



universidad  
de León



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**Estudio de los efectos de la combinación de  
polifenoles sobre las alteraciones  
producidas por la estimulación con  
aldosterona en células cardíacas**

**Study of the effects of a combination of  
polyphenols on the alterations produced by  
the stimulation of cardiac cells with  
aldosterone**

**Autora: Elea Serrano Martínez**

**Tutora: Beatriz Martín Fernández**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Julio, 2022**

## ÍNDICE

1.1 LA ALDOSTERONA.....	1
1.2. EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS DEL EXCESO DE ALDOSTERONA .....	1
1.3. TRATAMIENTOS FRENTE A LA HIPERTROFIA CARDIACA .....	3
1.3.1. FÁRMACOS .....	3
1.3.2. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....	3
2. HIPÓTESIS .....	5
3. OBJETIVOS .....	5
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4. 1. CULTIVO CELULAR.....	6
4.2. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA CELULAR.....	6
4.3. ANÁLISIS DE OXIDACIÓN Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL .....	8
4.4. ANÁLISIS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR .....	9
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	11
4.6. ELABORACIÓN DE FIGURAS .....	11
5. RESULTADOS .....	12
5.1. SUPERVIVENCIA CELULAR .....	12
5.2. OXIDACIÓN Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL .....	14
5.3. DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	15
6. DISCUSIÓN .....	17
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....	20
8. BIBLIOGRAFÍA .....	21

## **RESUMEN**

Numerosos estudios han demostrado que la aldosterona tiene efectos oxidantes, pro-inflamatorios y pro-fibróticos que pueden conducir al desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC), cuya progresión da lugar a enfermedades cardiovasculares. A pesar de la existencia de tratamientos frente a la HC es necesario identificar nuevos agentes capaces de frenar su progresión. En los últimos años se ha observado que ciertos polifenoles poseen efectos cardioprotectores. El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos de la combinación de polifenoles sobre las alteraciones moleculares producidas por la aldosterona en un modelo *in vitro* de HC. Para ello, se estimularon cardiomiocitos H9c2 de rata con aldosterona y se co-incubaron con la combinación de dos polifenoles; proantocianidinas (ProA) y galato de epigallocatequina (EGCG). Se realizó el análisis de la supervivencia celular, el análisis de la oxidación y actividad mitocondrial y se valoró el grado de diferenciación celular. La estimulación con aldosterona redujo la supervivencia celular, lo que confirma las alteraciones moleculares que provoca sobre los cardiomiocitos. En cuanto a los tratamientos, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. Sin embargo, se puede concluir que el tratamiento con una combinación de ProA y EGCG en dosis elevadas puede llegar a ser perjudicial para las células.

## **ABSTRACT**

Numerous studies have shown that aldosterone has oxidative, pro-inflammatory and pro-fibrotic effects that can lead to the development of cardiac hypertrophy (CH), the progression of which can develop into cardiovascular diseases. Despite the existence of treatments for CH, there is a need to identify new agents capable of slowing its progression. Recently, certain polyphenols have shown cardioprotective effects. The aim of this work is to study the effects of a combination of polyphenols on the molecular alterations produced by aldosterone in an *in vitro* model of CH. To this end, rat H9c2 cardiomyocytes were stimulated with aldosterone and co-incubated with the combination of two polyphenols; proanthocyanidins (ProA) and epigallocatechin gallate (EGCG). Analysis of cell survival, analysis of mitochondrial oxidation and activity and assessment of the degree of cell differentiation were performed. Aldosterone stimulation reduced cell survival, confirming the molecular alterations it causes in cardiomyocytes. As for the treatments, no statistically significant results were obtained. However, it can be concluded that treatment with a combination of ProA and EGCG at high doses may be detrimental to cells.

## **PALABRAS CLAVE**

Aldosterona, especies reactivas del oxígeno, galato de epigallocatequina, hipertrofia cardíaca, proantocianidinas.

## **KEY WORDS**

Aldosterone, reactive oxygen species, epigallocatechin gallate, cardiac hypertrophy, proanthocyanidins.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 LA ALDOSTERONA**

La aldosterona es una hormona mineralocorticoide sintetizada en las células de la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal, en una serie de reacciones enzimáticas cuyo sustrato inicial es el colesterol (Raman *et al.*, 1966) . También se ha descrito que hay producción local de aldosterona en otros tejidos, principalmente: el sistema nervioso central (Geerling y Loewy, 2009), el tejido adiposo (Briones *et al.*, 2012) y el sistema cardiovascular (Takeda *et al.*, 1995; Hatakeyama *et al.*, 1996; Satoh *et al.*, 2002).

La principal función fisiológica de la aldosterona es regular la concentración de iones en la nefrona distal del riñón. La aldosterona aumenta la síntesis de canales ENaC (canal epitelial de sodio), lo que induce un aumento en la reabsorción de Na<sup>+</sup> a la sangre, que es compensado con la excreción de K<sup>+</sup> a la orina por canales ROMK (canal de potasio medular exterior renal) (Roy *et al.*, 2015). Por lo tanto, está implicada en la regulación del volumen de fluido extracelular y la presión sanguínea (Schiffrin, 2006).

La aldosterona puede ejercer su acción a través de los siguientes mecanismos:

Genómicos: unión de la aldosterona a receptores citoplasmáticos de mineralocorticoides (RM), formando un complejo receptor-hormona, que migra al núcleo y desencadena la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en las acciones de la aldosterona (Cachofeiro *et al.*, 2010). En el sistema cardiovascular, los RM se expresan en cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y del músculo liso vascular (Funder, 2010).

No genómicos: se observan en pocos minutos y están mediados por receptores intracelulares o cascadas de mensajeros secundarios (Cachofeiro *et al.*, 2010).

## **1.2. EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS DEL EXCESO DE ALDOSTERONA**

Los niveles elevados de aldosterona se asocian con procesos patológicos, como han demostrado numerosos estudios experimentales (Brilla y Weber, 1992) y clínicos (Mizuno *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002).

Los principales efectos del exceso de aldosterona en el sistema cardiovascular son:

- Hipertensión arterial

Niveles elevados de aldosterona en sangre, incluso dentro del rango fisiológico (Vasan *et al.*, 2004), producen una reabsorción excesiva de Na<sup>+</sup> que, junto con la consecuente reabsorción de agua, aumenta el volumen sanguíneo. Esto puede conducir a un aumento en la presión arterial, y finalmente, al desarrollo de hipertensión arterial (Vaidya *et al.*, 2018).

- Aumento del estrés oxidativo

La aldosterona es capaz de reducir la capacidad antioxidante de las células (Sanz-Rosa *et al.*, 2005) y estimular la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Miyata *et al.*, 2005). Las ERO estimulan múltiples vías de señalización que conducen a la apoptosis celular y a la secreción de mediadores de la inflamación, como moléculas de adhesión y citoquinas (Rocha *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2005). Un aumento descontrolado de estos mediadores, desencadena una respuesta inflamatoria vascular, que es uno de los factores clave implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Ferreira *et al.*, 2021).

- Remodelado vascular e hipertrofia cardiaca

Numerosos estudios han demostrado que la aldosterona produce el remodelado patológico de los tejidos cardiovasculares, modificando sus propiedades mecánicas (Sun *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 2002). Esto se debe a que la aldosterona estimula la expresión de moléculas pro-fibróticas, como el factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) (Chun *et al.*, 2003), que estimulan la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina (Lacolley *et al.*, 2002; Pu *et al.*, 2003) y el colágeno (Brilla *et al.*, 1994; Martín-Fernández *et al.*, 2011). Si la producción de dichas proteínas supera su degradación por las metaloproteinasas de la matriz (Brown, 2013), se produce fibrosis en el tejido. La fibrosis en los tejidos del corazón produce rigidez e incrementa el riesgo cardiovascular (Safar, 2001). La aldosterona también puede inducir el aumento del tamaño de las células del corazón que, junto con el aumento descontrolado de la matriz extracelular, aumenta el tamaño del corazón. Esta situación se conoce como hipertrofia cardiaca (HC) y se considera una respuesta fisiológica a estímulos como la hipertensión (Brilla *et al.*, 1994; Berk *et al.*, 2007). El progreso patológico de la HC puede desembocar en una insuficiencia cardiaca (Grossman *et al.*, 1975; Koren *et al.*, 1991), una alteración de los ventrículos del corazón que le impide bombear la sangre de forma eficiente, lo que conlleva graves consecuencias para el paciente (Ulate-Montero y Ulate-Campos, 2008).

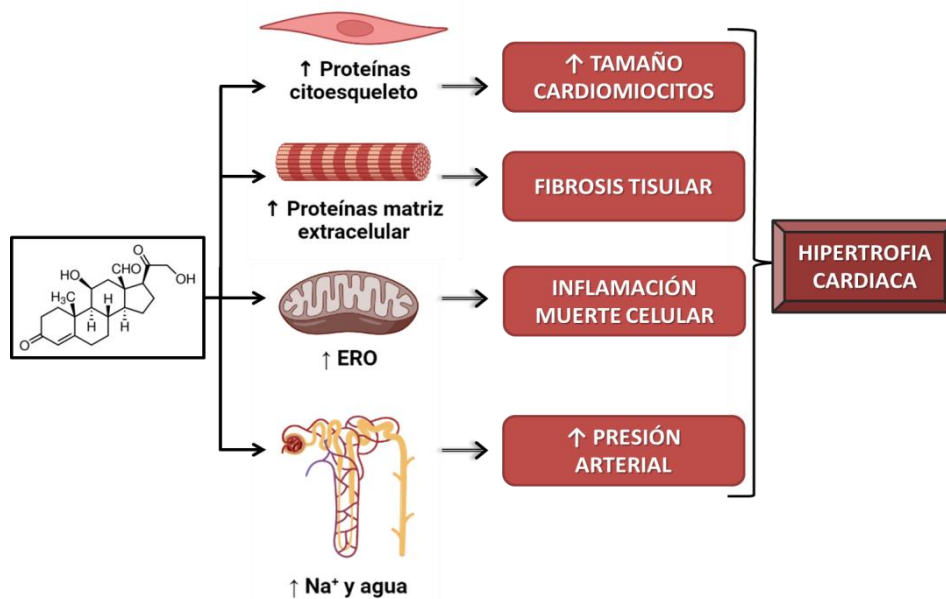


Figura 1: Acciones fisiopatológicas de la aldosterona implicadas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. ERO: especies reactivas del oxígeno.

### 1.3. TRATAMIENTOS FRENTE A LA HIPERTROFIA CARDIACA

#### 1.3.1. FÁRMACOS

Los principales fármacos desarrollados para el tratamiento de la HC son las estatinas y los inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Marian, 2009). Destacan los antagonistas de los RM, que compiten con la aldosterona, como la espironolactona (Ertram *et al.*, 1999) y la eplerona (Pitt *et al.*, 2003; Montalescot *et al.*, 2014). Sin embargo, los tratamientos actuales no son totalmente efectivos, ya que son poco específicos y muestran efectos secundarios (Seferovic *et al.*, 2015). Por tanto, es necesario continuar la búsqueda de nuevas estrategias que puedan frenar la progresión de la HC a estadios más avanzados, ya que las enfermedades cardiovasculares suponen un grave problema de salud pública.

#### 1.3.2. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de compuestos naturales, que se encuentran en alimentos y bebidas de origen vegetal (Tsao, 2010). Numerosos estudios han demostrado que son capaces de prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Iqbal *et al.*, 2008), trastornos hepáticos (Aguirre *et al.*, 2014), cáncer (Rigalli *et al.*, 2016), obesidad (Bose *et al.*, 2008) y diabetes (Wolfram *et al.*, 2006). Destacan su actividad antioxidante (Zadnipyany *et al.*, 2017), antiinflamatoria (Hernández *et al.*, 2018) y protectora contra los daños de la apoptosis celular (Ozbek *et al.*, 2015) y la HC (Raut *et al.*, 2020).

## - PROANTOCIANIDINAS

Los flavonoides son una clase de compuestos polifenólicos, cuya polimerización da lugar a taninos hidrolizables o condensados. Los taninos condensados también se conocen como proantocianidinas (figura 2) (Ky *et al.*, 2016), las cuales están presentes en frutos y bayas como los arándanos, el saúco, la grosella negra o el caqui (Rauf *et al.*, 2019).

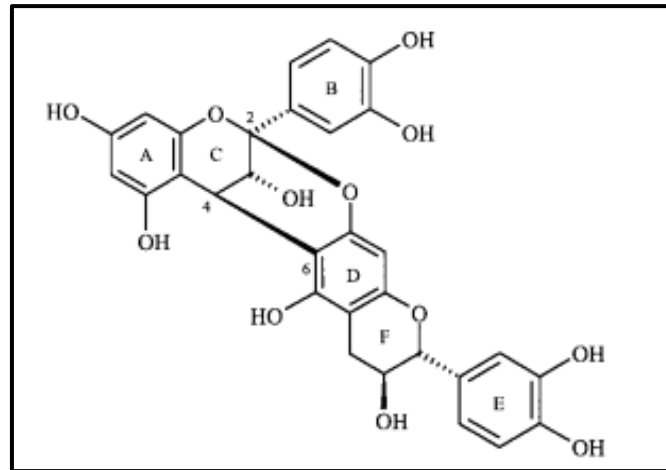


Figura 2: fórmula estructural genérica de una proantocianidina. Tomado de Ferreira y Slade ( 2002).

Las proantocianidinas han mostrado una amplia gama de efectos beneficiosos frente a diversas patologías (Shi *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2019). Su efecto más destacado es el incremento de los mecanismos de defensa antioxidantes de la célula, ya que inducen la síntesis de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Guler *et al.*, 2011; Ammar *et al.*, 2013). En estudios con modelos animales de HC, se ha comprobado que estos compuestos podrían actuar como antagonistas de los RM, de manera análoga a los fármacos antagonistas de RM convencionales (Martín-Fernández *et al.*, 2014).

## - GALATO DE EPIGALOCATEQUINA (*Epigallocatechin gallate*, EGCG)

El epigallocatequin-3-galato o galato de epigallocatequina (EGCG) es el polifenol de mayor abundancia en el té verde (Beyaz *et al.*, 2022). Estudios recientes le atribuyen notables efectos antioxidantes (Abib *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2017), antiinflamatorios (Fouad *et al.*, 2017), antidiabéticos (Luo *et al.*, 2020) y antitumorales (Al Hroob *et al.*, 2019). En estudios en animales, principalmente ratas, el tratamiento con EGCG produjo una reducción en el estrés oxidativo y en las tasas de apoptosis celular (Oyama *et al.*, 2017; Eng *et al.*, 2018; Meng *et*

*al.*, 2020). Los estudios epidemiológicos en humanos han mostrado que el consumo de té verde disminuye la mortalidad cardiovascular (Nakachi *et al.*, 2000).

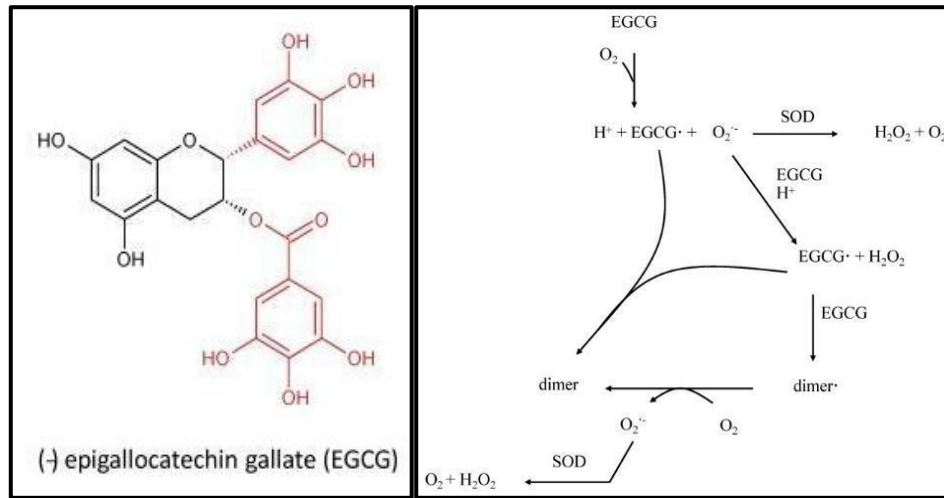


Figura 3: (A) fórmula estructural del galato de epicatequina (EGCG) y (B) su efecto antioxidante contra el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Adaptado de Legeay *et al.* (2015).

## 2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente descritos, nos planteamos que la co-incubación con la combinación de proantocianidinas y EGCG de células cardíacas de rata estimuladas con aldosterona podría prevenir el desarrollo de las alteraciones moleculares en un modelo de HC *in vitro*.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

En este trabajo, se pretende estudiar los efectos de la combinación de polifenoles sobre las alteraciones cardíacas que produce la aldosterona en un modelo *in vitro* de HC.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar las alteraciones moleculares producidas por la administración de aldosterona en células cardíacas de rata
- Estudiar los efectos de la co-incubación con proantocianidinas y EGCG sobre las alteraciones moleculares producidas por la administración de aldosterona en células cardíacas de rata



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. CULTIVO CELULAR**

Para realizar este experimento se utilizaron células de miocardio embrionario de rata (*Rattus norvegicus*) de la línea H9c2 (H9c2 (2-1), ATCC CRL-1446, ATCC, Londres, Reino Unido), las cuales poseen morfología de mioblasto y son adherentes (Kimes y Brandt, 1976). Las células fueron sembradas en placas P100 a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> y cultivadas en medio completo (MC), compuesto por: medio base DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) 1000mg/L glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Gibco, UK) al 10% previamente inactivado, glutamina 2mM (Sigma-Aldrich, UK), estreptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, UK) y penicilina 100 U/ml (Sigma-Aldrich, UK). Tras 24/48h, se retiró el medio original y se añadió medio fresco. El proceso se repitió hasta que el cultivo alcanzó un 80% de confluencia. En ese momento, se tripsinizaron las células con una solución de tripsina 2x (Gibco, UK) durante 5 minutos a 37°C. Después, la tripsinización se bloqueó con MC y se realizó el conteo celular con una cámara Neubauer, para calcular la concentración celular y sembrar la cantidad necesaria de células en las placas correspondientes a cada estudio experimental. Antes de aplicar los tratamientos con los polifenoles, las células se cultivaron durante 24h en medio de arresto (MA), medio con la misma composición que el MC, pero suplementado con FBS al 1%. El MA permite sincronizar el ciclo celular de las células del cultivo. En todos los pasos, las células fueron cultivadas en un incubador a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para los tratamientos, se diluyeron el polvo de (-)-epigallocatequina galato (extracto de té verde, pureza >80%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), en agua destilada, y el *stock* de proantocianidinas y el *stock* de aldosterona (Sigma-Aldrich, USA), en MA, hasta alcanzar las concentraciones deseadas. En el proceso, se evitó la exposición del EGGC a la luz.

### **4.2. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA CELULAR**

Para el análisis de supervivencia celular se llevó a cabo el protocolo indicado en la figura 4, utilizando el kit comercial del reactivo XTT (A8088, 1000) (PanReac ApplyCherm ITW Reagents, Darmstadt, Alemania). Se sembró una densidad de 10.000 células por pocillo, excepto 3 pocillos que sirven como blanco para la lectura con el espectrofotómetro con lector de placas (Lector de microplacas Synergy TRF, BioTek, USA).

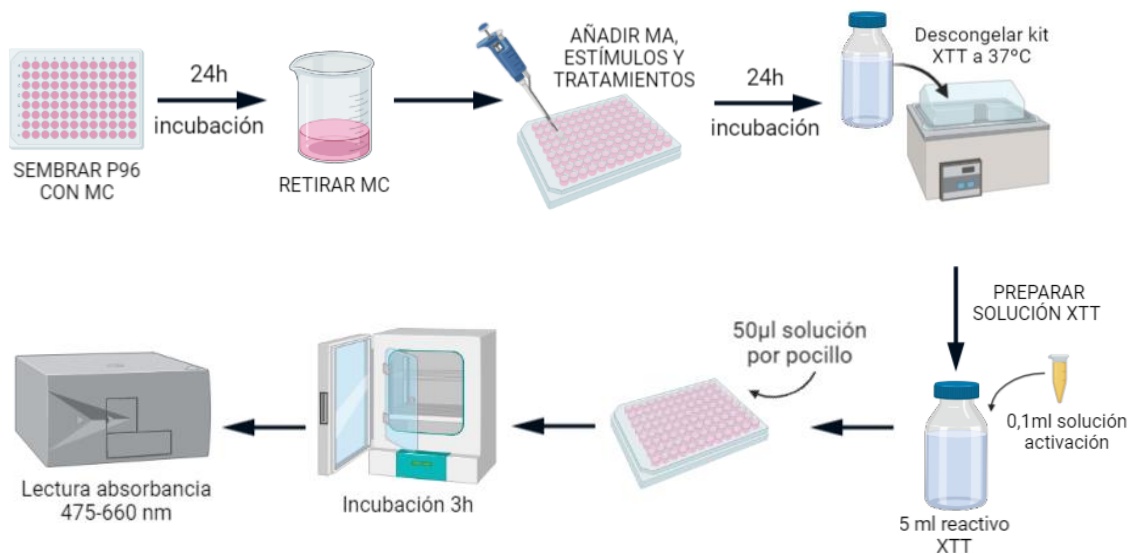


Figura 4: procedimiento análisis de supervivencia celular mediante kit comercial XTT (A8088, 1000). MC: medio completo.

Se utilizaron tres pocillos por condición con un volumen final de 100µL en cada pocillo y se aplicaron los siguientes estímulos/tratamientos:

- Control: medio de arresto
- Aldosterona 100 nM
- Proantocianidina 10 nM + EGCG 5µM
- Proantocianidina 100 nM + EGCG 5µM
- Proantocianidina 1000 nM + EGCG 5µM
- Proantocianidina 10 nM + EGCG 20µM
- Proantocianidina 100 nM + EGCG 20µM
- Proantocianidina 1000 nM + EGCG 20µM
- Aldosterona 100 nM +Proantocianidina 10 nM + EGCG µM
- Aldosterona 100 nM +Proantocianidina 100 nM + EGCG 5µM
- Aldosterona 100 nM +Proantocianidina 1000 nM + EGCG 5µM
- Aldosterona 100 nM +Proantocianidina 10 nM + EGCG 20µM
- Aldosterona 100 nM +Proantocianidina 100 nM + EGCG 20µM
- Aldosterona 100 nM +Proantocianidina 1000 nM + EGCG 20µM

### 4.3. ANÁLISIS DE OXIDACIÓN Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

Tras cultivar las células en MC (figura 5), se tripsinizaron como se ha descrito en el apartado 4.1 y, una vez homogeneizadas mediante pipeteo, se recogieron en un tubo Eppendorf™ de 1,5 mL. Las muestras se centrifugaron a 1000g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250  $\mu$ L de suero fisiológico (PBS) al 2,5% de FBS. Se utilizaron dos pocillos por condición.

Los estímulos/tratamientos fueron los siguientes:

- Control: medio de arresto
- Aldosterona 100 nM
- Aldosterona 1000 nM
- Aldosterona 100 nM + Proantocianidina 1000 nM
- Aldosterona 100 nM + Proantocianidina 1000 nM + EGCG 20  $\mu$ M

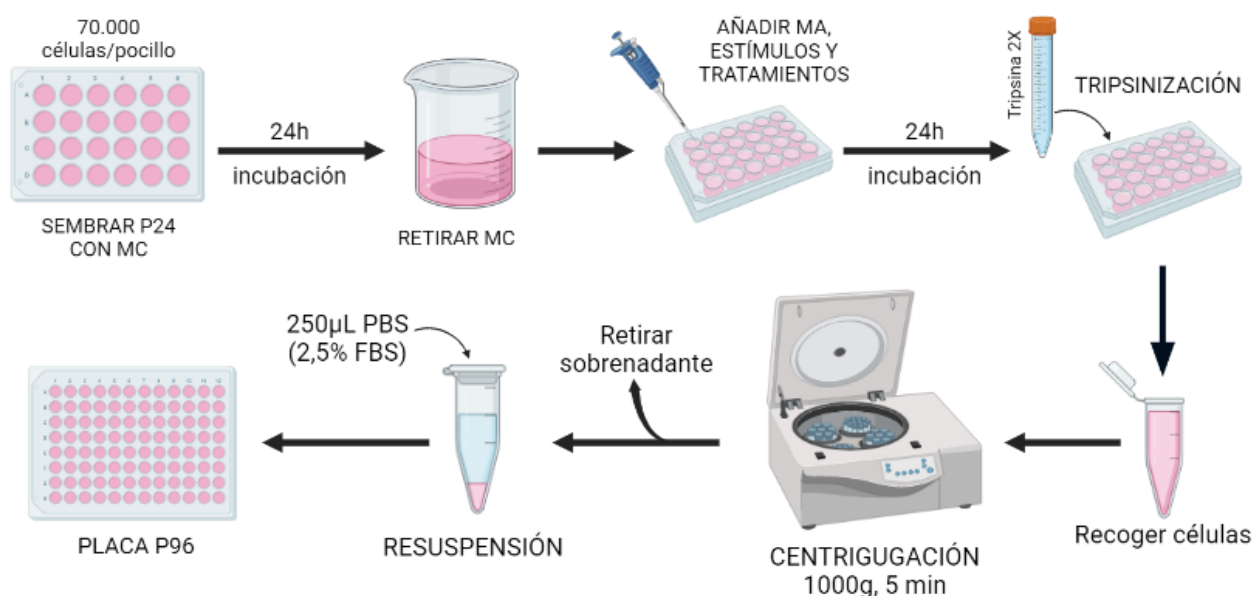


Figura 5: preparación de placa p96 para análisis de oxidación y actividad mitocondrial. MC: medio completo.

Después, se realizó una tinción con las sondas fluorescentes MitoSOX™ 5  $\mu$ M, MitoTracker Deep Red™ 1  $\mu$ M y YO-PRO-1™ 1  $\mu$ M (Invitrogen, USA), previamente descongeladas a temperatura ambiente. Por último, se procedió a la lectura en el citómetro de flujo (MACSQuant Miltenyi Biotech, Alemania) (figura 6).

El análisis de los datos obtenidos a partir de la citometría se realizó mediante el programa Weasel 3.7.1 (Battye, 2012). Los fluorocromos utilizados marcan células apoptóticas (YO-PRO™), células productoras de superóxido (MitoSOX™) y mitocondrias activas en células viables (MitoTracker™). Para el análisis estadístico, se seleccionaron las células: (1) no apoptóticas productoras de superóxido, YO-PRO™ negativas y MitoSOX™ positivas; y (2) no apoptóticas con mitocondrias activas, YO-PRO™ negativas y Mitotracker™ positivas.

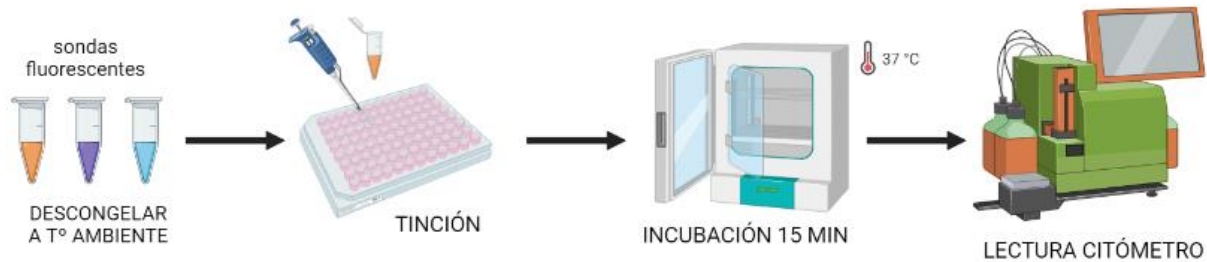


Figura 6: procedimiento análisis de oxidación y actividad mitocondrial.

#### 4.4. ANÁLISIS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Las células fueron sembradas en cubreobjetos de 12 mm (Sarstedt, USA), previamente esterilizados con luz UV, en una placa P24 (figura 7). Al día siguiente, se aplicaron los siguientes tratamientos experimentales, con dos pocillos por condición:

- Control: medio de arresto
- Aldosterona 100 nM
- Aldosterona 100 nM + Proantocianidina 1000 nM + EGCG 20 nM

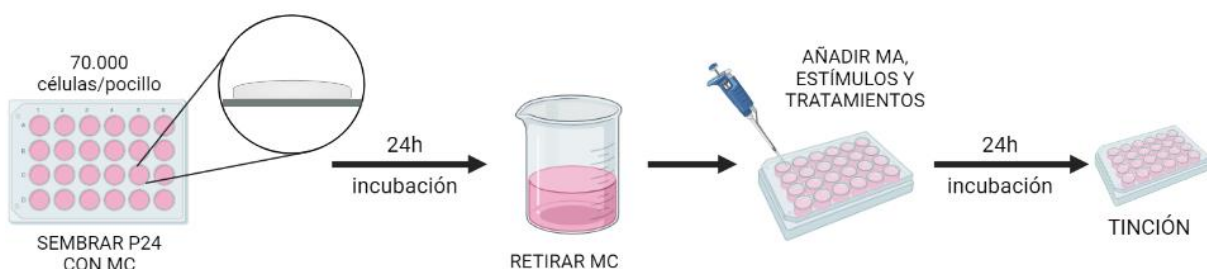


Figura 7: preparación de placa p24 para análisis de supervivencia celular. MC: medio completo.

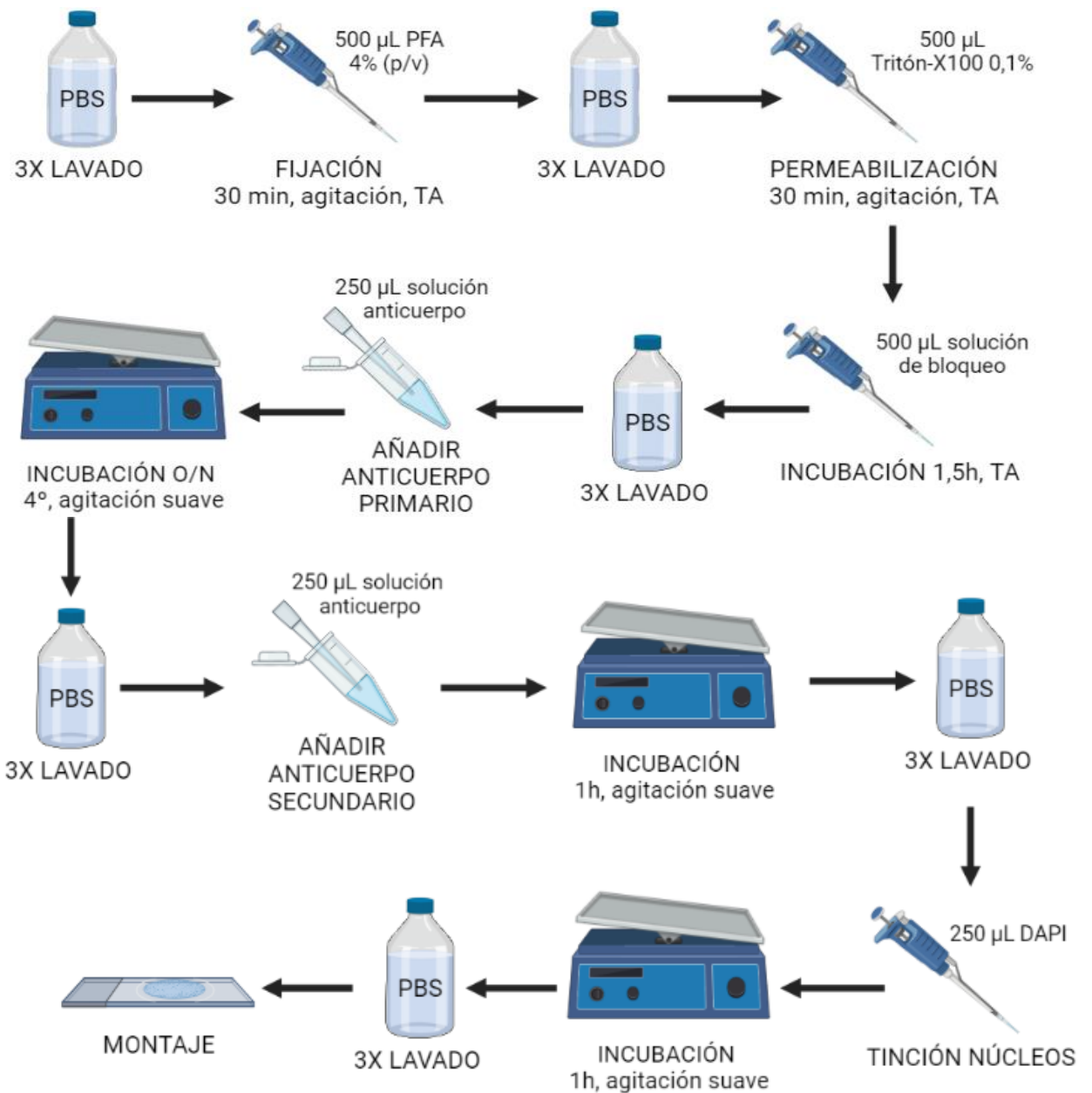


Figura 8: procedimiento tinción inmunocitoquímica. TA: temperatura ambiente; PFA: paraformaldehído; PBS: solución salina

Tras 24h de incubación con los tratamientos experimentales, se realizó la tinción inmunocitoquímica, para la detección de los núcleos celulares y la troponina I cardiaca.

Se emplearon las siguientes soluciones:

- Solución de fijación: paraformaldehído (PFA) (ThermoFisher, USA) al 4% (p/v) en solución salina (PBS)
- Solución de permeabilización de membranas: detergente Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 0,1% en PBS

- Solución de bloqueo de la permeabilización: albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) al 1% (p/v) en PBS
- Anticuerpos primarios en proporción 1:200 en solución de bloqueo. Para cada condición, se utilizó un pocillo como control negativo, que solo se incubó con solución de bloqueo.
- Anticuerpos secundarios conjugados los fluorocromos y diluidos 1:500 en PBS. Para teñir los núcleos se utilizó el fluorocromo DAPI 1 $\mu$ M (4',6-diamino-2-fenilindol) (ThermoFisher, Madrid, España) diluido en PBS y para la troponina I el fluorocromo AlexaFluor 488 (ThermoFisher, Madrid, España).

Para realizar el montaje, se añadió una gota de ProLong <sup>TM</sup> Gold Antifade Reagent (Invitrogen, USA) sobre los portaobjetos y, con ayuda de unas pinzas, se retiró el cubreobjetos del pocillo y se colocó hacia abajo sobre la gota del portaobjetos. Para la visualización de las muestras se utilizó un microscopio confocal (Zeiss LSM800, Alemania) y se realizaron fotografías con el software de imagen del equipo (Zeiss Zen 2.6, Alemania).

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar de la media. En primer lugar, se realizó el test de análisis de la varianza de una vía ordinario o *one-way ordinary* ANOVA y, posteriormente, se llevó a cabo un test de comparación múltiple Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un valor P menor de 0,05. El análisis estadístico de los resultados y la elaboración de las gráficas se realizó con el programa Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software Inc. CA, USA).

#### **4.6. ELABORACIÓN DE FIGURAS**

Las figuras del apartado “materiales y métodos” fueron realizadas con BioRender.com .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. SUPERVIVENCIA CELULAR

#### - EGCG5 vs EGCG20

En la tabla 1, se muestran los valores de supervivencia celular obtenidos para cada estímulo o tratamiento aplicado como media  $\pm$  desviación.

Tabla 1: efecto del tratamiento con distintas dosis de proantocianidinas y EGCG sobre la supervivencia celular de miocardiocitos de ratón. Se muestra porcentaje de supervivencia celular  $\pm$  desviación.

CONDICIÓN		SUPERVIVENCIA (%) $\pm$ DESVIACIÓN
	Control	100 $\pm$ 5,28
	Aldo 100	84,86 $\pm$ 6,96
EGCG 5	ProA10	87,99 $\pm$ 1,79
	ProA100	93,48 $\pm$ 4,06
	ProA1000	93,92 $\pm$ 6,35
	Aldo+ProA10	91,24 $\pm$ 10,34
	Aldo+ProA100	94,67 $\pm$ 9,53
	Aldo+ProA1000	84,61 $\pm$ 2,13
EGCG 20	ProA10	82,22 $\pm$ 3,43
	ProA100	84,36 $\pm$ 12,56
	ProA1000	97,11 $\pm$ 3,22
	Aldo+ProA10	84,31 $\pm$ 4,80
	Aldo+ProA100	85,36 $\pm$ 8,67
	Aldo+ProA1000	81,38 $\pm$ 9,19

### - COMBINACIONES PROANTOCIANIDINAS + EGCG 5 $\mu$ M

Se observa una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de supervivencia celular de las células estimuladas con aldosterona respecto al control. En cuanto al tratamiento con la combinación de polifenoles, se observa una tendencia a aumentar la supervivencia celular respecto al estímulo con aldosterona, aunque no se obtuvo una supervivencia igual al control en ningún caso. El tratamiento con ProA100 nM produjo una mayor supervivencia que el tratamiento con ProA10 nM, mientras que con ProA1000 nM se obtuvieron valores de supervivencia similares al estímulo con aldosterona.

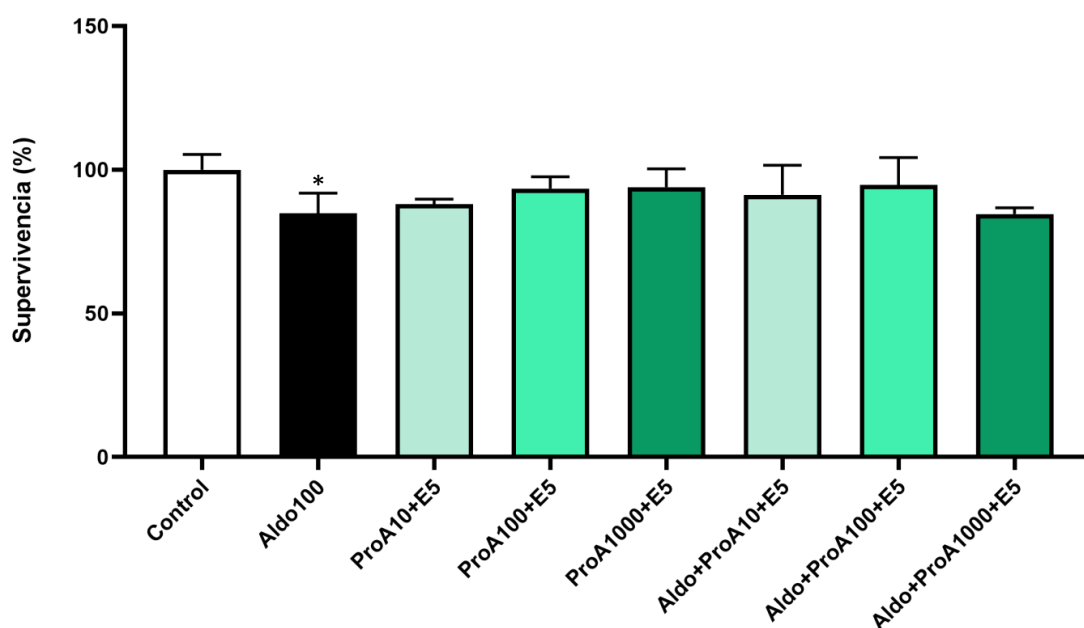


Figura 9: efecto del tratamiento con dosis crecientes de proantocianidinas junto con EGCG 5  $\mu$ M sobre la supervivencia celular de miocardiocitos de rata. Se muestran el control (blanco), estímulo con aldosterona (negro) y tratamiento con ProA 10, 100 y 1000 nM junto EGCG 5  $\mu$ M (verde). \*  $p < 0,05$  vs control

### - COMBINACIONES PROANTOCIANIDINAS + EGCG 20 $\mu$ M

En este caso, también se obtuvo una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de supervivencia celular de las células estimuladas con aldosterona respecto al control. En los tratamientos, se observa una supervivencia celular similar a la observada tras el estímulo con aldosterona. En el caso del control ProA1000+EGCG20 se observa una supervivencia de  $97,11 \pm 3,22$  (tabla 1), aunque los resultados no son estadísticamente significativos.



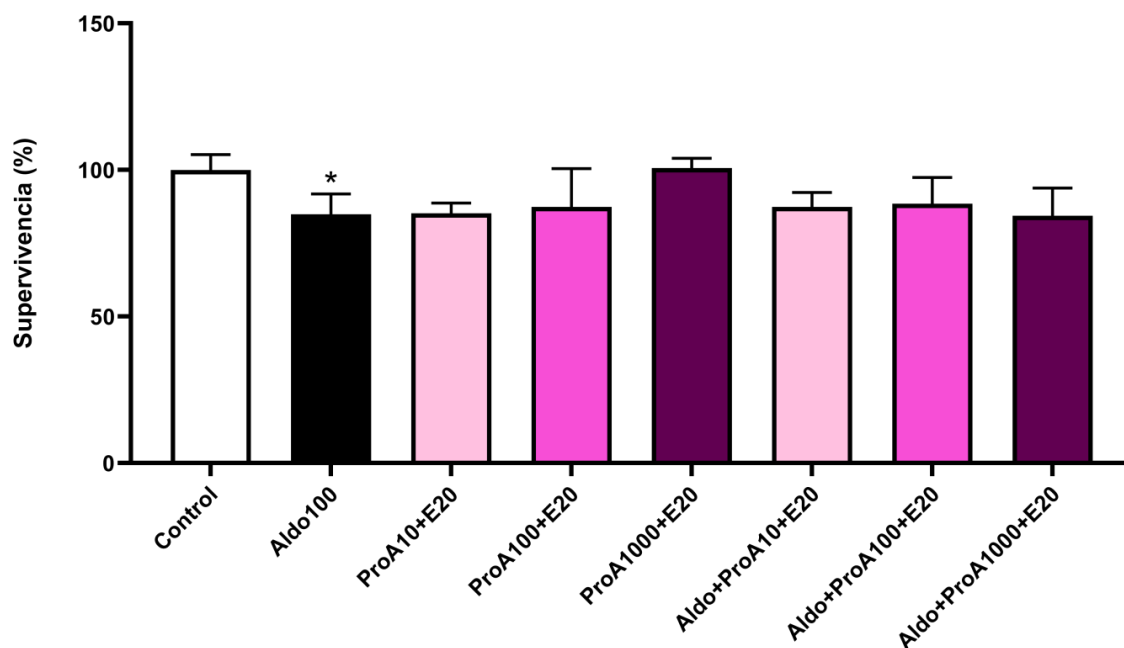


Figura 10: efecto del tratamiento con dosis crecientes de proantocianidinas junto con EGCG 20 $\mu$ M sobre la supervivencia celular de miocardiocitos de rata. Se muestran el control (blanco), estímulo con aldosterona (negro) y tratamiento con ProA 10, 100 y 1000 nM junto EGCG 20 $\mu$ M (rosa-morado). \* p<0,05 vs control

## 5.2. OXIDACIÓN Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

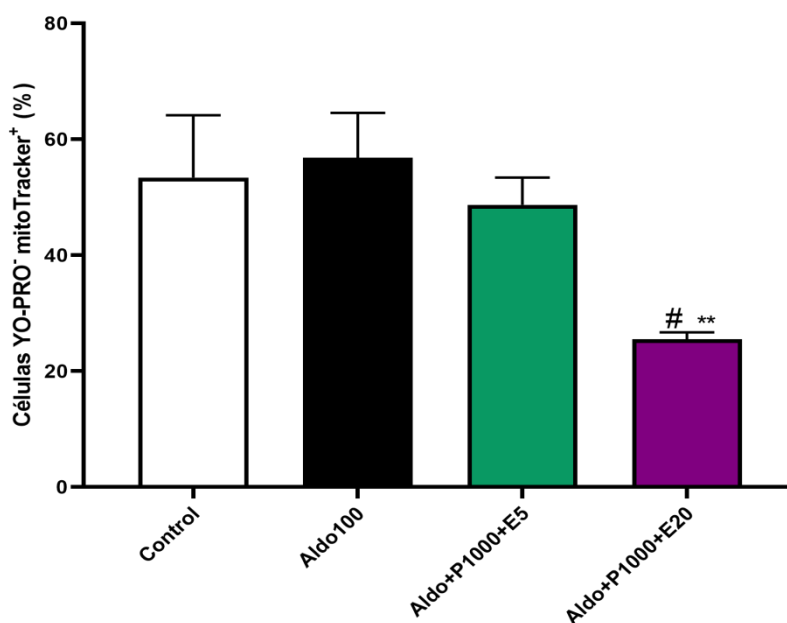


Figura 11: efecto del tratamiento conjunto con proantocianidinas y EGCG sobre la actividad mitocondrial de miocardiocitos de rata. Se muestran el control (blanco), estímulo con aldosterona (negro) y tratamientos con ProA1000+EGCG5 (verde) y ProA1000+EGCG20 (morado). # p<0,05 vs Control \*\* p<0,01 vs Aldo100.

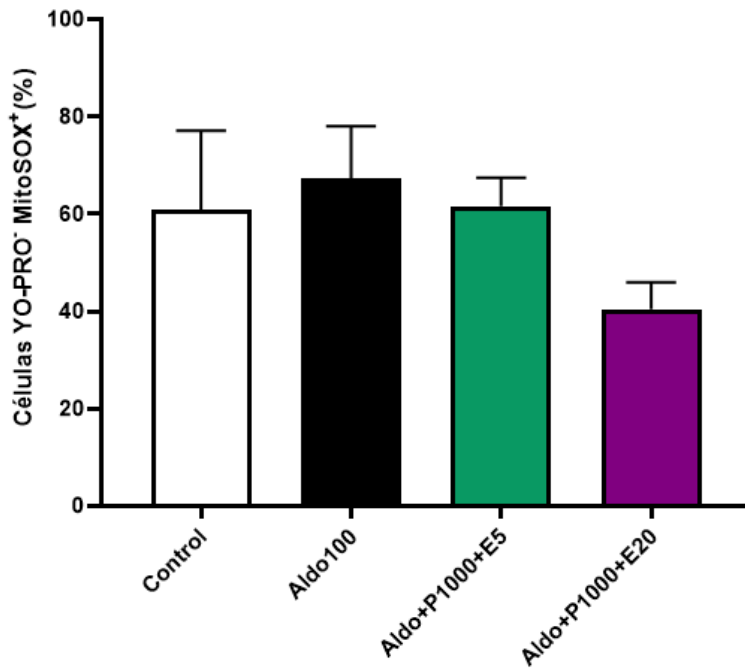


Figura 12: efecto del tratamiento conjunto con proantocianidinas y EGCG sobre la producción de especies reactivas del oxígeno por miocardiocitos de rata. Se muestran el control (blanco), estímulo con aldosterona (negro) y tratamientos con ProA1000+EGCG5 (verde) o ProA1000+EGCG20 (morado).

En la figura 11, se muestra como tanto las células estimuladas con aldosterona como las tratadas con ProA1000+EGCG5 tuvieron un porcentaje similar de mitocondrias activas a las células control. Sin embargo, con el tratamiento ProA1000+EGCG20, se redujo el número de mitocondrias activas a la mitad. En cuanto a la producción del anión superóxido (figura 12), la tendencia observada es similar. La producción aumentó en células estimuladas con aldosterona, aunque de forma no significativa, y se redujo con el tratamiento ProA1000+EGCG20 ( $p < 0,01$ ).

### 5.3. DIFERENCIACIÓN CELULAR

#### - Cambios en la morfología

La aldosterona estimuló a algunas de las células para comenzar el proceso de diferenciación celular, lo que podemos observar como un cambio en la morfología. Dichas células pasaron de una forma uniforme y redondeada a fusiforme.

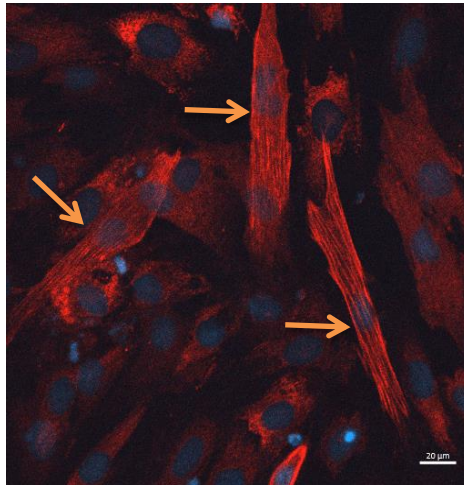


Figura 13: miocardiocitos de rata H9c2 tratados con Aldosterona 100 nM, Proantocianidina 1000nM y EGCG 20μM. Se distinguen núcleos (azul) y citoesqueleto (rojo). Se indican las células fusiformes con flechas. Imagen obtenida por microscopía confocal de fluorescencia.

#### - Apoptosis y daño del ADN

Los estímulos aplicados provocaron un aumento en el número de dos modificaciones celulares: (1) núcleos picnóticos, marcadores de apoptosis (Burgoyne, 1999) y, (2) micronúcleos, indicadores de daño en el material genético (Hayashi, 2016).

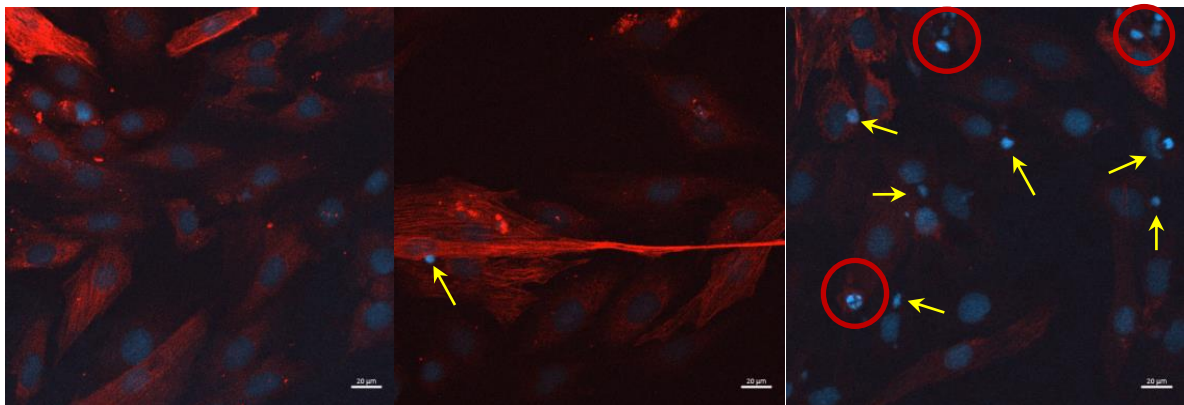


Figura 14: miocardiocitos H9c2 con tratamiento control (A), Aldo100 (B) y Aldo100+EGCG20+ProA1000 (C). Se distinguen núcleos (azul) y citoesqueleto (rojo). Se indican micronúcleos (flecha) y núcleos picnóticos (círculo). Imagen obtenida por microscopía confocal de fluorescencia.

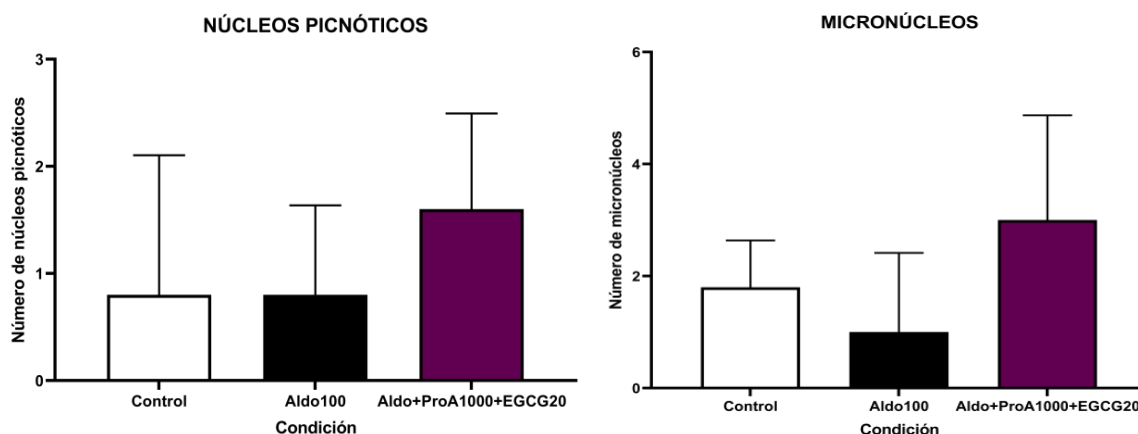


Figura 15: recuento de micronúcleos (izquierda) y núcleos picnóticos (derecha) en cardiomiocitos de rata H9c2 con tratamiento control (blanco), Aldo100 (negro) y Aldo100+EGCG20+ProA1000 (gris).

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio, se ha comprobado que el tratamiento con la combinación de dosis bajas-medias de ProA y EGCG podría contrarrestar los mecanismos moleculares patológicos de la aldosterona sobre las células cardiacas, mientras que el tratamiento con dosis altas ha resultado ser tóxico para las células.

### **El tratamiento conjunto de ProA y EGCG 5µM aumentó la supervivencia celular de las células estimuladas, mientras que el tratamiento con ProA y EGCG 20µM la disminuyó**

Numerosos estudios han demostrado que la aldosterona es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis de los cardiomiocitos mediante distintos mecanismos (Mano *et al.*, 2004; De Silva *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2013). La consecuente pérdida de cardiomiocitos funcionales desempeña un papel crucial en la transición de la hipertrofia a la insuficiencia cardíaca (Dickhout *et al.*, 2011). Como se ha mencionado previamente, los polifenoles han demostrado tener efecto protector frente a la apoptosis y se ha comprobado que en ciertas ocasiones pueden actuar de forma sinérgica (Zhou *et al.*, 2000; Kurin *et al.*, 2012). Por ello, se esperaría que la co-incubación con una combinación de dichos compuestos pudiera prevenir la apoptosis de las células estimuladas con la aldosterona.

En los resultados del análisis de supervivencia celular, hemos comprobado que la aldosterona redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) las tasas de supervivencia de las células H9c2 estimuladas

(tabla 1). El tratamiento con las combinaciones de los polifenoles en dosis bajas-medias (ProA100 y EGCG5) mostró una tendencia a aumentar los porcentajes de supervivencia (figura 8), mientras que las combinaciones con dosis altas (ProA1000 y EGCG20) los redujeron (figura 9). Una excepción fue el tratamiento ProA100 + EGCG20, el cual produjo una supervivencia celular cercana al control aunque no fue estadísticamente significativo.

En estudios previos, el tratamiento de cardiomiocitos hipertróficos con dosis de EGCG entre 10 y 100  $\mu$ M produjo una reducción de la hipertrofia de células con hipertrofia inducida, donde el efecto del EGCG fue dependiente de la dosis aplicada (Cui et al., 2008; Wu et al., 2015). Nuestros resultados sugieren que el efecto beneficioso del EGCG no se ve aumentado, si no que se bloquea cuando se combina con ProA.

### **El tratamiento conjunto de ProA y EGCG 20 $\mu$ M redujo la actividad mitocondrial y la producción de especies reactivas del oxígeno**

Las ERO son productos del metabolismo mitocondrial normal, pero su acumulación se asocia con un aumento en la apoptosis celular (Von Harsdorf *et al.*, 1999) y la disfunción mitocondrial (Miyata *et al.*, 2005; Ibarrola *et al.*, 2018), lo que promueve el remodelado cardíaco y su progresión a insuficiencia cardíaca (Ago *et al.*, 2010; Rosca *et al.*, 2013). La aldosterona puede aumentar la generación de ERO por la mitocondria y reducir la capacidad antioxidante de las células, por ejemplo inhibiendo la acción de determinadas enzimas antioxidantes (Sanz-Rosa *et al.*, 2005). En el desarrollo de la HC, también se activan vías de señalización que reprimen la función mitocondrial y que disminuyen su biogénesis (Abel y Doenst, 2011). Por lo tanto, durante la HC disminuye el número de mitocondrias funcionales de los cardiomiocitos afectados, a la vez que aumenta la producción de ERO.

Nuestros resultados mostraron que la aldosterona no alteró significativamente la actividad mitocondrial de las células (figura 11), mientras que la combinación ProA1000 + EGCG20 la redujo a la mitad. Estos datos difieren con lo observado en la literatura. Una posible explicación sería que la combinación de los dos polifenoles estimuló la muerte de las células. Esto concuerda con los resultados de la producción de ERO (figura 12), ya que un menor número de mitocondrias activas estaría dando lugar a una menor oxidación.

## **El tratamiento conjunto de polifenoles produjo genotoxicidad y muerte celular e indujo la diferenciación celular**

### **- Genotoxicidad y apoptosis**

La aldosterona aumenta la apoptosis de los cardiomiocitos a través de intermediarios como las ERO (Ibarrola *et al.*, 2018), por lo que con la estimulación de las células H9c2 con aldosterona se esperaría un incremento en el número de núcleos picnóticos, indicadores de la apoptosis. Por otro lado, la aldosterona también ha demostrado ejercer efecto genotóxico a través de las ERO, que dañan el material genético de la célula, en especial el anión superóxido (Schupp *et al.*, 2010; Queisser y Schupp, 2012). Por tanto, tras el estímulo con aldosterona, se esperaría obtener un mayor número de micronúcleos, indicadores de daño al material genético. Al contrario de lo esperado, en nuestro estudio se obtuvo un menor número de micronúcleos y un número igual de núcleos picnóticos en las células tratadas con aldosterona respecto al control. Esto se puede deber a que el recuento se realizó en un campo pequeño, por lo tanto habría que analizar un mayor número de imágenes para comprobar si realmente existen diferencias significativas entre ambas condiciones.

El tratamiento con los polifenoles aumentó el número de micronúcleos y núcleos picnóticos, lo que indica que la dosis utilizada aumenta el daño genotóxico y la apoptosis de las células estimuladas por la aldosterona. Como es bien conocido, los polifenoles tienen efectos antioxidantes. No obstante, cuando se aplican en dosis altas pueden ser pro-oxidantes (Elbling *et al.*, 2005; Mazzanti *et al.*, 2009). Por ejemplo, en un estudio *in vitro* con hepatocitos el tratamiento con EGCG 200µM redujo la viabilidad celular debido a un aumento en la síntesis de ERO (Galati *et al.*, 2006). La concentración de EGCG utilizada en nuestro experimento no debería causar un efecto dañino *per se*, pero puede que su combinación con ProA esté produciendo el mismo efecto pro-oxidante que dosis elevadas de EGCG o que no sea la adecuada para el tipo celular utilizado en este trabajo.

### **- Cambios en la morfología**

En el progreso de la HC, se produce una proliferación indebida de fibroblastos cardíacos, lo que supone el depósito excesivo de componentes de la matriz extracelular, que desemboca en fibrosis cardíaca (Stockand y Meszaros, 2003). También, se observa un aumento del área de las células cardíacas debido a la producción excesiva de filamentos del citoesqueleto (Dickhout *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, en las células estimuladas con aldosterona no se observaron cambios significativos en el tamaño, pero algunas de ellas comenzaron el proceso de diferenciación celular a fibroblasto, lo que se observa como un cambio de morfología de cardiomiocito embrionario redondeado a fibroblasto fusiforme (figura 13). Este fenómeno ha sido observado previamente en células del peritoneo, donde la aldosterona produjo un cambio de morfología redondeada a alargada, así como una pérdida de contacto entre las células (Yu *et al.*, 2015).

## 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En este estudio se comprobó que:

- La estimulación con aldosterona redujo la supervivencia celular posiblemente a través del aumento en la síntesis de ERO y la estimulación de la diferenciación celular
- El tratamiento con una combinación de ProA y EGCG en baja concentración podría prevenir los efectos dañinos de la aldosterona, mientras que una combinación en dosis elevadas puede llegar a ser perjudicial para las células

Nuestro estudio presentó ciertas limitaciones, ya que se han realizado pocas réplicas en cada análisis y se ha obtenido una gran variabilidad en los resultados. A pesar de ello, se ha podido concluir que el tratamiento con combinaciones de polifenoles en dosis altas parece ser perjudicial en un modelo de HC *in vitro*. Siguiendo con esta línea de investigación, se deberían realizar nuevos experimentos en los que se estudie el efecto del tratamiento con la combinación de los polifenoles en distintas concentraciones y con cada polifenol por separado. Por otro lado, sería conveniente testar los tratamientos en modelos *in vivo* donde se puedan analizar sus efectos a nivel fisiológico. Los polifenoles podrían utilizarse junto con los fármacos convencionales o con otras sustancias con propiedades antioxidantes, como algunas vitaminas, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertrofia cardíaca.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, E. D. y Doenst, T. (2011) "Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy", *Cardiovascular Research*. Oxford Academic, 90(2), pp. 234–242. doi:10.1093/CVR/CVR015.
- Abib, R. T., Peres, K. C., Barbosa, A. M., Peres, T. V. *et al.* (2011) "Epigallocatechin-3-gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage", *Food and Chemical Toxicology*. Pergamon, 49(10), pp. 2618–2623. doi:10.1016/J.FCT.2011.07.006.
- Ago, T., Kuroda, J., Pain, J., Fu, C., Li, H. y Sadoshima, J. (2010) "Upregulation of Nox4 by Hypertrophic Stimuli Promotes Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Myocytes", *Circulation Research*. Lippincott Williams & Wilkins, 106(7), pp. 1253–1264. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213116.
- Aguirre, L., Portillo, M. P., Hijona, E. y Bujanda, L. (2014) "Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis", *World journal of gastroenterology*. World J Gastroenterol, 20(23), pp. 7366–7380. doi:10.3748/WJG.V20.I23.7366.
- Ammar, E. S. M., Said, S. A., El-Damarawy, S. L. y Suddek, G. M. (2013) "Cardioprotective effect of grape-seed proanthocyanidins on doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats", <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2012.729065>. Taylor & Francis, 51(3), pp. 339–344. doi:10.3109/13880209.2012.729065.
- Berk, B. C., Fujiwara, K. y Lehoux, S. (2007) "ECM remodeling in hypertensive heart disease", *The Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 117(3), pp. 568–575. doi:10.1172/JCI31044.
- Beyaz, S., Gök, Ö. y Aslan, A. (2022) "The therapeutic effects and antioxidant properties of epigallocatechin-3 gallate: A new review", *International Journal of Secondary Metabolite*, 9(2), pp. 125–136. doi:10.21448/IJSM.1017559.
- BioRender.com (2022) *BioRender*. Disponible en: <https://biorender.com> (Accedido: 29 de junio de 2022)
- Bose, M., Lambert, J. D., Ju, J., Reuhl, K. R. *et al.* (2008) "The Major Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Obesity, Metabolic Syndrome, and Fatty Liver Disease in High-Fat-Fed Mice", *The Journal of Nutrition*. Oxford Academic, 138(9), pp. 1677–1683. doi:10.1093/JN/138.9.1677.
- Brilla, C. G. y Weber, K. T. (1992) "Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis", *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 120(6), pp. 893–901.
- Brilla, C. G., Zhou, G., Matsubara, L. y Weber, K. T. (1994) "Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, 26(7), pp. 809–820. doi:10.1006/JMCC.1994.1098.
- Briones, A. M., Cat, A. N. D., Callera, G. E., Yogi, A. *et al.* (2012) "Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: Implications in diabetes



mellitus-associated obesity and vascular dysfunction", *Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 59(5), pp. 1069–1078.  
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.190223.

Brown, N. J. (2013) "Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis", *Nature reviews. Nephrology*. NIH Public Access, 9(8), p. 459.  
doi:10.1038/NRNEPH.2013.110.

Burgoyne, L. A. (1999) "The Mechanisms of Pyknosis: Hypercondensation and Death", *Experimental Cell Research*. Academic Press, 248(1), pp. 214–222.  
doi:10.1006/EXCR.1999.4406.

Cachofeiro, V., Miana, M., Martín-Fernández, B., De Las Heras, N. *et al.* (2010) "Aldosterone and the cardiovascular system: a dangerous association", *Hormone molecular biology and clinical investigation*. Horm Mol Biol Clin Investig, 4(2), pp. 539–548.  
doi:10.1515/HMBCI.2010.057.

Chu, C., Deng, J., Man, Y. y Qu, Y. (2017) "Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments", *BioMed research international*. Biomed Res Int, 2017.  
doi:10.1155/2017/5615647.

Chun, T. Y., Bloem, L. J. y Pratt, J. H. (2003) "Aldosterone Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase in Neonatal Rat Cardiomyocytes", *Endocrinology*. Oxford Academic, 144(5), pp. 1712–1717. doi:10.1210/EN.2002-220956.

Cui, W., Mao, W., Du, H. y Li, N. (2008) "[Inhibitory effect of tea polyphenols and EGCG on cultured hypertrophic myocyte induced by Ang II].", *Wei Sheng yan jiu = Journal of Hygiene Research*, 37(3), pp. 356–358. Available at: <https://europepmc.org/article/med/18646540>

Dickhout, J. G., Carlisle, R. E. y Austin, R. C. (2011) "Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: Endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis", *Circulation Research*, 108(5), pp. 629–642.  
doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226803.

Elbling, L., Weiss, R.-M., Teufelhofer, O., Uhl, M. *et al.* (2005) "Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities", *The FASEB Journal*. Wiley, 19(7), pp. 1–26. doi:10.1096/FJ.04-2915FJE.

Eng, Q. Y., Thanikachalam, P. V. y Ramamurthy, S. (2018) "Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases", *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 210, pp. 296–310. doi:10.1016/J.JEP.2017.08.035.

Ertram, B., Iltis, P., Aiez, F., Annad, Z. *et al.* (1999) "The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators", *The New England journal of medicine*. N Engl J Med, 341(10), pp. 709–717.  
doi:10.1056/NEJM199909023411001.

Ferreira, D. y Slade, D. (2002) "Oligomeric proanthocyanidins: Naturally occurring O-heterocycles", *Natural Product Reports*, 19(5), pp. 517–541. doi:10.1039/B008741F.

- Ferreira, N. S., Tostes, R. C., Paradis, P. y Schiffrin, E. L. (2021) "Aldosterone, Inflammation, Immune System, and Hypertension", *American Journal of Hypertension*. Oxford University Press, 34(1), p. 15. doi:10.1093/AJH/HPAA137.
- Fouad, A. A., Qutub, H. O., Fouad, A. E. A., Audeh, A. M. y Al-Melhim, W. N. (2017) "Epigallocatechin-3-gallate counters cisplatin toxicity of rat testes", *Pharmaceutical Biology*. Taylor and Francis Ltd, 55(1), pp. 1710–1714. doi:10.1080/13880209.2017.1322618.
- Funder, J. W. (2010) "Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors in the Cardiovascular System", *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52(5), pp. 393–400. doi:10.1016/J.PCAD.2009.12.003.
- Galati, G., Lin, A., Sultan, A. M. y O'Brien, P. J. (2006) "Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins", *Free radical biology & medicine*. Free Radic Biol Med, 40(4), pp. 570–580. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.09.014.
- Geerling, J. C. y Loewy, A. D. (2009) "Aldosterone in the brain", *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. American Physiological Society, 297(3), pp. 559–576. doi:10.1152/AJPRENAL.90399.2008/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH20060955240012.JPEG.
- Grossman, W., Jones, D. y McLaurin, L. P. (1975) "Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle", *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 56(1), pp. 56–64. doi:10.1172/JCI108079.
- Guler, A., Sahin, M. A., Yucel, O., Yokusoglu, M. et al. (2011) "Proanthocyanidin prevents myocardial ischemic injury in adult rats", *Medical Science Monitor*. International Scientific Information, Inc., 17(11), pp. BR326–BR331. doi:10.12659/MSM.882042.
- Von Harsdorf, R., Li, P. F. y Dietz, R. (1999) "Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis", *Circulation*. Circulation, 99(22), pp. 2934–2941. doi:10.1161/01.CIR.99.22.2934.
- Hatakeyama, H., Miyamori, I., Takeda, Y., Yamamoto, H. y Mabuchi, H. (1996) "The expression of steroidogenic enzyme genes in human vascular cells", *Biochemistry and Molecular Biology International*. Taylor and Francis Inc., 40(3), pp. 639–645. doi:10.1080/15216549600201233.
- Hayashi, M. (2016) "The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test", *Genes and Environment*. BioMed Central Ltd., 38(1), pp. 1–6. doi:10.1186/S41021-016-0044-X/FIGURES/1.
- Hernández, M., Wicz, S., Santamaría, M. H. y Corral, R. S. (2018) "Curcumin exerts anti-inflammatory and vasoprotective effects through amelioration of NFAT-dependent endothelin-1 production in mice with acute Chagas cardiomyopathy", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(9), p. e180171. doi:10.1590/0074-02760180171.
- Al Hroob, A. M., Abukhalil, M. H., Hussein, O. E. y Mahmoud, A. M. (2019) "Pathophysiological mechanisms of diabetic cardiomyopathy and the therapeutic potential of

epigallocatechin-3-gallate", *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 109, pp. 2155–2172. doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.11.086.

Ibarrola, J., Sadaba, R., Martinez-Martinez, E., Garcia-Peña, A. *et al.* (2018) "Aldosterone Impairs Mitochondrial Function in Human Cardiac Fibroblasts via A-Kinase Anchor Protein 12", *Scientific Reports 2018 8:1*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–11. doi:10.1038/s41598-018-25068-6.

Iqbal, R., Anand, S., Ounpuu, S., Islam, S. *et al.* (2008) "Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: Results of the INTERHEART study", *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins, 118(19), pp. 1929–1937. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.738716.

Kimes, B. W. y 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.

Koren, M. J., Devereux, R. B., Casale, P. N., Savage, D. D. y Laragh, J. H. (1991) "Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension", *Annals of internal medicine*. Ann Intern Med, 114(5), pp. 345–352. doi:10.7326/0003-4819-114-5-345.

Kurin, E., Atanasov, A. G., Donath, O., Heiss, E. H. *et al.* (2012) "Synergy Study of the Inhibitory Potential of Red Wine Polyphenols on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation", *Planta Medica*. Georg Thieme Verlag KG, 78(08), pp. 772–778. doi:10.1055/S-0031-1298440.

Ky, I., Le Floch, A., Zeng, L., Pechamat, L. *et al.* (2016) "Tannins", *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, pp. 247–255. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8.

Lacolley, P., Labat, C., Pujol, A., Delcayre, C. *et al.* (2002) "Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: Effects of eplerenone", *Circulation*, 106(22), pp. 2848–2853. doi:10.1161/01.CIR.0000039328.33137.6C.

Legeay, S., Rodier, M., Fillon, L., Faure, S. y Clere, N. (2015) "Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome", *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 7(7), p. 5443. doi:10.3390/NU7075230.

Luo, K. W., Zhu, X. H., Zhao, T., Zhong, J. *et al.* (2020) "EGCG Enhanced the Anti-tumor Effect of Doxorubicine in Bladder Cancer via NF-κB/MDM2/p53 Pathway", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., 8. doi:10.3389/FCELL.2020.606123.

Mano, A., Tatsumi, T., Shiraishi, J., Keira, N. *et al.* (2004) "Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin- dependent pathways", *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, 110(3), pp. 317–323. doi:10.1161/01.CIR.0000135599.33787.CA.

Marian, A. J. (2009) "Contemporary Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy", *Texas Heart Institute Journal*. Texas Heart Institute, 36(3), p. 194. Available at: /pmc/articles/PMC2696493/ (Accessed: June 16, 2022).

Martín-Fernández, B., De Las Heras, N., Miana, M., Ballesteros, S. *et al.* (2011) "Structural, functional, and molecular alterations produced by aldosterone plus salt in rat heart: association with enhanced serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 expression", *Journal of cardiovascular pharmacology*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57(1), pp. 114–121. doi:10.1097/FJC.0B013E31820088CA.

Martín-Fernández, B., De Las Heras, N., Valero-Muñoz, M., Ballesteros, S. *et al.* (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. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0111104.

Mazzanti, G., Menniti-Ippolito, F., Moro, P. A., Cassetti, F. *et al.* (2009) "Hepatotoxicity from green tea: A review of the literature and two unpublished cases", *European Journal of Clinical Pharmacology*. Springer, 65(4), pp. 331–341. doi:10.1007/S00228-008-0610-7/TABLES/1.

Meng, J., Chen, Y., Wang, J., Qiu, J. *et al.* (2020) "EGCG protects vascular endothelial cells from oxidative stress-induced damage by targeting the autophagy-dependent PI3K-AKT-mTOR pathway", *Annals of Translational Medicine*. AME Publishing Company, 8(5), pp. 200–200. doi:10.21037/ATM.2020.01.92.

Miyata, K., Rahman, M., Shokoji, T., Nagai, Y. *et al.* (2005) "Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells", *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(10), pp. 2906–2912. doi:10.1681/ASN.2005040390.

Mizuno, Y., Yoshimura, M., Yasue, H., Sakamoto, T. *et al.* (2001) "Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans", *Circulation*. *Circulation*, 103(1), pp. 72–77. doi:10.1161/01.CIR.103.1.72.

Montalescot, G., Pitt, B., Lopez De Sa, E., Hamm, C. W. *et al.* (2014) "Early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure: The Randomized Double-Blind Reminder Study", *European Heart Journal*. Oxford Academic, 35(34), pp. 2295–2302. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHU164.

Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M. *et al.* (2000) "Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention", *BioFactors*. John Wiley & Sons, Ltd, 13(1–4), pp. 49–54. doi:10.1002/BIOF.5520130109.

Oyama, J., Shiraki, A., Nishikido, T., Maeda, T. *et al.* (2017) "EGCG, a green tea catechin, attenuates the progression of heart failure induced by the heart/muscle-specific deletion of MnSOD in mice", *Journal of Cardiology*. Japanese College of Cardiology (Nippon-Sinzobyo-Gakkai), 69(2), pp. 417–427. doi:10.1016/J.JJCC.2016.05.019.

Ozbek, N., Bali, E. y Karasu, C. (2015) "Quercetin and hydroxytyrosol attenuates xanthine/xanthine oxidase-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by regulation of oxidative stress and stress", *researchgate.net*. doi:10.4149/gpb\_2015021.

Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J. *et al.* (2003) "Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction", *New*

*England Journal of Medicine*. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS), 348(14), pp. 1309–1321. doi:10.1056/NEJMOA030207/SUPPL\_FILE/1309SA1.PDF.

Pu, Q., Neves, M. F., Viridis, A., Touyz, R. M. y Schiffrin, E. L. (2003) "Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling", *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. Hypertension, 42(1), pp. 49–55. doi:10.1161/01.HYP.0000078357.92682.EC.

Queisser, N. y Schupp, N. (2012) "Aldosterone, oxidative stress, and NF- $\kappa$ B activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases", *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 53(2), pp. 314–327. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2012.05.011.

Raman, P. B., Sharma, D. C. y Dorfman, R. I. (1966) "Studies on Aldosterone Biosynthesis in Vitro", *Biochemistry*, 5(6), pp. 1795–1804. doi:10.1021/BI00870A004.

Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Iahtisham-UI-Haq, Patel, S. *et al.* (2019) "Proanthocyanidins: A comprehensive review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier Masson, 116, p. 108999. doi:10.1016/J.BIOPHA.2019.108999.

Raut, G. K., Manchineela, S., Chakrabarti, M., Bhukya *et al.* (2020) "Imine stilbene analog ameliorate isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and hydrogen peroxide-induced apoptosis", *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 153, pp. 80–88. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.04.014.

Rigalli, J. P., Tocchetti, G. N., Arana, M. R., Villanueva, S. S. M. *et al.* (2016) "The phytoestrogen genistein enhances multidrug resistance in breast cancer cell lines by translational regulation of ABC transporters", *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 376(1), pp. 165–172. doi:10.1016/J.CANLET.2016.03.040.

Rocha, R., Rudolph, A. E., Frierdich, G. E., Nachowiak, D. A. *et al.* (2002) "Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart", *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 283(5 52-5). doi:10.1152/AJPHEART.01096.2001/ASSET/IMAGES/LARGE/H41121853106.JPEG.

Rosca, M. G., Tandler, B. y Hoppel, C. L. (2013) "Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 55(1), pp. 31–41. doi:10.1016/J.YJMCC.2012.09.002.

Roy, A., Al-Bataineh, M. M. y Pastor-Soler, N. M. (2015) "Collecting Duct Intercalated Cell Function and Regulation", *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. American Society of Nephrology, 10(2), p. 305. doi:10.2215/CJN.08880914.

Safar, M. E. (2001) "Systolic blood pressure, pulse pressure and arterial stiffness as cardiovascular risk factors", *Current opinion in nephrology and hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 10(2), pp. 257–261. doi:10.1097/00041552-200103000-00015.

Sanz-Rosa, D., Oubiña, M. P., Cediél, E., De Las Heras, N. *et al.* (2005) "Eplerenone reduces oxidative stress and enhances eNOS in SHR: Vascular functional and structural consequences", *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(9–10), pp. 1294–1301. doi:10.1089/ARS.2005.7.1294.

- Satoh, M., Nakamura, M., Saitoh, H., Satoh, H. *et al.* (2002) "Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart", *Clinical Science*. Portland Press, 102(4), pp. 381–386. doi:10.1042/CS1020381.
- Schiffrin, E. L. (2006) "Effects of aldosterone on the vasculature", *Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins, 47(3), pp. 312–318. doi:10.1161/01.HYP.0000201443.63240.a7.
- Schupp, N., Queisser, N., Wolf, M., Kolkhof, P. *et al.* (2010) "Aldosterone causes DNA strand breaks and chromosomal damage in renal cells, which are prevented by mineralocorticoid receptor antagonists", *Hormone and Metabolic Research*. © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York, 42(6), pp. 458–465. doi:10.1055/S-0029-1243253/ID/30.
- Seferovic, P. M., Pelliccia, F., Zivkovic, I., Ristic, A. *et al.* (2015) "Mineralocorticoid receptor antagonists, a class beyond spironolactone — Focus on the special pharmacologic properties of eplerenone", *International Journal of Cardiology*. Elsevier, 200, pp. 3–7. doi:10.1016/J.IJCARD.2015.02.096.
- Shah, S. M. A., Akram, M., Riaz, M., Munir, N. y Rasool, G. (2019) "Cardioprotective Potential of Plant-Derived Molecules: A Scientific and Medicinal Approach", *Dose-Response*. SAGE Publications, 17(2). doi:10.1177/1559325819852243.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E. y Kakuda, Y. (2003) "Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and Functionality", *Journal of Medicinal Food*. Mary Ann Liebert Inc., 6(4), pp. 291–299. doi:10.1089/109662003772519831.
- De Silva, D. S., Wilson, R. M., Hutchinson, C., Ip, P. C. *et al.* (2009) "Fenofibrate inhibits aldosterone-induced apoptosis in adult rat ventricular myocytes via stress-activated kinase-dependent mechanisms", *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 296(6), pp. 1983–1993. doi:10.1152/AJPHEART.00002.2009/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40070988740007.JPEG.
- Stockand, J. D. y Meszaros, J. G. (2003) "Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling", *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 284(1 53-1), pp. 176–184. doi:10.1152/AJPHEART.00421.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/H40132014006.JPEG.
- Sun, Y., Ramires, F. J. A. y Weber, K. T. (1997) "Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion", *Cardiovascular Research*, 35(1), pp. 138–147. doi:10.1016/S0008-6363(97)00097-7.
- Takeda, Y., Miyamori, I., Yoneda, T., Iki, K. *et al.* (1995) "Production of aldosterone in isolated rat blood vessels", *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 25(2), pp. 170–173. doi:10.1161/01.HYP.25.2.170.
- Tsao, R. (2010) "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols", *Nutrients 2010, Vol. 2, Pages 1231-1246*. Molecular Diversity Preservation International, 2(12), pp. 1231–1246. doi:10.3390/NU2121231.

- Ulate-Montero, G. y Ulate-Campos, A. (2008) "Revisión Actualización en los mecanismos fisiopatológicos de la insuficiencia cardiaca (Update in physiopathological mechanisms in heart failure) Resumen".
- Vaidya, A., Mulatero, P., Baudrand, R. y Adler, G. K. (2018) "The Expanding Spectrum of Primary Aldosteronism: Implications for Diagnosis, Pathogenesis, and Treatment", *Endocrine Reviews*. The Endocrine Society, 39(6), p. 1057. doi:10.1210/ER.2018-00139.
- Vasan, R. S., Evans, J. C., Larson, M. G., Wilson, P. W. F. *et al.* (2004) "Serum Aldosterone and the Incidence of Hypertension in Nonhypertensive Persons", *Massachusetts Medical Society*, 351(1), pp. 33–41. doi:10.1056/NEJM0A033263.
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Preller, M., Wang, Y. *et al.* (2006) "Epigallocatechin Gallate Supplementation Alleviates Diabetes in Rodents", *The Journal of Nutrition*. Oxford Academic, 136(10), pp. 2512–2518. doi:10.1093/JN/136.10.2512.
- Wu, X.-Q., Cai, Y., Zhao, L. y Qin, Y. (2015) "EGCG Blocked Phenylephrin-Induced Hypertrophy in H9C2 Cardiomyocytes, by Activating AMPK-Dependent Pathway", *Korean J Physiol Pharmacol*, 19, pp. 203–210. doi:10.4196/kjpp.2015.19.3.203.
- Xiao, T., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, Y. *et al.* (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 and Chemical Toxicology*. Pergamon, 53, pp. 364–370. doi:10.1016/J.FCT.2012.12.022.
- Yamamoto, N., Yasue, H., Mizuno, Y., Yoshimura, M. *et al.* (2002) "Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension", *Hypertension*, 39(5), pp. 958–962. doi:10.1161/01.HYP.0000015905.27598.E9.
- Yoshida, K., Kim-Mitsuyama, S., Wake, R., Izumiya, Y. *et al.* (2005) "Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress", *Hypertension Research*, 28(5), pp. 447–455. doi:10.1291/HYPRES.28.447.
- Yu, M., Shin, H. S., Lee, H. K., Ryu, D. R. *et al.* (2015) "Effect of aldosterone on epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells", *Kidney Research and Clinical Practice*. No longer published by Elsevier, 34(2), pp. 83–92. doi:10.1016/J.KRCP.2015.03.005.
- Zadnipyryany, I. V., Sataieva, T. P., Tretiakova, O. S., Kubyshkin, A. V. y Zukow, W. (2017) "Grape polyphenols concentrate demonstrates cardioprotection in terms of hypoxic myocardial injury", *Russian Open Medical Journal*. Russian Open Medical Journal, 6(4). doi:10.15275/RUSOMJ.2017.0404.
- Zhou, B., Jia, Z. S., Chen, Z. H., Yang, L. *et al.* (2000) "Synergistic antioxidant effect of green tea polyphenols with  $\alpha$ -tocopherol on free radical initiated peroxidation of linoleic acid in micelles", *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. The Royal Society of Chemistry, (4), pp. 785–791. doi:10.1039/A908084H.