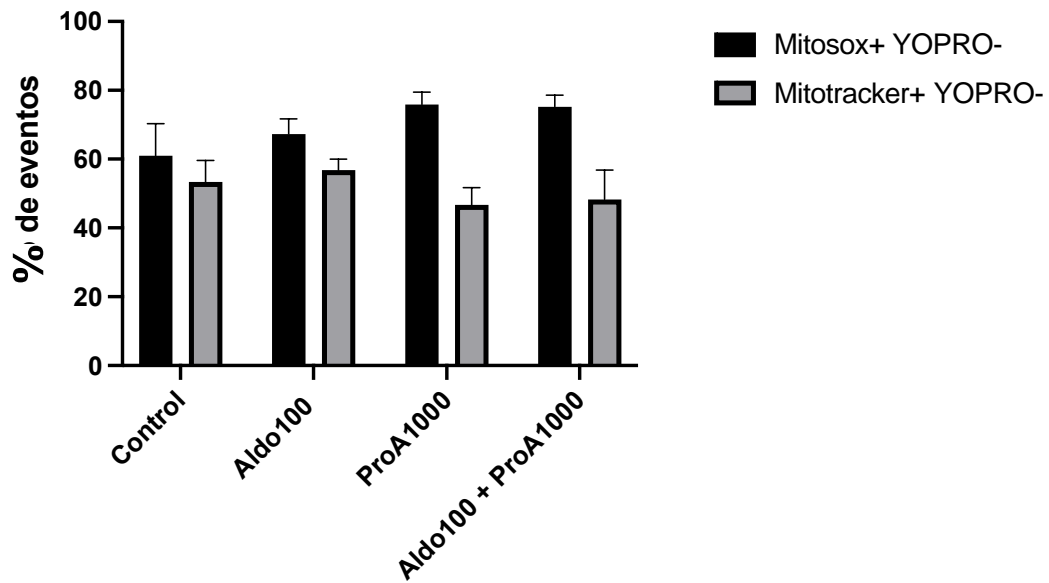


Figura 6. Resultados de la citometría de flujo como porcentajes de eventos positivos para la sonda MitoSOX y negativos para YO-PRO-1 y eventos positivos para Mitotracker y negativos para YO-PRO-1 respecto del total.

No se observa una tendencia ni diferencias significativas entre las diferentes condiciones, debido a las limitaciones del estudio y el escaso número de repeticiones por condición.

### 5.3. Las proantocianidinas reducen el daño al ADN

En la Figura 7 se puede observar las diferencias en número de micronúcleos, núcleos picnóticos y células diferenciadas entre las diferentes condiciones. Las distintas imágenes utilizadas para realizar este análisis se encuentran recogidas en la Figura 8, con cada tipo de evento señalado de forma diferente.

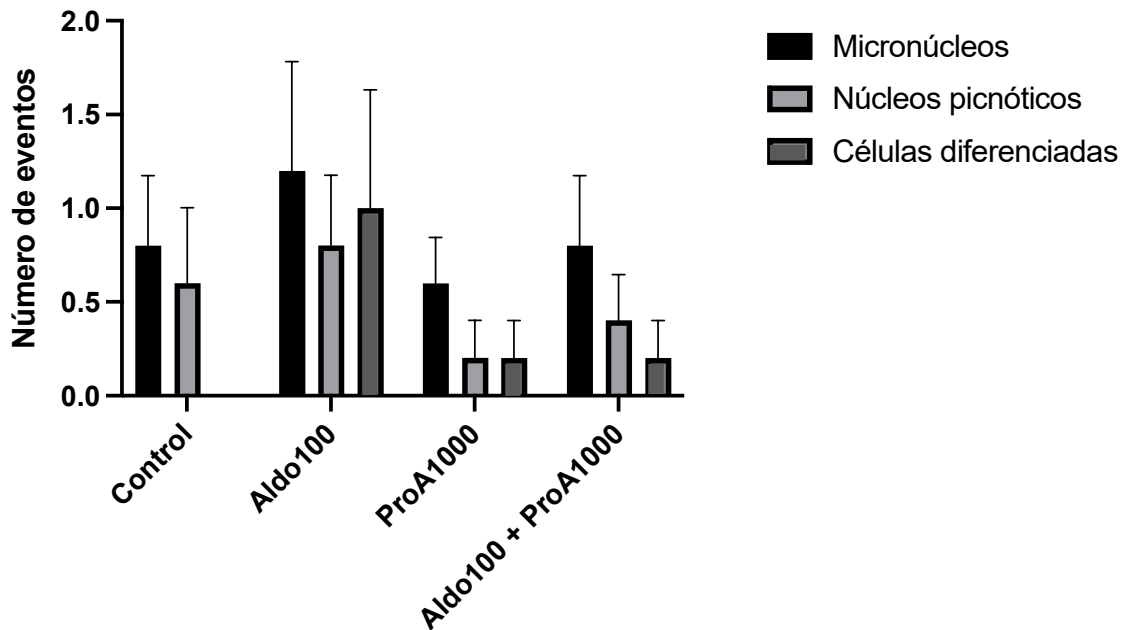
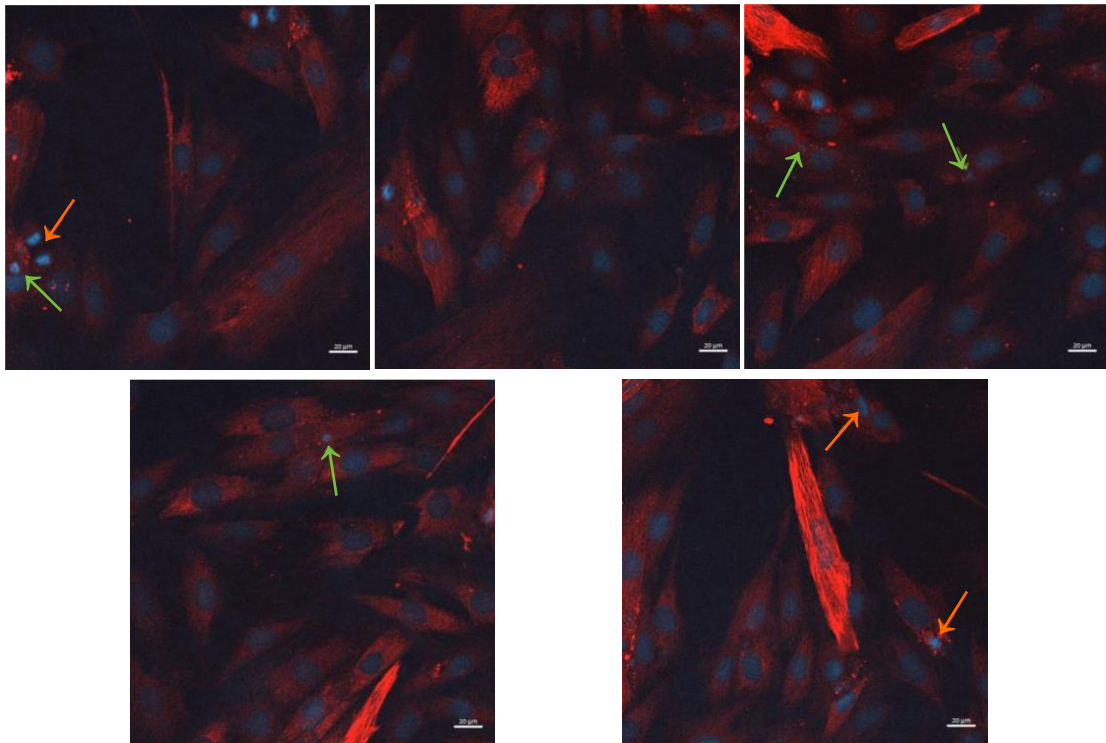


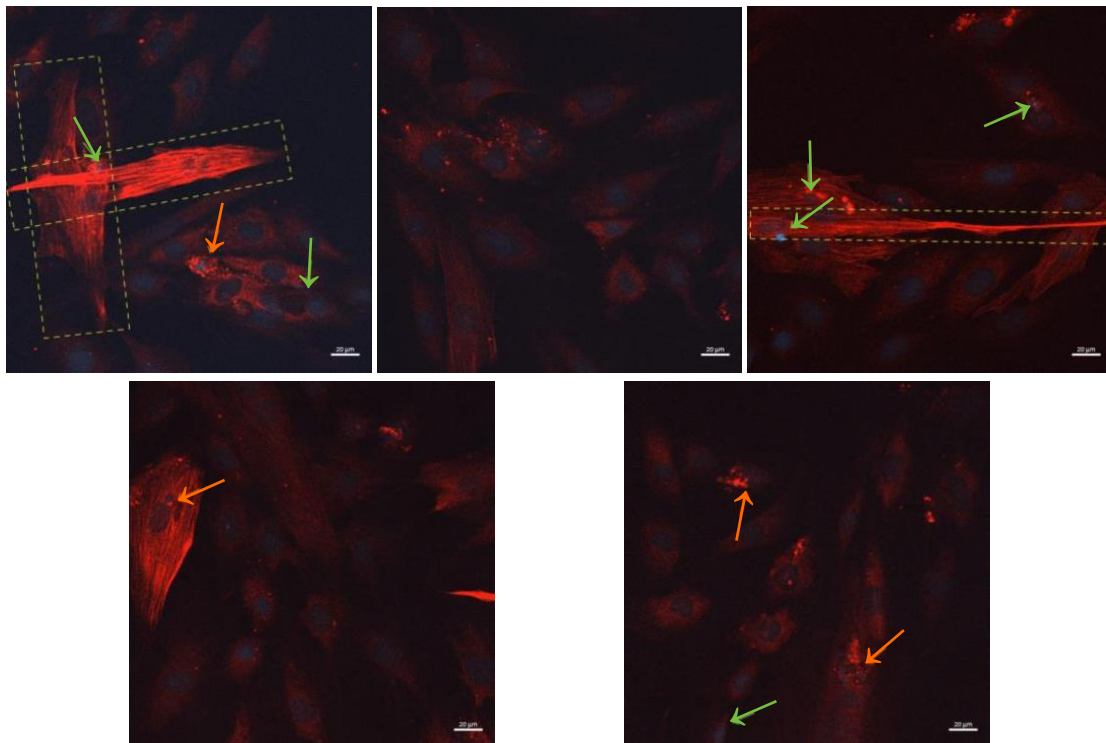
Figura 7. Representación de la media de micronúcleos, núcleos picnóticos y células diferenciadas en las diferentes condiciones. El error estándar se representa con una barra superior.

Se puede observar un claro aumento en el número de células diferenciadas, núcleos picnóticos y micronúcleos en la condición Aldo100 respecto al control. También se puede observar una tendencia hacia la reducción de el número de estos eventos en las condiciones ProA1000 y Aldo100 + ProA1000 respecto a Aldo 100.

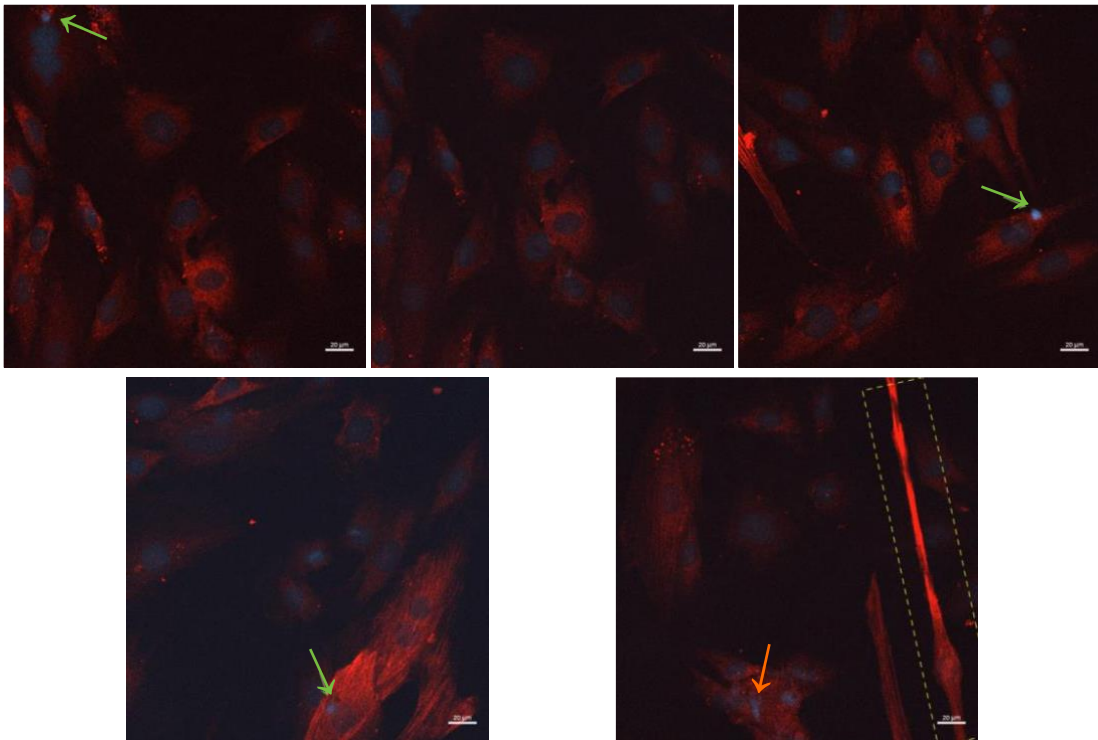
**Control**



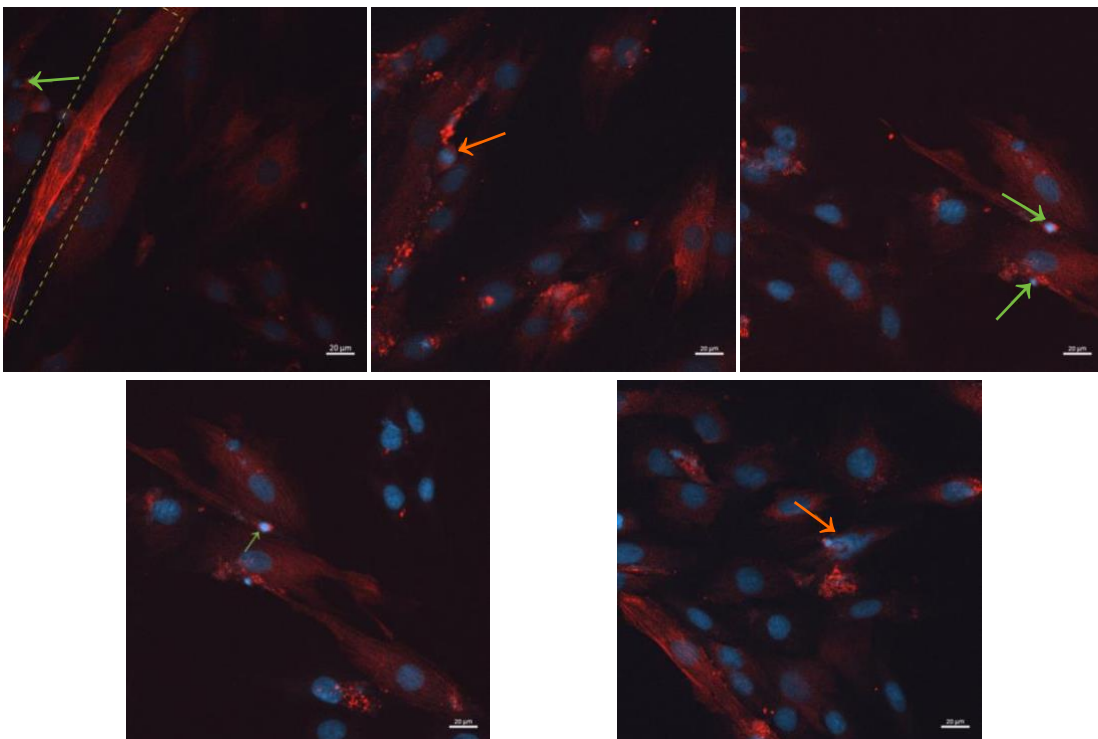
**Aldosterona 100**



### Proantocianidina 1000



### Proantocianidina 1000 + Aldosterona 100



*Figura 8. Imágenes tomadas después de la tinción inmunohistoquímica por condiciones. Las flechas verdes señalan micronúcleos, las flechas naranjas núcleos picnóticos y las cajas amarillas discontinuas engloban aquellas células con una morfología más alargada, indicando una diferenciación celular:*

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio realizado con células H9c2 se ha demostrado que la adición de proantocianidinas reduce la muerte celular derivada de la acción deletérea de la aldosterona. De la misma forma, este polifenol reduce el número de eventos relacionados con el daño al material genético, así como la diferenciación celular producida por dicho daño.

Se pueden relacionar tanto el descenso de supervivencia celular como el aumento de los eventos de daño al ADN con un aumento en la concentración de ERO provocado por la acción de la aldosterona. No obstante, los resultados de la prueba para medir los radicales superóxido mitocondriales y la actividad mitocondrial no fueron concluyentes.

Actualmente la espironolactona se utiliza como tratamiento en casos de hiperaldosteronismo (Tagle and Michea, 2013). En ratas tratadas con isoproterenol, un agente asociado con la hipertrofia cardiaca, la espironolactona es capaz de normalizar los niveles de presión diastólica final en el ventrículo izquierdo, así como la producción de colágeno y el desarrollo de hipertrofia. Adicionalmente, también normalizó los niveles de expresión de los genes TGF- $\beta$ , CTGF, TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , p22phox y SGK-1. Todos estos genes son regulados por el RM, lo que sugiere que la espironolactona funciona como antagonista competitivo de este receptor (Martín-Fernández *et al.*, 2012).

Existen varios estudios que demuestran la actividad cardioprotectora de las proantocianidinas. En ratas tratadas con aldosterona y sal se provocó una hipertensión y un aumento en la presión diastólica. También se produjo un aumento en la expresión de SGK-1 y de mediadores oxidativos, inflamatorios y fibróticos. La proantocianidina administrada como extracto de piel de almendra consiguió normalizar todos estos aspectos, incluida la expresión de SGK-1, lo que podría indicar que las proantocianidinas actúan, al igual que la espironolactona, como un antagonista del RM (Martín-Fernández, De Las Heras, *et al.*, 2014).

### **Las proantocianidinas reducen la muerte celular relacionada con la aldosterona**

Uno de los datos mas concluyentes de este trabajo sería el resultado del análisis de supervivencia celular. Niveles altos de aldosterona provocan un aumento en la concentración de ERO intracelular muy rápido por la activación de la NADPH oxidasa, además de activar vías de señalización apoptóticas que tienen como fin la muerte celular (Gouda *et al.*, 2008).

En este estudio se ha podido observar una clara diferencia en la supervivencia celular entre las condiciones de Aldo100 y Aldo100 + ProA1000. Ambas tienen la misma concentración de aldosterona en el medio, no obstante; la adición de las proantocianidinas al medio previene la muerte celular por acción de la aldosterona, presentando una mayor supervivencia con una diferencia muy significativa ( $p < 0,0005$ ). Las condiciones Aldo100 + ProA10 y Aldo100 + ProA100 presentan una diferencia bastante significativa ( $p < 0,005$ ) con Aldo 100. Se advierte como con una misma condición de aldosterona, a medida que aumenta la concentración de proantocianidinas la supervivencia celular también crece.

### **Las proantocianidinas podrían reducir la concentración de radicales superóxido mitocondriales**

La actividad mitocondrial en cardiomiocitos se ve inhibida en casos de hiperaldosteronismo, donde el número de mitocondrias se ve reducido, la producción de ERO mitocondrial se incrementa y las mutaciones en el genoma mitocondrial aumentan. Como consecuencia directa, la producción de ATP también se ve disminuida (Guitart-Mampel *et al.*, 2021).

En modelos *in vivo* donde se indujo daño mitocondrial en ratones por la administración de aldosterona, el antagonista del RM eplerenona redujo los efectos causados por esta hormona sobre el daño a las mitocondrias, confirmando que la sobreactivación de el RM aumenta la concentración de ERO por activación de la NADPH oxidasa y reduce la actividad mitocondrial (HUNG *et al.*, 2022).

Los resultados del análisis de radicales superóxido mitocondriales y actividad mitocondrial de este estudio no son concluyentes debido al bajo número de repeticiones por condición. Las proantocianidinas podrían llegar a reducir la presencia de ERO debido a la alta capacidad antioxidante de este polifenol, así como aumentar la actividad mitocondrial.

### **Las proantocianidinas disminuyen el daño al ADN nuclear y la diferenciación celular**

Otra consecuencia directa del aumento de la concentración de ERO es el daño en el genoma celular. La aparición del efecto genotóxicos por acción de aldosterona es rápida, observándose un aumento en el daño celular y la activación de la vía NF- $\kappa$ B de 5 a 30 minutos tras la adición de aldosterona en células de riñón (Queisser *et al.*, 2011).

En este estudio se puede observar una clara tendencia donde las células tratadas con aldosterona sufren un aumento en el número de micronúcleos y núcleos picnóticos, clara señal de daño celular. Como consecuencia de este estrés oxidativo, las células H9c2 tienden a diferenciarse y cambiar su morfología, adoptando una forma más alargada similar a la de los cardiomiocitos maduros. El número de este tipo de células más diferenciadas aumenta tras la adición de aldosterona.

El número de micronúcleos, núcleos picnóticos y células diferenciadas tiende a normalizarse respecto al control en la condición de Aldo100 + ProA1000. Estos resultados sugieren que este polifenol es capaz de contrarrestar los efectos nocivos de la hormona esteroidea sobre el daño celular. Aunque se aprecia una tendencia, los valores de los errores estándar son altos, y las diferencias entre condiciones no son significativas. Es de esperar que realizando este análisis con un grupo muestral más grande los resultados fueran más concluyentes.

Se ha observado que el tratamiento con proantocianidinas revertía los efectos causados por el tratamiento con aldosterona sobre células cardíacas H9c2. Aumentaron la viabilidad celular y redujeron el daño celular y el número de células diferenciadas. De la misma forma, cabe esperar que este polifenol pueda reducir el número de radicales superóxido en el entorno mitocondrial gracias a su capacidad antioxidante.

No obstante, los resultados solo proponen las proantocianidinas como agente cardioprotector, sería necesario un grupo muestral más amplio y un mayor número de repeticiones por condición para obtener datos más concluyentes.

Son fundamentales análisis adicionales a este estudio, como un experimento en modelos animales atendiendo a diversos aspectos producidos por la estimulación con aldosterona relacionados con la hipertrofia cardíaca, y los efectos de las proantocianidinas sobre dichos aspectos antes de concluir la efectividad de este polifenol como cardioprotector y proponerlo como un tratamiento en casos de hiperaldosteronismo.

## 7. CONCLUSIONES

La co-incubación de células H9c2 estimuladas con aldosterona y co-incubadas con proantocianidinas:

1. Reduce la muerte celular relacionada con la acción de la hormona aldosterona
2. Disminuye el daño al ADN nuclear producido por la aldosterona, así como el número de células diferenciadas debido a este daño al material genético.

Los resultados sugieren que las proantocianidinas podrían estar aumentando la supervivencia celular a través de su capacidad para disminuir el daño genético y el grado de diferenciación celular en un modelo in vitro de HC producida por exceso de aldosterona.



## 8. REFERENCIAS

- Adrián Galiana Rodríguez-Barbero (2016) "Efectos de las proantocianidinas sobre las alteraciones cardíacas producidas por la aldosterona en rata: mecanismos implicados", 293.
- Amini, M., Zayeri, F. and Salehi, M. (2021) "Trend analysis of cardiovascular disease mortality, incidence, and mortality-to-incidence ratio: results from global burden of disease study 2017", *BMC Public Health*. BMC Public Health, 21(1), pp. 1–12. doi:10.1186/s12889-021-10429-0.
- Barbedo, J. (2013) "Automatic Object Counting In Neubauer Chambers". doi:10.14209/sbrt.2013.224.
- Briet, M. and Schiffrin, E. L. (2011) "The role of aldosterone in the metabolic syndrome.", *Current hypertension reports*. United States, 13(2), pp. 163–172. doi:10.1007/s11906-011-0182-2.
- Briones, A. M., Rodrigues, R. and Rodrigues-Díez, R. (2020) "RECEPTOR MINERALOCORTICOIDE EXTRARRENAL. UNA POSIBLE NUEVA DIANA PARA COMBATIR EL DAÑO VASCULAR", *An Real Acad Farm*, 86, pp. 61–73. Available at: www.analesranf.com.
- Farman, N. and Rafestin-Oblin, M. E. (2001) "Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity", *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 280(2 49-2). doi:10.1152/ajprenal.2001.280.2.f181.
- Felpeto-Santero, C. (2016) "Producción de esteroides mediante ingeniería de citocromos". CSIC - Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB).
- Freel, E. M. and Connell, J. M. C. (2004) "Mechanisms of hypertension: The expanding role of aldosterone", *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(8), pp. 1993–2001. doi:10.1097/01.ASN.0000132473.50966.14.
- De Giusti, V. C., Caldiz, C. I., Ennis, I. E., Pérez, N. G., Cingolani, H. E. and Aiello, E. A. (2013) "Mitochondrial reactive oxygen species (ERO) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS)", *Frontiers in Physiology*, 4 MAY(May), pp. 1–9. doi:10.3389/fphys.2013.00126.
- González-Núñez, D. and Poch, E. (2006) "Aldosterona: Aspectos fisiopatológicos fundamentales y nuevos mecanismos de acción en la nefrona distal", *Nefrología*, 26(3), pp. 291–303.
- Gouda, E., Toba, H., Yamada, H. and Tatsumi, T. (2008) "Oxidase – Dependent Reactive Oxygen Species and Induces Myocyte Apoptosis", *Hypertens Res*, 31(2), pp. 363–375.
- Greca, A. A. (2006) "Redescubrimiento de la aldosterona", *Revista Medica de Rosario*, 72(2), pp. 52–56.
- Guitart-Mampel, M., Urquiza, P., Borges, J. I., Lymperopoulos, A. and Solesio, M. E. (2021) "Impact of Aldosterone on the Failing Myocardium: Insights from Mitochondria and Adrenergic Receptors Signaling and Function", *Cells* . doi:10.3390/cells10061552.
- Gutiérrez, A. Ponte, G. Leyva, A y Valdés, M. (2016) "Aldosterona: sus implicaciones en las enfermedades del corazón | Gutiérrez López | CorSalud", *CorSalud*, 8(2078–7170), pp. 177–182. Available at: <http://www.revcorsalud.sld.cu/index.php/cors/article/view/138/328>.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. (2005) "Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633", *Theriogenology*, 63(8), pp. 2311–2322. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.010>.
- Haze, T., Hirawa, N., Yano, Y., Tamura, K., Kurihara, I., Kobayashi, H., Tsuiki, M., Ichijo, T., Wada, N., Katabami, T., Yamamoto, K., Oki, K., Inagaki, N., Okamura, S., Kai, T., Izawa, S., Yamada, M., Chiba, Y., Tanabe, A. and Naruse, M. (2021) "Association of aldosterone and blood pressure with the risk for cardiovascular events after treatments in primary aldosteronism", *Atherosclerosis*. Elsevier B.V., 324(March), pp. 84–90. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.033.
- Hermidorff, M. M., de Assis, L. V. M. and Isoldi, M. C. (2017) "Genomic and rapid effects of aldosterone: what we know and do not know thus far", *Heart Failure Reviews*. Heart Failure Reviews, 22(1), pp. 65–89. doi:10.1007/s10741-016-9591-2.
- HUNG, C.-S., CHANG, Y.-Y., TSAI, C.-H., LIAO, C.-W., PENG, S.-Y., LEE, B.-C., PAN, C.-T., WU, X.-M., CHEN, Z.-W., WU, V.-C., WAN, C.-H., YOUNG, M. J., CHOU, C.-H. and LIN, Y.-H. (2022) "Aldosterone suppresses cardiac mitochondria", *Translational Research*, 239, pp. 58–70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.08.003>.

Ibarrola, J., Sadaba, R., Martínez-Martínez, E., García-Peña, A., Arrieta, V., Álvarez, V., Fernández-Celis, A., Gainza, A., Cachofeiro, V., Santamaria, E., Fernández-Irigoyen, J., Jaissner, F. and Lopez-Andres, N. (2018) "Aldosterone Impairs Mitochondrial Function in Human Cardiac Fibroblasts via A-Kinase Anchor Protein", *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11. doi:10.1038/s41598-018-25068-6.

Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F. and Ameisen, J. C. (1995) "YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability", *Journal of Immunological Methods*, 185(2), pp. 249–258. doi:10.1016/0022-1759(95)00172-7.

Instituto Nacional De Estadística (2021) "Datos @ www.ine.es", *Instituto Nacional De Estadística*. Available at: <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=2903#!tabs-tabla>.

Jiménez-Navarro, M. F., Gómez-Doblas, J. J., Cabrera-Bueno, F., Cruz-Ocaña, E., Rodríguez-Bailón, I., Ruiz-Galdón, M., Morell, M., Molero, E. and de Teresa-Galván, E. (2005) "Síntesis de colágeno e insuficiencia cardíaca", *Revista Española de Cardiología*, 58(8), pp. 975–978. doi:<https://doi.org/10.1157/13078135>.

Kauffman, M. E., Kauffman, M. K., Traore, K., Zhu, H., Trush, M. A., Jia, Z. and Li, Y. R. (2016) "MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ERO.", *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)*, 2(5), pp. 361–370. doi:10.20455/ERO.2016.865.

Kimes, B. W. and Brandt, B. L. (1976) "Properties of a clonal muscle cell line from rat heart", *Experimental Cell Research*, 98(2), pp. 367–381. doi:10.1016/0014-4827(76)90447-X.

Kuzmicić, J., Del Campo, A., López-Crisosto, C., Morales, P. E., Pennanen, C., Bravo-Sagua, R., Hechenleitner, J., Zepeda, R., Castro, P. F., Verdejo, H. E., Parra, V., Chiong, M. and Lavandero, S. (2011) "Mitochondrial dynamics: A potential new therapeutic target for heart failure", *Revista Espanola de Cardiologia*, 64(10), pp. 916–923. doi:10.1016/j.recesp.2011.05.018.

Lacerda, L. H. G., Parreira, R. C., Vasconcellos, R., Lima, S. S., Santos, A. K., Fontana, V., Sandrim, V. C. and Resende, R. R. (2018) "Treatment-Resistant Hypertension: An Update in Device Therapy", *Blood Pressure - From Bench to Bed*, 7. doi:10.5772/intechopen.76707.

Martín-Fernández, B., de las Heras, N., Miana, M., Ballesteros, S., Valero-Muñoz, M., Vassallo, D., Davel, A. P., Rossoni, L. V., Cachofeiro, V. and Lahera, V. (2012) "Spironolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: Involvement of serum- and glucocorticoid-regulated kinase type 1", *Experimental Physiology*, 97(6), pp. 710–718. doi:10.1113/expphysiol.2011.063230.

Martín-Fernández, B., de las Heras, N., Valero-Muñoz, M., Ballesteros, S., Yao, Y.-Z., Stanton, P. G., Fuller, P. J. and Lahera, V. (2014) "Beneficial Effects of Proanthocyanidins in the Cardiac Alterations Induced by Aldosterone in Rat Heart through Mineralocorticoid Receptor Blockade", *PLOS ONE*. Public Library of Science, 9(10), p. e111104. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111104>.

Martín-Fernández, B., De Las Heras, N., Valero-Muñoz, M., Ballesteros, S., Yao, Y. Z., Stanton, P. G., Fuller, P. J. and Lahera, V. (2014) "Beneficial effects of proanthocyanidins in the cardiac alterations induced by aldosterone in rat heart through mineralocorticoid receptor blockade", *PLoS ONE*, 9(10), pp. 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0111104.

Martín-Fernández, B., Rubio-Navarro, A., Cortegano, I., Ballesteros, S., Alía, M., Cannata-Ortiz, P., Olivares-Álvaro, E., Egido, J., De Andrés, B., Gaspar, M. L., De Las Heras, N., Lahera, V. and Moreno, J. A. (2016) "Aldosterone induces renal fibrosis and inflammatory M1-macrophage subtype via mineralocorticoid receptor in rats", *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0145946.

Núñez, L., Caballero, R., Gómez, R., Vaquero, M., Delpón, E. and Tamargo, J. (2006) "Mecanismo de acción de la eplerenona", *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(2), pp. 31B-47B. doi:[https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(06\)75301-8](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(06)75301-8).

Oyama, K., Takahashi, K. and Sakurai, K. (2009) "Cardiomyocyte H9c2 Cells Exhibit Differential Sensitivity to Intracellular Reactive Oxygen Species Generation with Regard to Their Hypertrophic vs Death Responses to Exogenously Added Hydrogen Peroxide", *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2009/10/28. the Society for Free Radical Research Japan, 45(3), pp. 361–369. doi:10.3164/jcfn.09-47.

Pons Vila, Z. (2016) "Effect of grape-seed polyphenols in endothelial dysfunction and hypertension associated with metabolic syndrome in cafeteria diet-fed rats", *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*, p. 326. Available at: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/348871>.

Queisser, N., Oteiza, P. I., Stopper, H., Oli, R. G. and Schupp, N. (2011) "Aldosterone induces

oxidative stress, oxidative DNA damage and NF- $\kappa$ B-activation in kidney tubule cells", *Molecular Carcinogenesis*, 50(2), pp. 123–135. doi:10.1002/mc.20710.

Roche Manual (2005) "Cell Proliferation Kit II ( XTT )", *Manual*, (6), pp. 1–4.

Rossier, B. C. (1989) "Mechanisms of Action of Mineralocorticoid Hormones", *Endocrine Research*. Taylor & Francis, 15(1–2), pp. 203–226. doi:10.1080/07435808909039097.

Tagle, R. and Michea, L. (2013) "Espironolactona en hipertensión arterial resistente", 18(1), pp. 19–26.

Torres-Bugarín, O. and Ramos-Ibarra, M. L. (2013) "Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico", *International Journal of Morphology*, 31(2), pp. 650–657. doi:10.4067/s0717-95022013000200050.

Ulate, G. and Ulate Campos, A. (2009) "Actualización en los mecanismos fisiopatológicos de la insuficiencia cardiaca", *Acta Médica Costarricense*, 50(1). doi:10.51481/amc.v50i1.345.

Yang, J. and Young, M. J. (2009) "The mineralocorticoid receptor and its coregulators", *Journal of Molecular Endocrinology*, 43(2), pp. 53–64. doi:10.1677/JME-09-0031.

Yap, B. W. and Sim, C. H. (2011) "Comparisons of various types of normality tests", *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 81(12), pp. 2141–2155. doi:10.1080/00949655.2010.520163.

Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. and Patiño, A. (2005) "El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos ", *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* . scieloes , pp. 227–236.

## ANEXO

	Control	A100	P10	P100	P1000	A100+P10	A100+P100	A100+P1000
<b>Valor W</b>	0,8753	0,9958	0,8746	0,9356	0,9616	0,9691	0,9509	0,9356
<b>Valor P</b>	0,3106	0,8767	0,3088	0,5098	0,6233	0,6623	0,5734	0,5098

Figura 1. Datos W y P para el cálculo del análisis Shapiro-Wilk, tomando como valor de  $\alpha$  0,05.

	Diferencia ente medias	Valor P ajustado	Debajo del límite	Significativo
<b>Control vs Aldo100</b>	16,88	0,0054	Sí	**
<b>Control vs ProA1000</b>	-9,753	0,1397	No	NS
<b>Aldo100 vs Aldo100 + ProA1000</b>	-24,12	0,0002	Sí	***

Figura 2. Datos obtenidos por el test Boferroni de múltiple comparación.

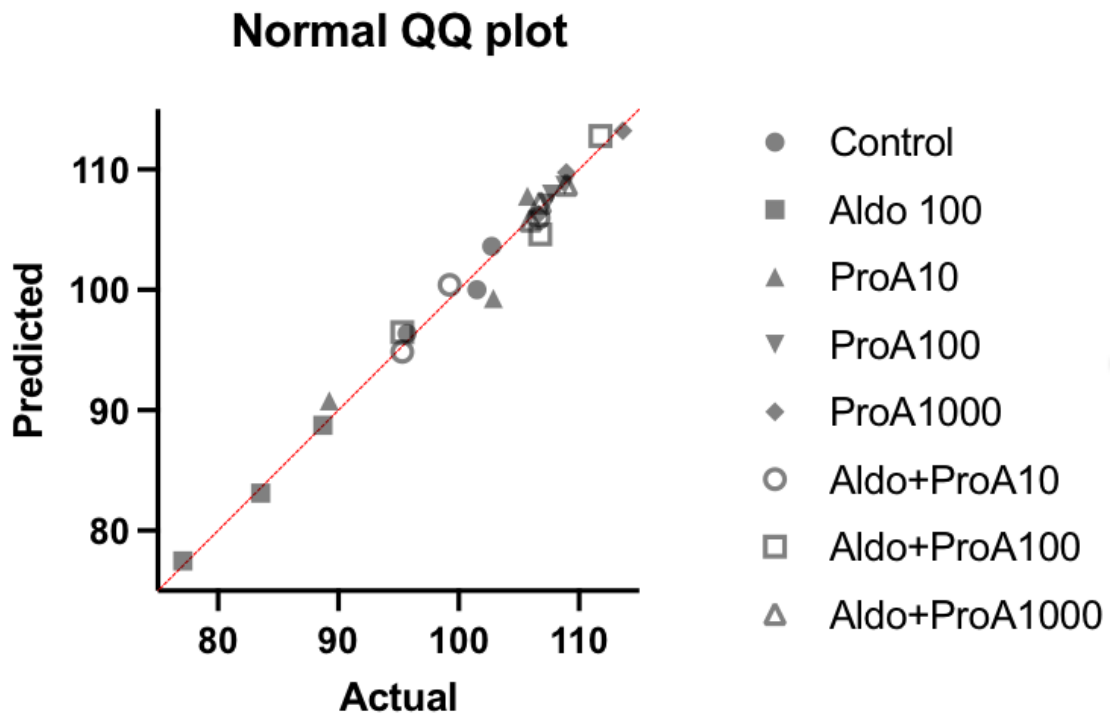


Figura 3. Representación Q-Q de la distribución de probabilidad de las diferentes condiciones frente a una distribución de probabilidad normal.