

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Papel de la mitocondria y del estrés del retículo endoplásmico
en la disfunción arterial peneana asociada a la obesidad

Role of mitochondria and endoplasmic reticulum stress
in obesity-associated penile artery dysfunction

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alfonso Gómez del Val

DIRIGIDA POR

Dolores Prieto Ocejo
Ana Alejandra Sánchez Pina

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Programa Doctorado Farmacia



TESIS DOCTORAL

**Papel de la mitocondria y del estrés del retículo
endoplásmico en la disfunción arterial peneana asociada a
la obesidad**

**Role of mitochondria and endoplasmic reticulum stress in
obesity-associated penile artery dysfunction**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Alfonso Gómez del Val

Directoras

**Dolores Prieto Ocejo
Ana Alejandra Sánchez Pina**

A mis padres, a mi hermano y a Lu

“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible.”

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

En las próximas páginas me gustaría dedicar unas palabras a todas aquellas personas que me han apoyado, enseñado y acompañado en este camino de crecimiento profesional y personal que ha sido para mí la tesis:

Quisiera empezar, dando las gracias a la Prof. Dra. Ana Sánchez. Aquella llamada casual lo cambió todo, fue el detonante para que me decidiera a empezar el doctorado y que hoy esté donde estoy. Gracias Ana por tu apoyo, por tu tranquilidad y por todo lo que me has enseñado. Ha sido una suerte tremenda tenerte como tutora. Las casualidades no existen.

Quisiera agradecer enormemente todo el trabajo y dedicación que ha tenido la Prof. Dra. Dolores Prieto. Si ya es genial hacer aquello que te gusta y disfrutas, aprender al lado de alguien que demuestra pasión y entusiasmo y que es capaz de contagiártelo es todo un privilegio. Gracias Lola por sacar tiempo de hasta debajo de las piedras para correcciones y revisiones, por las interesantes charlas y por el apoyo y confianza en mí.

Quisiera dar las gracias a la Prof. Dra. Cristina Contreras por las técnicas que me ha enseñado, por su dedicación y por ser como es, una fuente de energía y entusiasmo en el laboratorio y fuera de él. Por los cafés, por las quedadas y por todas esas charlas. Trabajar contigo en el laboratorio y conocerte ha sido genial. No cambies nunca.

A nuestro técnico, Dj y coaching Francisco Puente quien es sin duda el alma del laboratorio. No sabes lo mucho que significas para nosotros, las conversaciones, los *temazos* pinchados, ¡y como te preocupas de que no nos falte de nada! Muchísimas gracias, Paco.

A nuestro ángel de la guarda, Macarena Martín. Por su dedicación y tiempo por resolvernos dudas en cuanto a trámites y gestiones y por ser como es de divertida y simpática. Sin ella estaríamos perdidos. ¡Muchas gracias Maca!

A mi compañera de laboratorio Lucía Olmos (A.K.A mitoTempo). Compartir laboratorio contigo ha sido el broche para los últimos años de tesis. Gracias por ser como eres, por las risas, emociones e ideas locas que se nos ocurrían. Te deseo lo mejor que va a ser mucho ya que demuestras un interés y dedicación enormes.

¡¡Ánimo!!

A la Prof. Dra. Mercedes Muñoz por las técnicas enseñadas y los momentos compartidos en el laboratorio.

Al Prof. Dr. Vitor Leite por su sentido del humor, los cafés y las exhibiciones de artes marciales en el laboratorio (todo suma).

Muchas gracias al Prof. Dr. Luis Rivera por sus charlas y aportaciones tan interesantes y por sus buenos consejos.

A la Prof. Dra. Verónica Azcutia, por los cafés, sus charlas tan entretenidas y momentos. Y también a Manolo Perales por su labor técnica y por su simpatía.

A Marina Hernández, la Dra. Prof. Claudia Rodríguez, a Claudia Quevedo y a Mariam Mohammed. Marina muchas gracias por ser como eres, por tu simpatía y preocupación, eres una persona maravillosa. Muchas gracias, Claudia por los consejos y las recomendaciones, eres genial, y toda una referente para mí. A Claudia Quevedo por los buenos momentos y las quedadas. A Mariam Mohammed por los ratos compartidos en el laboratorio. Os deseo lo mejor.

Al Prof. Dr. Alejandro Gutiérrez, a Ana Aramburu, a Araceli, Helena y Marta. A Alejandro por los consejos y recomendaciones en los primeros años de esta tesis. A Ana, Araceli, Helena y Marta por los momentos compartidos en el laboratorio y por las quedadas. ¡Mucha suerte en vuestro camino!

Dar las gracias al Prof. Dr. Albino García Sacristán, a la Prof. Dra. Sara Benedito, al Prof. Dr. Medardo Hernández, a la Dra. Paz Recio, a la Dra. Elvira López-Oliva, a la Dra. Belén Climent, al Dr. Ángel Agís, a la Dra. Rafaela Raposo, al Dr. Jorge Navarro y a la Dra. Pilar Montenegro, me he dado cuenta de que tengo la suerte de estar en un departamento que rebosa talento, profesionalidad y compañerismo. Es todo un lujo haber hecho la tesis en este departamento.

A Luisa por todas esas anécdotas y chistes mañaneros en el laboratorio que han hecho más llevaderas las mañanas. A mi compadre del metal, Raúl, por sus charlas entre experimentos y por los pasillos que han hecho más llevadera esta tesis.

Este camino también me ha llevado a lugares físicos que nunca imaginé que estaría, como ha sido la experiencia de estancia doctoral en Dinamarca.

Por ello quisiera agradecer en primer lugar al Prof. Dr. Ulf Simonsen por acogerme en su equipo, por la confianza depositada y apoyo en mí. Gracias Ulf por las charlas tan interesantes.

Quisiera agradecer enormemente el trabajo y dedicación del Prof. Dr. Simon Comerma quien me ha enseñado varias técnicas de laboratorio y quien transmite y me ha contagiado su pasión y dedicación por lo que hace. Ha sido una experiencia muy enriquecedora, muchas gracias.

Al Prof. Dr. Estéfano Pinilla quien se ha preocupado en todo momento de nuestra estancia a nivel de alojamiento, papeleos, muebles etc. Muchas gracias por las quedadas, por habernos integrado tan bien y por ser como eres.

A mis compañeros de laboratorio en Aarhus Judit Prat y Geomar Seijas. Muchas gracias, Judit por acogernos, por las quedadas y por todos esos momentos cafeteros. A Geomar por su buen humor y charlas mantenidas, y aquellos cafés mañaneros a -11°C.

A mi mujer, amante, compañera en la ciencia, en la música y en la vida, y mejor amiga Lu. Gracias por ser tan maravillosa, por ser una fuente de inspiración constante y un apoyo fundamental. Los dos decidimos en su momento empezar este camino del doctorado, lo que significa que estamos igual de locos, hemos tenido la suerte de hacer la estancia doctoral juntos ¡y hasta hemos coincidido en la misma boda! En fin, que puedo decir de una persona que lo es todo para mí, esta tesis va por ti y por todas esas metas que hemos logrado y que seguiremos alcanzando.

A mi hermano Nacho, fuente de inspiración y que no deja de sorprenderme cada día con todas las metas que logra con su esfuerzo y dedicación. Por tu sentido del humor que siempre me levanta el ánimo, por tu cariño y por tu forma de ser.

A mi tía Soña, por sus mensajes de ánimo y constante apoyo, y por preocuparse siempre de nosotros.

A mis padres. A mi padre por enseñarme a seguir adelante a pesar de las adversidades, por sus consejos, por su apoyo en todo lo que hago, por su interés y por estar siempre a mi lado, y porque no nos falte jamón en casa. A mi madre, por enseñarme a perseguir mis sueños y a luchar por ellos, por su apoyo y dedicación y por estar siempre a mi lado. ¡Muchas gracias a los dos!

Este trabajo de Investigación ha sido financiado gracias al Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación **PID2019-105689RB-I00** “OBESIDAD Y ENFERMEDAD RENAL: PAPEL DE LA MITOCONDRIA Y DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA DISFUNCIÓN VASCULAR RENAL ASOCIADA A LA OBESIDAD”, y del Proyecto **PID2022-140536OB-I00** “ROLE OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN OBESITY-ASSOCIATED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION VASCULAR COMPLICATIONS: MITOCHONDRIAL-TARGETED THERAPEUTIC STRATEGIES TO IMPROVE VASCULAR HEALTH” cuya investigadora principal es la Prof. Dra. Dolores Prieto Ocejo

ÍNDICE

SUMMARY	1
RESUMEN	8
ABREVIATURAS	15
I. REVISION BIBLIOGRÁFICA	24
1.1. DISFUNCIÓN ERÉCTIL Y SÍNDROME METABÓLICO	26
1.1.1. Fisiología de la erección	26
1.1.2. Disfunción eréctil	48
1.2. ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.....	61
1.2.1. Estrés del RE y enfermedad metabólica	66
1.2.2. Estrés del RE y disfunción endotelial	70
1.3. MITOCONDRIA Y DISFUNCIÓN VASCULAR	78
1.3.1. Mitocondria y función vascular.....	81
1.3.2. Mitocondria y disfunción endotelial	104
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	114
III. MATERIAL Y MÉTODOS	119
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	121
3.2. MATERIAL DE LABORATORIO.....	122
3.2.1. Instrumentación general	122
3.2.2. Equipamiento para el registro de la tensión isométrica arterial	122
3.2.3. Equipamiento para las medidas de bioenergética mitocondrial.....	123
3.2.4. Equipamiento para las medidas de especies reactivas de oxígeno	123
3.2.5. Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting	123
3.3. REACTIVOS.....	123
3.4. SOLUCIONES	125
3.4.1. Soluciones fisiológicas.....	125
3.4.2. Tampones utilizados en Western Blotting	126
3.4.3. Soluciones para los estudios morfológicos	128
3.4.4. Soluciones para estudios bioenergéticos mitocondriales.....	128

3.5. METODOLOGÍA PARA LOS ESTUDIOS FUNCIONALES.....	129
3.5.1. Estudio de la reactividad arterial.....	129
3.6. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	131
3.7. MEDIDAS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS.....	132
3.8. ANÁLISIS DE WESTERN BLOT	134
3.9. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	141
3.10. CÁLCULO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	142
IV. RESULTADOS.....	144
4.1. CANALES MITOK _{ATP} EN LAS ARTERIAS PENEANAS	146
4.1.1. La activación farmacológica de los canales mitoK _{ATP} induce vasodilatación de las arterias peneanas pequeñas.....	146
4.1.2. El abridor de canales mitoK _{ATP} BMS191095 activa la vía endotelial PI3K/eNOS/NO en las arterias peneanas.....	148
4.1.3. Efecto de los bloqueantes de los canales K _{ATP} y BK _{Ca} sobre las relajaciones del BMS191095 y del NO exógeno	150
4.1.4. Efectos de la activación de los canales mitoK _{ATP} sobre la bioenergética mitocondrial de las arterias peneanas.....	153
4.1.5. La activación del canal mitoK _{ATP} reduce la producción de ROS mitocondriales en arterias peneanas	158
4.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL, ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL PENEANA EN LA OBESIDAD	159
4.2.1. Parámetros bioquímicos	159
4.2.2. Disfunción endotelial peneana en la obesidad inducida por dieta.....	160
4.2.3. Los niveles de ROS mitocondriales están aumentados en arterias peneanas en la obesidad	161
4.2.4. Efecto del antioxidante mitocondrial mitoTempo y de la inhibición de la Nox en las relajaciones endoteliales de arterias peneanas de ratas HFD.....	162
4.2.5. Regulación al alza de Nox4 en el endotelio arterial peneano en la obesidad.....	164
4.2.6. Impacto de la obesidad en el perfil bioenergético mitocondrial de las arterias peneanas.....	165

4.2.7. La vasodilatación peneana inducida por activación de canales mitoK _{ATP} está alterada en la obesidad.....	167
4.2.8. Expresión de los marcadores del estrés del RE en tejido eréctil de ratas obesas	168
4.3.EL ESTRÉS DEL RE INDUCE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL, ALTERACIÓN DEL METABOLISMO REDOX Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL PENEANA	170
4.3.1. Modelo de estrés del RE inducido in vivo por tunicamicina	170
4.3.2. Expresión de los marcadores de estrés del RE en tejido eréctil de ratas tratadas con tunicamicina	171
4.3.3. El estrés del RE reduce la vasoconstricción α1-adrenérgica en arterias peneanas... ..	172
4.3.4. El estrés del RE induce disfunción endotelial en arterias peneanas	173
4.3.5. Las ROS derivadas de la Nox y ROS mitocondriales contribuyen a la disfunción endotelial peneana en ratas con estrés del RE inducido por tunicamicina	174
4.3.6. Niveles de ROS en tejido eréctil de ratas con estrés del RE	176
4.3.7. Efecto del estrés del RE sobre la bioenergética mitocondrial peneana.....	178
V. DISCUSIÓN.....	181
5.1. CANALES MITOK _{ATP} EN LAS ARTERIAS PENEANAS.....	183
5.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL, ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL PENEANA EN LA OBESIDAD.....	192
5.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL, ALTERACIÓN DEL METABOLISMO REDOX Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL PENEANA EN EL ESTRÉS DEL RE INDUCIDO POR TUNICAMICINA	199
VI. CONCLUSIONES.....	205
Conclusión final	209
VII. BIBLIOGRAFÍA	211

SUMMARY

Role of mitochondria and endoplasmic reticulum stress in obesity-associated penile artery dysfunction

Normal erectile function is primarily a vascular event that relies on vasodilation, which is largely due to both nerve- and endothelium-derived nitric oxide (NO). Thus, neural NO-mediated arterial dilatation and increased blood inflow to the corpora cavernosa produced by parasympathetic activation at the initiation of the endothelial lining in penile arteries, which, in turn, releases NO from endothelium and produces further vasodilation and sustained erection (Prieto, 2008a; Villalba et al., 2009).

Metabolic syndrome, a constellation of metabolic abnormalities including central obesity, hyperglycaemia, dyslipidaemia, and hypertension, increases the risk of cardiovascular diseases, and has been linked to vascular endothelial dysfunction and recently to the development of endoplasmic reticulum stress (ERS) (Khan et al., 2009b). For instance, it has been shown that the accelerated development of atherosclerotic lesions occurs before the onset of diabetes associated dyslipidaemia suggesting that the ER stress takes place in an early stage of diabetes, due to the expression of the ER stress markers in advanced atherosclerotic lesions at the tissue levels (Wingard et al., 2007).

AIMS

This study sought to assess the role of mitochondria and the ERS in the penile artery dysfunction in obesity. The specific aims of the study were the following:

1. To determine the effects of the activation of mitoK_{ATP} channels in penile arteries from Wistar rats.
2. To characterize the mechanisms of vascular action of mitoK_{ATP} opener BMS191095 in both endothelium and vascular smooth muscle (VSM).
3. To analyse the consequences of the activation of mitoK_{ATP} channel in the mitochondrial respiration in penile arteries.
4. To assess the possible role of mitochondrial dysfunction in endothelial and vascular dysfunction of penile arteries in obesity and insulin resistance states, using a rat model of diet-induced obesity.

5. To determine the ER stress mechanisms underlying penile endothelial and vascular dysfunction using a rat model of tunicamycin-induced ER stress.

METHODS

Functional response to the mitoK_{ATP} openers diazoxide and BMS191095 were assessed in small penile arteries from the penis of Wistar rats and High Fat Diet (HFD) obese rat. The mechanism of action of BMS191095 were tested by using inhibitors of the different pathways involved in penile relaxations. The arteries were mounted in microvascular myographs. Endothelial function was also evaluated in HFD and tunicamycin treated rats (endoplasmic reticulum stress model). Bioenergetic parameters were evaluated by Seahorse measures in penile arteries. Superoxide (O₂^{•-}) and H₂O₂ production were measured by fluorescence in penile and corpus cavernosum samples. Expression of different proteins from the ER stress were measured by Western Blot in corpus cavernosum samples.

RESULTS

Activation of mitoK_{ATP} channels by the openers BMS191095 and diazoxide induced a potent relaxation in isolated penile arteries. The relaxation induced by BMS191095 is dependent on endothelium response which involved the NO/PI3K/Akt pathway. Activation of BK_{Ca} channel is also involved in the relaxations induced by BMS191095. The selective blocker of mitoK_{ATP} channels 5-HD inhibited BMS191095 relaxations as well as the K_{ATP} channel blocker glibenclamide. Endothelial NO can activate vascular smooth muscle mitoK_{ATP} channels and its vasodilator response is inhibited by 5-HD and glibenclamide. By using BMS191095 bioenergetic parameters were significantly diminished as well as using exogenous NO. However, inhibition of NOS didn't change significantly bioenergetic parameters although the combine treatment of L-NOARG and BMS191095 unmasked a NO-independent inhibition of maximum respiration and the spare respiratory capacity by BMS191095. ROS production was diminished using BMS191095 in a NO-independent manner in penile arteries.

Obesity impaired acetylcholine (Ach) in penile arteries. ROS scavenger mitoTempo inhibited Ach relaxations in control and obese penile arteries. ROS levels were higher in obese arteries. Nox4 expression was increased in the corpus cavernosum (CC) and in the endothelium of penile arteries from obese rats. ER stress markers ATF6 α and p ϵ IF2 α were increased in the CC from obese rats. BMS191095 vasodilator response was impaired in obese penile arteries.

ER stress impaired ACh and Isoprenaline relaxations in penile arteries. MitoTempo inhibited isoprenaline relaxations in control penile arteries. Nox inhibitor apocynin as well as mitoTempo improved ACh relaxations in penile arteries from the ER stress model. The ER stress markers pPERK, ATF6 α , pIRE1 α were increased in the CC of the ER stress model rats. Vasoconstriction by Phe was impaired in the ER stress model penile arteries. Levels of Nox4 were higher whilst the MnSOD expression were lower in the CC of the ER stress model rats. Bioenergetic parameters were increased in the ER stress model penile arteries.

CONCLUSIONS

- 1- The opening of mitoK_{ATP} channels regulates penile arterial tone under physiological conditions through the involvement of the vascular endothelium, and the release of NO through the PI3K/Akt pathway, which in turn relaxes vascular smooth muscle via activation of mitoK_{ATP} channels and BK_{Ca} channels.
- 2- Activation of mitoK_{ATP} channels leads to a decrease in basal mitochondrial respiration, oxygen consumption for ATP synthesis and glycolytic activity, effects mediated in part by NO release. In the absence of endogenous NO, the opening of mitoK_{ATP} channels leads to a decrease in reserve respiratory capacity as well as maximal respiration.
- 3- Exogenous NO has a dual effect on the penile arteries, on the one hand by inhibiting basal mitochondrial respiration and oxygen consumption for ATP synthesis, and on the other hand by increasing maximal respiration as well as reserve respiratory capacity.
- 4- The opening of mitoK_{ATP} channels reduces the production of ROS, independently of NO production.
- 5- Diet-induced obesity causes endothelial dysfunction in penile arteries, as well as inhibition of mitoK_{ATP} channel-mediated regulation of penile arterial tone.
- 6- Mitochondrial ROS levels and vasodilator H₂O₂ release are increased in penile arteries of obese animals, an increase associated with endothelial up-regulation of the mitochondrial enzyme Nox4, constituting a compensatory mechanism for endothelial dysfunction due to a decreased NO bioavailability.

- 7- Bioenergetic parameters, basal respiration, ATP consumption, proton leakage and non-mitochondrial respiration, are decreased in penile arteries of obese rats, as described for skeletal and cardiac muscle during metabolic alterations with excess energy substrates and associated with increased H_2O_2 .
- 8- The ER stress response is activated in the erectile tissue of obese rats, as indicated by the increased expression of the markers pelf2 α , AT6 α .
- 9- Under conditions of chemically induced ER stress, penile vascular dysfunction is manifested by reduced arterial vasoconstriction and endothelial dysfunction.
- 10- The ER stress-induced endothelial dysfunction is due to a decrease in NO-mediated vasodilation associated with Nox-derived ROS, and a reduction in vasodilator H_2O_2 .
- 11- The ER stress increases bioenergetic parameters, oxygen consumption and glycolytic activity, which probably represents an adaptive response that would favour higher O_2 consumption by reducing ROS accumulation and promoting cell survival.

RESUMEN

Papel de la mitocondria y del estrés del retículo endoplásmico en la disfunción arterial peneana asociada a la obesidad

La función eréctil normal es principalmente un evento vascular que depende de la vasodilatación, que se debe en gran parte tanto al óxido nítrico (NO) derivado de los nervios como del endotelio. La dilatación arterial mediada por NO neural y el aumento del flujo sanguíneo a los cuerpos cavernosos producido por la activación parasimpática del revestimiento endotelial en las arterias peneanas al inicio de la erección, a su vez, libera NO del endotelio y produce una mayor vasodilatación y erección sostenida (Prieto, 2008a; Villalba et al., 2009).

El síndrome metabólico, una constelación de anomalías metabólicas que incluyen obesidad central, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión, aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares y se ha relacionado con la disfunción endotelial vascular y recientemente con el desarrollo de estrés del retículo endoplásmico (RE) (Khan et al., 2009b). Por ejemplo, se ha demostrado que el desarrollo acelerado de lesiones ateroscleróticas ocurre antes del inicio de la dislipidemia asociada a la diabetes, lo que sugiere que el estrés del RE tiene lugar en una etapa temprana de la diabetes, debido a la expresión de marcadores de estrés del RE en lesiones ateroscleróticas avanzadas a nivel tisular (Wingard et al., 2007).

OBJETIVOS

Este estudio buscó evaluar el papel de la mitocondria y el estrés del RE en la disfunción arterial peneana en la obesidad. Los objetivos específicos del estudio fueron los siguientes:

- 1- Determinar los efectos de la activación de los canales mitoK_{ATP} en las arterias peneanas de ratas Wistar.
- 2- Caracterizar los mecanismos de acción vascular del abridor de mitoK_{ATP} BMS191095 tanto en el endotelio como en el músculo liso vascular (MLV).
- 3- Analizar las consecuencias de la activación del canal mitoK_{ATP} en la respiración mitocondrial en las arterias peneanas.

- 4- Valorar el posible papel de la disfunción mitocondrial en la disfunción endotelial y vascular de las arterias peneanas en la obesidad y estados de resistencia a la insulina, utilizando un modelo en rata de obesidad inducida por dieta
- 5- Determinar los mecanismos de estrés del RE que subyacen a la disfunción endotelial y vascular peneana utilizando un modelo en rata de estrés del RE inducido por tunicamicina.

MÉTODOS

La respuesta funcional a los abridores de mitoK_{ATP} diazóxido y BMS191095 se evaluó en arterias peneanas de ratas Wistar y ratas obesas con dieta alta en grasa (HFD). El mecanismo de acción de BMS191095 se evaluó mediante el uso de inhibidores de las diferentes vías involucradas en las relajaciones arteriales. Las arterias se montaron en miógrafos microvasculares. La función endotelial también se evaluó en ratas tratadas con HFD y tunicamicina (modelo de estrés del retículo endoplásmico). Se evaluaron los parámetros bioenergéticos mediante medidas en Seahorse en arterias peneanas. La producción de superóxido (O₂^{•-}) y H₂O₂ se midió por fluorescencia en muestras de arterias peneanas y cuerpo cavernoso. La expresión de diferentes proteínas del estrés del RE se midió por Western blot en muestras de cuerpo cavernoso.

RESULTADOS

La activación de los canales mitoK_{ATP} por los abridores BMS191095 y diazóxido indujo una potente relajación en arterias peneanas aisladas. La relajación inducida por BMS191095 depende de la respuesta endotelial que involucra la vía NO/PI3K/Akt. La activación del canal BK_{Ca} también está involucrada en las relajaciones inducidas por BMS191095. El bloqueador selectivo de los canales mitoK_{ATP} 5-HD inhibió las relajaciones de BMS191095, así como el bloqueador de los canales K_{ATP} glibenclamida. El NO endotelial puede activar los canales mitoK_{ATP} del músculo liso vascular y su respuesta vasodilatadora es inhibida por 5-HD y glibenclamida. Al usar BMS191095, los parámetros bioenergéticos disminuyeron significativamente al igual que al usar NO exógeno. Sin embargo, la inhibición de la NOS no cambió significativamente los parámetros bioenergéticos, aunque el tratamiento combinado de L-NOARG y BMS191095 reveló una inhibición independiente de NO de la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva por BMS191095. La producción de ROS disminuyó usando BMS191095 de manera independiente de NO en las arterias peneanas.

La obesidad afectó las relajaciones inducidas por acetilcolina (ACh) en las arterias peneanas. El *scavenger* de ROS mitoTempo inhibió las relajaciones de ACh en arterias peneanas control y obesas. Los niveles de ROS fueron más altos en las arterias peneanas de ratas obesas. La expresión de Nox4 aumentó en el cuerpo cavernoso (CC) y en el endotelio de las arterias peneanas de ratas obesas. Los marcadores de estrés del RE ATF6 α y p ℓ F2 α incrementaron significativamente en el CC de ratas obesas. La respuesta vasodilatadora de BMS191095 se vio alterada en las arterias peneanas obesas.

El estrés del RE afectó las relajaciones de ACh e isoprenalina en las arterias peneanas. El tratamiento con mitoTempo inhibió las relajaciones de isoprenalina en arterias peneanas control. El inhibidor de Nox apocinina, así como mitoTempo, mejoraron las relajaciones de ACh en las arterias peneanas del modelo de estrés del RE. Los marcadores de estrés del RE pPERK, ATF6 α , pIRE1 α incrementaron significativamente en ratas del modelo de estrés del RE. La vasoconstricción por Phe se vio afectada en las arterias peneanas del modelo de estrés del RE. Los niveles de Nox4 fueron más altos mientras que la expresión de MnSOD fue menor en las muestras de CC del modelo de estrés del RE. Los parámetros bioenergéticos aumentaron en las arterias peneanas del modelo de estrés del RE.

CONCLUSIONES

- 1- La apertura de los canales mitoK_{ATP} regula el tono arterial peneano en condiciones fisiológicas mediante la participación del endotelio vascular y la liberación de NO a través de la vía PI3K/Akt, que a su vez relaja el músculo liso vascular mediante la activación de los canales mitoK_{ATP} y los canales BK_{Ca}.
- 2- La activación de los canales mitoK_{ATP} conduce a una disminución en la respiración mitocondrial basal, el consumo de oxígeno para la síntesis de ATP y la actividad glucolítica, efectos mediados en parte por la liberación de NO. En ausencia de NO endógeno, la apertura de los canales mitoK_{ATP} conduce a una disminución en la capacidad respiratoria de reserva, así como en la respiración máxima.
- 3- El NO exógeno tiene un efecto dual en las arterias peneanas, por un lado, al inhibir la respiración mitocondrial basal y el consumo de oxígeno para la síntesis de ATP, y, por otro lado, al aumentar la respiración máxima, así como la capacidad respiratoria de reserva.

- 4- La apertura de los canales mitoK_{ATP} reduce la producción de ROS, independientemente de la producción de NO.
- 5- La obesidad inducida por la dieta causa disfunción endotelial en las arterias peneanas, así como la inhibición de la regulación del tono arterial mediada por los canales mitoK_{ATP}.
- 6- Los niveles de ROS mitocondriales y la liberación vasodilatadora de H₂O₂ aumentan en las arterias peneanas de animales obesos, un aumento asociado con la regulación al alza endotelial de la enzima mitocondrial Nox4, constituyendo un mecanismo compensatorio para la disfunción endotelial debido a la disminución de la biodisponibilidad de NO.
- 7- Los parámetros bioenergéticos, la respiración basal, el consumo de ATP, la fuga de protones y la respiración no mitocondrial, disminuyen en las arterias peneanas de ratas obesas, como se describe para el músculo esquelético y cardíaco en el curso de alteraciones metabólicas con exceso de sustratos de energía y asociado con un aumento de H₂O₂.
- 8- La respuesta al estrés del RE se activa en el tejido eréctil de ratas obesas, como lo indica el aumento de la expresión de los marcadores p α F2, AT6 α .
- 9- En condiciones de estrés del RE inducido químicamente, la disfunción vascular peneana se manifiesta con una reducción en la vasoconstricción arterial y disfunción endotelial.
- 10- La disfunción endotelial inducida por el estrés del RE se debe a una disminución en la vasodilatación mediada por NO asociada con ROS derivados de Nox, y una reducción en el H₂O₂ vasodilatador.
- 11- El estrés del RE aumenta los parámetros bioenergéticos, el consumo de oxígeno y la actividad glucolítica, lo que probablemente representa una respuesta adaptativa que favorecería un mayor consumo de O₂ al reducir la acumulación de ROS y promover la supervivencia celular.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

4-CPI	4-carboxifenil isotiocianato
5-HD	Ácido 5-Hidroxicanoico
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada
Akt	Proteína serina-treonina cinasa
Ang II	Angiotensina-II
AP1	Activador de la proteína 1
Apo E	Apoproteína E
APR	Respuesta de fase aguda
ASK-1	Cinasa-1 señalizadora de apoptosis
AT1	Receptor de angiotensina 1
AT2	Receptor de angiotensina 2
ATF6	Factor de transcripción activador 6
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína célula B CLL/ linfoma 2
BiP	Proteína de unión a la inmunoglobulina
BK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio
CC	Cuerpo cavernoso
CCR	Curva concentración-respuesta
CHOP	Proteína homóloga a C/EBP
CoQ	Coenzima Q
COX	Ciclooxigenasa
CuZnSOD	Cobre zinc superóxido dismutasa
CVD	Enfermedad coronaria vascular
CVS	Vasoespasma arterial coronario
CXCL3	Quimiocina CXC motivo ligando 3

DE	Disfunción eréctil
DM	Diabetes Mellitus
DTT	Ditiotreitol
Dzx	Diazóxido
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EFS	Estimulación eléctrica transmural
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eIF2 α	Factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α
EP	Receptores de prostanoïdes tipo E
ERAD	Maquinaria de degradación asociada al RE
ERO1	Oxidorreductasa 1 del retículo endoplásmico
ETA	Receptor de endotelina A
ETB	Receptor de endotelina B
ETC	Cadena de transporte de electrones
FADH2	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
FP	Receptor de prostaglandina F
GADD34	Dominio de muerte por arresto del crecimiento
GRP 94	Proteína regulada por glucosa 94
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Dieta alta en grasa

Ibtx	Iberotoxina
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
ICP	Presión intracavernosa
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
IP	Receptores de prostanooides tipo I
IP ₃	Inositol trifosfato
IP ₃ R	Receptor de inositol trifosfato
IR	Resistencia a la insulina
IRE1 α	Proteína 1 α dependiente de inositol
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina-1
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
Kir1.1, ROMK	Canal de potasio medular
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAMs	Membranas asociadas a las mitocondrias
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos -1
MetS	Síndrome metabólico
MitoK _{ATP}	Canales de potasio sensibles a ATP mitocondriales
MitoKIR	Subunidad KIR de los canales mitoK _{ATP}
MitoSUR	Subunidad SUR de los canales mitoK _{ATP}
MLC	Cadena ligera de miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina

MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLV	Músculo liso vascular
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
mPTP	Poros de transición de membrana
mtDNA	ADN mitocondrial
Mtf	Mitofusina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFκB	Factor de transcripción nuclear- κB
NFR2	Factor nuclear eritroide similar al factor 2
NOX	NADPH oxidasa
NPY	Péptido natriurético Y
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
OCR	Ratio del consumo de oxígeno
ONOO-	Radical peroxinitrito
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
OZR	Rata obesa Zucker
PCR	Proteína C reactiva
PDE5	Fosfodiesterasa 5
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PERK	Proteína cinasa del RNA unida a una cinasa del RE
PGC-1α	Coactivador del receptor gamma 1α
PGE1	Prostaglandina E1
PGE2	Prostaglandina E2

PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGI2	Prostaglandina I2
PI3K	Fosfoinositol-3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKB	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
PlasmK _{ATP}	Canales K _{ATP} del plasmalema
PMA	Acetato de forbol 12-miristato 13
PO ₂	Presión parcial de oxígeno
PSS	Solución fisiológica salina
RE	Retículo endoplásmico
RIDD	Secuencias RNA reguladas por IRE 1 α
ROC	Canales de calcio operados por receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
sarcK _{ATP}	Canales K _{ATP} del sarcolema
SDH	Succinato deshidrogenasa
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
SNAP	S-Nitroso-N-acetilpenicilamina
SOC	Canales de calcio operados por depósitos
STZ	Estreptozotocina
T	Testosterona
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TGRL	Lipoproteínas ricas en triglicéridos posprandiales
TLR	Receptor de tipo Toll

TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TP	Receptor de tromboxano
TRAF-2	Factor asociado al receptor de TNF- α
TRB3	Proteína 3 similar a <i>tribbles</i>
TUDCA	Ácido tauroursodeoxicólico
TXA2	Tromboxano A2
UCP	Proteínas desacoplantes
UPR	Respuesta a las proteínas mal plegadas
UQCRCFS1	Proteína Fe-S de Rieske
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
VEGFR-2	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-2
VIP	Polipéptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales de calcio operados por voltaje
XBP1	Proteína de unión a la caja X
XO	Xantina oxidasa

I. REVISION BIBLIOGRÁFICA

1.1. DISFUNCIÓN ERÉCTIL Y SÍNDROME METABÓLICO

1.1.1. Fisiología de la erección

La erección es el resultado de una serie de mecanismos fisiológicos que tienen por objetivo incrementar el flujo sanguíneo arterial a los cuerpos cavernosos, permitiendo la distensión de estos e impidiendo el retorno venoso. Dichos mecanismos fisiológicos incluyen respuestas neuronales y vasculares, así como la acción de neurotransmisores y mediadores paracrinos (Andersson, 2001; Andersson & Wagner, 1995; Prieto, 2008a; Simonsen et al., 2002)

El pene es el órgano terminal del aparato urinario y del sistema de vías espermáticas del aparato genital masculino. Se encuentra por encima de las bolsas escrotales, por debajo de la sínfisis pubiana y unido a la región anterior del periné. (Vozmediano Chicharro & Bonilla Parrilla, 2010).

Está compuesto principalmente de tres estructuras cilíndricas que componen el tejido eréctil: dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso que se sitúa en el surco ventral, entre los dos cuerpos cavernosos, el cual incluye a la uretra y concluye formando el glande en su extremo distal (Vozmediano Chicharro & Bonilla Parrilla, 2010).

Los cuerpos cavernosos se encuentran envueltos por una densa capa fibroblástica conocida como túnica albugínea (de 2-3 mm en estado flácido). Ambos cuerpos cavernosos constituyen un único espacio a través de un tabique incompleto que los une conocido como *septum* o septo intercavernoso, el cual se encuentra más completo hacia la base del pene, donde los cuerpos cavernosos se separan y constituyen los pilares fijándose a la rama inferior del pubis y el isquion. La función de la túnica albugínea es dar el soporte y la composición fibroblástica adecuada para mantener la rigidez durante el acto sexual (Keegan & Penson, 2013). La túnica albugínea está compuesta principalmente por colágeno de tipo I junto a una menor cantidad de colágeno tipo III y elastina. Está dispuesta en una doble capa que consiste en capas circulares internas en contacto con el cuerpo cavernoso y capas longitudinales externas. Las capas longitudinales se encuentran presentes desde el glande hasta la crura proximal, donde cada cuerpo cavernoso se inserta en su rama isquial asentando la base para el apoyo del pene en estado erecto. A partir de aquí, los cuerpos cavernosos se fusionan por debajo de la rama púbica y comparten un mismo tabique hacia el glande donde se encuentra el final de su parte distal. (Keegan & Penson, 2013).

Dentro de los cuerpos cavernosos, encontramos una red de espacios interconectados tapizados por endotelio vascular y separados por una malla trabecular de músculo liso, colágeno y elastina. Estos espacios interconectados reciben el nombre de sinusoides cavernosos. El músculo liso sinusoidal se encuentra inervado por los nervios cavernosos e irrigado por las arterias helicinales. El flujo sanguíneo arterial transcurre a través de los sinusoides centrales de gran tamaño hacia los sinusoides periféricos de menor tamaño. Durante el estado de detumescencia o flacidez los sinusoides cavernosos se encuentran contraídos. Cuando tiene lugar la estimulación sexual, la liberación de neurotransmisores provoca que el músculo liso que rodea los sinusoides se relaje permite un rápido aumento del flujo arterial y el consecuente atrapamiento de la sangre dentro de estos sinusoides que se ensanchan presionando las venas que recorren la túnica albugínea e impidiendo el retorno venoso (Vozmediano Chicharro & Bonilla Parrilla, 2010).

La inervación vasomotora y las señales endoteliales sólo alcanzan directamente a una fracción de las células musculares lisas. Sin embargo, estas están unidas entre ellas mediante canales intercelulares (*gap junctions*) que permiten la transmisión de corrientes iónicas (K^+ , Ca^{2+}) y mensajeros intracelulares (AMPc, GMPc, IP_3) entre células contiguas. Esto permite que el músculo liso eréctil funcione como un sincitio (Figueroa & Duling, 2009; Guiliano et al., 1997)

Irrigación vascular

Sistema arterial

La principal fuente de flujo sanguíneo en el pene es la arteria pudenda interna, aunque existen otros casos en los que la irrigación arterial proviene además de ésta, de arterias accesorias originadas en la arteria iliaca externa, la arteria obturatriz o las arterias vesicales. La arteria pudenda interna se ramifica en la arteria hipogástrica o arteria ilíaca interna que a su vez se divide en dos arterias bulbouretrales, dos arterias dorsales y las arterias cavernosas. Las arterias bulbouretrales discurren longitudinalmente a través del cuerpo esponjoso y abastecen la uretra y el glande, mientras que las arterias cavernosas atraviesan la túnica albugínea y penetran en el cuerpo cavernoso para dar lugar a múltiples ramificaciones conocidas como arterias helicinales que se abren directamente en los espacios cavernosos nutriéndolos de flujo sanguíneo, de tal forma que, cuando se produce la erección se produce un mecanismo de vasodilatación por el cual aumenta el flujo sanguíneo a través de estas arterias e incrementan el tamaño de los cuerpos cavernosos. Las arterias dorsales transcurren cerca de la superficie dorsal del pene por la túnica albugínea y abastecen las estructuras

superficiales en el pene, así como el cuerpo cavernoso, este último a través de las arterias circunflejas (Comerma-Steffensen et al., 2022; Contreras Jiménez, 2011; Keegan & Penson, 2013; Prieto, 2008a).

Sistema venoso

Existen tres grupos de venas, a través de los cuales, tiene lugar el retorno venoso: venas superficiales, intermedias y profundas. El sistema superficial drena principalmente la piel del pene, aunque también lo hace con el sistema subcutáneo que queda justo por encima de la fascia de Buck, así como el prepucio y el glande. Este proceso es llevado a cabo por la vena superficial dorsal que desemboca en la vena pudenda externa y esta a su vez en la vena safena. También puede tener conexiones con las venas profundas mediante anastomosis. El sistema intermedio se encuentra por debajo de la fascia de Buck pero justo por encima de la túnica albugínea. Su función es la de recoger la sangre del glande, cuerpo esponjoso y los dos tercios distales de los cuerpos cavernosos. Las venas que parten desde el glande forman el plexo retro coronal que desemboca en la vena dorsal profunda (Vozmediano Chicharro & Bonilla Parrilla, 2010). Dentro de las venas del sistema profundo encontramos las venas de los pilares y los cuerpos cavernosos, cuyo origen parte de los espacios sinusoidales debajo de la albugínea, donde se unen para formar venas más grandes conocidas como venas emisarias, las cuales atraviesan la túnica albugínea. Las venas emisarias de la parte media y distal del pene se unen atravesando la túnica albugínea y participando en el drenaje del cuerpo esponjoso y forman las venas circunflejas las cuales desembocan en la vena dorsal profunda que circula entre los cuerpos cavernosos hasta el plexo de Santorini. Las venas emisarias de la parte proximal del pene forman la vena cavernosa que transcurre hasta su desembocadura en la vena pudenda interna y el plexo de Santorini. Forman parte del sistema venoso profundo también la vena uretral y bulbar que drenan el cuerpo cavernoso (Vozmediano Chicharro & Bonilla Parrilla, 2010)

Fases de la erección peneana

Tanto el proceso de erección como el proceso de detumescencia han sido resumidos y divididos en varias fases según diferentes investigadores (Aboseif & Lue, 1988; Andersson & Wagner, 1995; MacDonald & Burnett, 2021).

Fase 0. Corresponde al estado flácido, en el cual predomina la influencia del sistema simpático. De tal forma que las arteriolas terminales y el músculo liso cavernoso se encuentran contraídos. El flujo sanguíneo que pasa a través de las arterias cavernosas

es mínimo y solamente con fines nutricionales. Por lo que el flujo que sale de las vénulas subalbugíneas hacia las venas emisarias es mayor.

Fase 1. Es la fase latente de llenado. Tiene lugar tras la estimulación sexual, en la cual domina la actividad de los nervios parasimpáticos y, por tanto, se produce un incremento del flujo sanguíneo a través de la arteria pudenda interna y de las arterias cavernosas sin cambios en la presión sistémica. Sin embargo, hay una disminución de la resistencia periférica debido a la dilatación de las arterias cavernosas y helicinas. El pene se alarga, pero la presión intracavernosa permanece sin cambios.

Fase 2. Fase de tumescencia. En esta fase, la presión intracavernosa aumenta rápidamente debido a la relajación del músculo liso trabecular, facilitando el llenado de los sinusoides cavernosos, que provoca el engrosamiento del pene y por tanto la erección. Al final de esta fase, el flujo arterial disminuye.

Fase 3: Fase en la que se produce de forma completa la erección. La relajación del músculo liso trabecular hace que este se expanda, y, junto con el incremento de flujo sanguíneo, se produce la compresión del plexo de venas subalbugíneas contra la túnica albugínea, reduciendo el retorno venoso. Este proceso recibe el nombre de mecanismo veno-oclusivo. En consecuencia, la presión intracavernosa aumenta. El flujo arterial en la arteria pudenda interna se encuentra reducido en comparación con la fase de llenado pero sigue siendo mayor que el del estado flácido.

Fase 4. Corresponde a la fase de erección rígida o esquelética. En esta fase la presión intracavernosa aumenta por encima de la presión sistólica como consecuencia de una contracción voluntaria o refleja de los músculos isquiocavernosos y bulbocavernosos. En este momento no hay flujo sanguíneo atravesando las arterias cavernosas.

Fase 5. Fase de transición. Se produce entonces un incremento de la actividad simpática que conduce a un aumento del tono muscular en las arterias helicinas y una contracción del músculo liso trabecular. El flujo arterial se reanuda, en niveles bajos, pero el sistema de veno-oclusión continúa activado.

Fase 6. Es el inicio de la fase de detumescencia. Hay una bajada moderada de la presión intracavernosa, que indica una reapertura del retorno venoso y un descenso del flujo arterial.

Fase 7. Fase de detumescencia, en esta fase domina la actividad del sistema simpático. En ella la presión intracavernosa desciende rápidamente, el mecanismo veno-oclusivo

queda inactivado, el flujo arterial baja hasta los niveles previos a la estimulación sexual, y el pene regresa al estado flácido (Aboseif & Lue, 1988; Andersson & Wagner, 1995; MacDonald & Burnett, 2021).

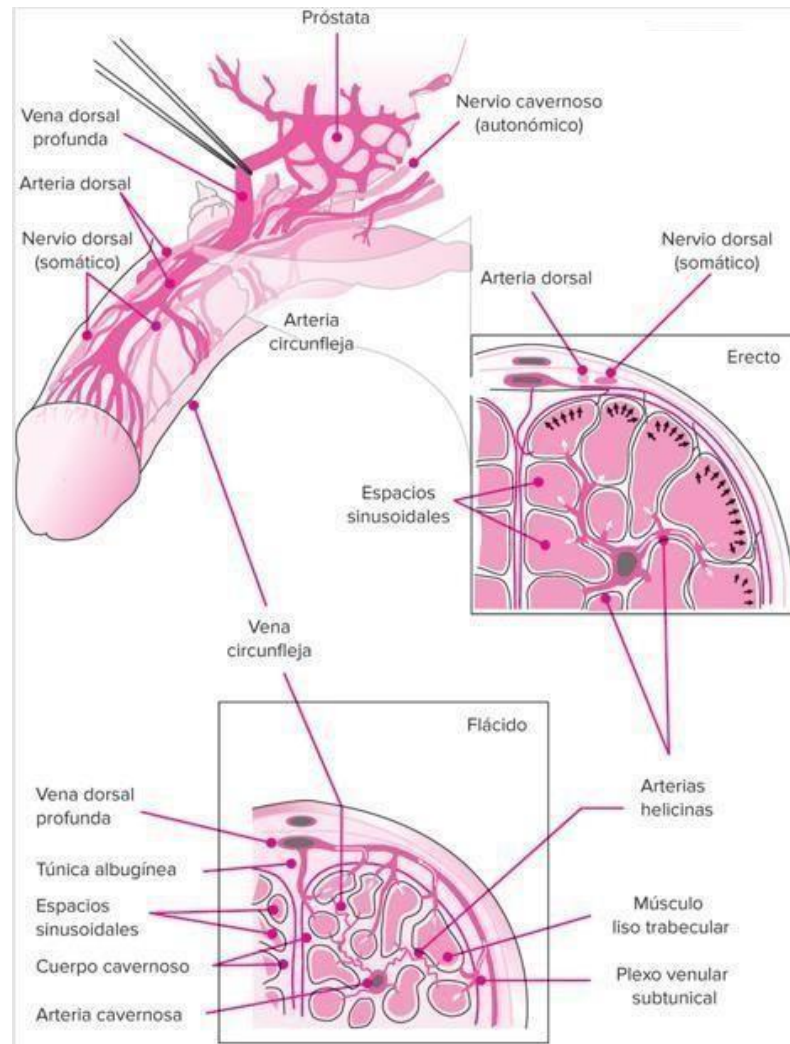


Figura 1. La erección es un mecanismo que depende de la vasodilatación de las arterias que irrigan los cuerpos cavernosos, mediada por los nervios parasimpáticos y que viene o retorna a un estado de flacidez en el que predomina una vasoconstricción de las arterias regulada por el sistema nervioso simpático (Tomado de Juan Ramón de la Fuente, Gerhard Heinze: *Salud mental y medicina psicológica*, 3e. Derechos © McGraw-Hill Education)

1.1.1.1. Neurofisiología de la erección

Sistema parasimpático

Los impulsos nerviosos que generan el comienzo de la erección son originados en los centros parasimpáticos de la erección, localizados en el sistema límbico y en el hipotálamo, en concreto en el núcleo paraventricular y en el área preóptica medial. La percepción de estímulos visuales, auditivos, imaginativos, táctiles o cualquier otro estímulo de carácter sexual se traduce en la activación de diferentes receptores que a su vez estimulan a través de vías dopaminérgicas y oxitocinérgicas el centro reflexógeno parasimpático espinal de la erección situado entre las vértebras S2-S4. Las fibras parasimpáticas de dicho centro transcurren junto a las fibras simpáticas, originadas en la parte superior e inferior del plexo hipogástrico en lo que se conoce como el plexo pélvico o plexo hipogástrico inferior. De este último parte las fibras nerviosas autónomas que reciben el nombre de nervios cavernosos. En los nervios cavernosos, encontramos tanto fibras simpáticas como parasimpáticas, que transcurren entre la cápsula prostática y la fascia endopélvica y terminan penetrando en el suelo pélvico o diafragma urogenital alcanzando los cuerpos cavernosos (Krassioukov & Elliott, 2017; Purves et al., 2001; Porst & Sharlip, 2006; Everaert et al., 2010).

Una vez dentro de los cuerpos cavernosos (CC) las fibras parasimpáticas se dividen en dos tipos diferentes de terminaciones nerviosas: terminaciones colinérgicas que liberan ACh que a nivel de las células endoteliales estimula la producción de óxido nítrico (NO) a través de la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual cataliza la formación de NO a partir de L-arginina y O₂, o terminaciones no adrenérgicas y no colinérgicas (NANC) en las células musculares lisas del cuerpo cavernoso, de las cuales se libera NO y VIP (Everaert et al., 2010; Stewart, 2004).

Inervación nitrérgica

Las señales reflexogénicas nerviosas inician el proceso de erección a través de la activación de la enzima NOS neural (nNOS). Esta enzima se activa gracias a la despolarización neuronal que origina una entrada de Ca²⁺ en la célula que se une a la calmodulina (CaM). La unión Ca²⁺/CaM es capaz de activar la nNOS desencadenando la producción y liberación del NO a nivel de las terminaciones nerviosas que induce la vasodilatación y el incremento del flujo sanguíneo provocando la expansión de los vasos sanguíneos penianos y el llenado de los sinusoides cavernosos (Ayajiki et al., 2002; Toda et al., 2005).

En 1991, Saenz de Tejada y colaboradores (Kim et al., 1991) demuestran tras los experimentos en cuerpo cavernoso humano y de conejo, que las relajaciones dosis-dependiente de ACh eran inhibidas en presencia de L-NMMA, oxihemoglobina (que actúa como un *scavenger* de NO) y azul de metileno (bloqueante de la guanilato ciclasa). Además, las relajaciones de ACh también se veían inhibidas tras la retirada mecánica del endotelio. Entonces se sabía que la relajación del músculo liso del CC provenía de un factor relajante del endotelio que se producía tras la neurotransmisión NANC. En dicho trabajo se medía el efecto del NO exógeno tras la contracción del músculo liso del CC con agonistas adrenérgicos, comprobando que las tiras de CC se relajaban, y este mismo efecto era inhibido por la oxihemoglobina. Por lo que concluían diciendo que las respuestas relajantes del endotelio parecían depender de una sustancia difusible similar al NO (Kim et al., 1991). Para confirmar finalmente en 1992, que efectivamente este factor relajante era el NO (Azadzoi & Saenz de Tejada, 1992).

Respecto a las arterias peneanas pequeñas, las cuales controlan el flujo sanguíneo entre la circulación sistémica y el cuerpo cavernoso, la información relativa al efecto de NO en ellas era escasa. En 1997, Simonsen y colaboradores, investigan el papel del NO en arterias peneanas, con experimentos de relajación arterial con curvas dosis respuesta de ACh en presencia de L-NOARG para demostrar el papel relajante del NO (Simonsen et al., 1997a). Además de realizar experimentos de estimulación eléctrica transmural que producen la relajación en arterias peneanas la cual se vio inhibida en presencia de L-NOARG (Simonsen et al., 1997a). Ya entonces, existían ciertos trabajos que confirmaban la presencia de inervación nitrérgica no sólo en CC sino también en arterias peneanas pequeñas o helicinas (Burnett et al., 1993, 1992; Vizzard et al., 1994). En el trabajo de Simonsen y colaboradores se demostraba que el NO derivado de los nervios era el encargado de contribuir a la dilatación arterial inicial observada en la erección peneana, ya que al retirar el endotelio y efectuar la EFS la relajación no se veía afectada (Simonsen et al., 1997a).

Se ha demostrado que tanto la estimulación del nervio cavernoso como la relajación inducida por la inyección intracavernosa de papaverina están mediadas por la enzima PI3K y la activación de la proteína Akt que participan en la fosforilación directa de la enzima eNOS incrementando la producción endotelial de NO. Por tanto, la enzima nNOS participa sobre todo en el inicio y la enzima eNOS en el mantenimiento de la erección (Hurt et al., 2002).

Las señales neurales inician la erección peneana a través de la activación de la nNOS tras la entrada de calcio desencadenada por la despolarización de la célula

neuronal y la posterior estimulación de la nNOS por la unión Ca^{2+} /calmodulina (Bredt & Snyder, 1990). La activación Ca^{2+} /calmodulina de la nNOS es reversible y muy corta, pero suficiente para que el NO que se genera tras la activación de la nNOS incremente el flujo sanguíneo y la expansión física de la vasculatura peneana y los espacios de los sinusoides (Hurt et al., 2002). Tanto nNOS como eNOS son activadas por la entrada de calcio en la célula. Sin embargo, las fuerzas de cizallamiento o *shear stress* producido tras la vasodilatación originada por el NO liberado desde los nervios, promueve la activación de la vía PI3K/Akt que activa directamente a la eNOS, reduciendo la cantidad de Ca^{2+} necesaria para esta enzima y causando un incremento en la producción de NO (Hurt et al., 2002).

Dentro de las células musculares lisas, el NO activa la enzima guanilato ciclasa que cataliza la transformación del guanilato trifosfato (GTP) en 3'5' guanilato monofosfato cíclico (GMPc), este último activa la proteína cinasa G, la cual inicia la fosforilación de proteínas de membrana asociadas a los canales de potasio BK_{Ca} . Este proceso conduce a la salida de iones de K^+ hacia el espacio extracelular que se traduce en una hiperpolarización. La hiperpolarización da lugar al cierre de los canales de calcio tipo L resultando en una disminución de la concentración intracelular de los iones de Ca^{2+} (Prieto et al., 1998). En condiciones fisiológicas, el Ca^{2+} junto con la calmodulina activan la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLC), una enzima que cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina y produce la interacción entre las proteínas actina y miosina, que resulta en la contracción de la musculatura cavernosa lisa, y por tanto evitando que la erección tenga lugar. La MLC fosforilada, es por tanto defosforilada por la forma activa (defosforilada) de la MLC fosfatasa, dando lugar a la relajación del cuerpo cavernoso y con ello a la erección (Prieto et al., 2006b).

La enzima fosfodiesterasa 5 se encarga de degradar el GMPc y actúa como reguladora del tono muscular liso (Andersson, 2001; Goldstein et al., 1998; Simonsen et al., 2002). La inhibición selectiva de esta enzima es el mecanismo de acción del fármaco sildenafil, que actúa compensando la disminución en la síntesis de NO y por tanto la producción de GMPc. En experimentos realizados sobre muestras de cuerpo cavernoso aisladas de humanos y conejos (Ballard et al., 1998; Chuang et al., 1998), el sildenafil presenta una respuesta limitada en cuanto a las relajaciones del músculo liso cavernoso *in vitro* en ausencia de liberación de NO, pero esta se incrementa al añadir NO de forma exógena. Lo que sugiere que la acción del sildenafil depende de una activación preexistente del sistema NO-GMPc lo que explica que sea necesario un estímulo sexual previo para que la respuesta del GMPc sea efectiva (Ballard et al., 1998; Carter et al.,

1998; Goldstein et al., 1998; Prieto et al., 2006b). Por otra parte, el vardenafilo agente inhibidor de la PDE5, parece no depender tanto de la vía NO/GMPc e igual su mecanismo podría depender más del flujo interno de calcio extracelular hacia el citosol (Sánchez et al., 2008).

Aun así, se postula que el NO es capaz de activar los canales de BK_{Ca} por una vía independiente de GMPc y PKG (Bolotina et al., 1994). En el estudio realizado por Prieto y colaboradores (2006b) queda reflejado también un papel de la proteína cinasa dependiente del AMPc (PKA) en el mecanismo relajante del sildenafil en arterias peneanas, ya que el uso de este en presencia de inhibidores específicos de la PKA resultó en una inhibición de la respuesta relajante del sildenafil. Y al emplear juntos el inhibidor de la PKA junto con el de la PKG la inhibición de la respuesta del sildenafil fue mayor. Por lo que sugiere una interacción entre la vía de señalización del GMPc y el AMPc (Prieto et al., 2006b; Ruiz Rubio et al., 2004; Stief et al., 2000). Además, en este estudio se realizaron también experimentos con inhibidores de la ciclooxigenasa los cuales producían una marcada inhibición en las relajaciones del sildenafil, lo que indica que el sildenafil podría estar incrementando la liberación basal de prostanoïdes (Prieto et al., 2006b).

En un estudio posterior de Prieto y colaboradores, se demuestra también el papel de los canales BK_{Ca} en las relajaciones producidas por el sildenafil, ya que el bloqueo de estos por agentes como iberotoxina o tetraetilamonio desplazan la curva de relajación del sildenafil hacia la derecha (Prieto et al., 2006a).

Las respuestas relajantes al NO neural se encuentran afectadas en ratas con obesidad genética resistentes a insulina como así demuestra el trabajo de Sánchez y colaboradores (2012a). El desarrollo de una disfunción nitrérgica ha sido demostrado en cuerpo cavernoso de pacientes y en pene de animales, en ambos casos con diabetes tipo 1 (Azadzoï & Saenz de Tejada, 1992; Celtek et al., 2003, 1999; Saenz de Tejada et al., 1989).

En el estudio de Sánchez y colaboradores (2012a) en ratas obesas se observa que las reducciones en las respuestas relajantes al NO neural no eran acompañadas así mismo de reducciones en las respuestas relajantes de donantes de NO como el SNAP, lo que sugiere que la señalización del NO en el músculo liso no se encuentra afectada pero la biodisponibilidad del NO sí. De hecho, varios estudios demuestran la disminución de la expresión y actividad de la nNOS acompañada de una reducción de la función eréctil en animales con diabetes (Celtek et al., 2003, 1999; Podlasek et al., 2001; Vernet

et al., 1995).

Dado que el O₂ molecular es un sustrato de la síntesis tanto del NO neural como endotelial por la NOS, la presión parcial de oxígeno (PO₂) en la sangre que llega al cuerpo cavernoso desempeña un papel importante en la regulación de la hemodinámica peneana. Durante el estado flácido, PO₂, es similar en el flujo sanguíneo arterial y venoso y asciende a 90-100 mmHg durante la erección como resultado del incremento en el flujo arterial a los sinusoides cavernosos (Prieto et al., 2010).

En condiciones de hipoxia aguda, se produce una relajación arterial que está mediada parcialmente por el NO endotelial. En estudios realizados por Prieto y colaboradores (2010) se muestra cómo, tras la retirada mecánica del endotelio, las relajaciones ocasionadas por la hipoxia son reducidas.

Sistema simpático

Los impulsos nerviosos que controlan el estado de flacidez se originan en los centros cerebrales y transcurren a lo largo del cordón espinal hacia el área localizada entre el Th_{11/12}-L_{2/3} en lo que puede ser un centro de erección psicogénica. Las fibras eferentes salen de este centro a través de la raíz anterior de la médula espinal y conectan con el tronco del ganglio simpático, constituyendo la parte superior del plexo hipogástrico que continúa descendiendo, denominándose el plexo hipogástrico inferior tras juntarse con las fibras parasimpáticas, anteriormente mencionadas, para acabar formando parte de los nervios cavernosos, que entran en los cuerpos tras atravesar el suelo pélvico. Una vez dentro los nervios simpáticos inervan tanto el músculo cavernosoliso como las arterias y venas de este. En las células musculares lisas el terminal sináptico de las fibras nerviosas simpáticas se encuentra en un área de gran densidad de receptores α_1 frente a β_2 adrenérgicos (Dhabuwala et al., 1985; Levin & Wein, 1980). Los bloqueantes de estos receptores han demostrado aumentar la tumescencia peneana y provocar una erección prolongada (Saenz de Tejada et al., 1991b). Mientras que los receptores α_2 tienen un papel menor en la contracción, incluso bloqueantes selectivos α_2 , potencian la contracción mediada por fibras adrenérgicas (Traish et al., 1995). Existen tres subtipos de receptores α_1 : receptores α_{1A} , α_{1B} y α_{1C} (Schwinn & Lomasney, 1992; Traish et al., 1995). Entre los receptores α_1 , encontramos mayor prevalencia de los receptores α_{1A} - α_{1C} en la musculatura lisa cavernosa (Porst & Sharlip, 2006).

Los receptores α_1 son estimulados de forma directa por la noradrenalina de los nervios simpáticos, esto lleva a la estimulación de la fosfolipasa C, la cual convierte el fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) en inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Este último activa la proteína cinasa C, que lleva a cabo la fosforilación de proteínas de membrana y la activación de los canales dependientes de voltaje de tipo L de Ca^{2+} . Mientras tanto, el IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma celular. La activación de canales dependientes de voltaje de tipo L de Ca^{2+} (VOC), y la liberación de Ca^{2+} por parte del retículo sarcoplásmico hacen que la concentración intracelular de Ca^{2+} incremente. La entrada de Ca^{2+} también puede ser mediada a través de la activación directa de canales de tipo L de Ca^{2+} (VOC), y canales de calcio no-tipo-L como son aquellos canales de Ca^{2+} independientes de voltaje y que se abren en respuesta a la depleción de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SOC) o aquellos canales que se encuentran ligados a proteínas G y que son activados por agonistas (ROC) (Villalba et al., 2007). El Ca^{2+} junto con la calmodulina activan la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MCLK), una enzima que cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina y produce la interacción entre las proteínas actina y miosina, que resulta en la contracción de la musculatura cavernosa lisa. La fosforilación que resulta en la inactivación de la MLC fosfatasa es llevada a cabo por la enzima Rho-cinasa A (RhoA), la cual tiene actividad GTPasa y es inactivada cuando se une al GDP pero se activa cuando se une al GTP. La RhoA activada estimula a la serina/treonina cinasa conocida como Rho cinasa. Esta Rho cinasa fosforila la MLC fosfatasa en el punto de unión a la miosina, activando de esta forma la enzima que conduce a la contracción del músculo liso y el estado de flacidez del pene (Porst & Sharlip, 2006; Villalba et al., 2008).

La activación del receptor α_1 con fenilefrina (Phe) incrementa la sensibilidad de los miofilamentos al calcio, además esta sensibilidad se ve afectada tras el uso de inhibidores de la proteína cinasa C (PKC), tirosina cinasa y Rho cinasa como se demuestra en el trabajo de Villalba y colaboradores (Villalba et al., 2007). El inhibidor de la Rho cinasa Y-27632 reduce significativamente las contracciones mediadas por noradrenalina (NA), así como la contracción por Phe y las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares. Sin embargo, el inhibidor de la PKC Ro-31-8220 reduce la tensión vascular sin alterar el incremento de calcio producido por la Phe. Además, en presencia de nifedipino, antagonista de los canales de calcio dependientes de voltaje (VOC), Y-27632 todavía inhibe la entrada de calcio a través de canales no tipo L (ROC), sin embargo, no altera la entrada de calcio a través de canales que se activan tras la depleción de Ca^{2+} por parte del RE (SOC). Todo ello queda demostrado en el trabajo de

Villalba y colaboradores de 2008 en arterias peneanas de rata (Villalba et al., 2008). Por tanto, la enzima Rho cinasa aparte de estar involucrada en los procesos de sensibilización del calcio también participa en la regulación de la entrada de calcio a través de canales catiónicos no selectivos por activación de los receptores adrenérgicos α_1 en arterias peneanas de rata (Villalba et al., 2008). Igualmente hay trabajos que también lo demuestran en cuerpo cavernoso (Rees et al., 2001). En modelos de disfunción eréctil asociada a diabetes el incremento del tono vascular ha sido asociado con un aumento de la actividad RhoA/Rho cinasa (Villalba et al., 2011; Wingard et al., 2009, 2003).

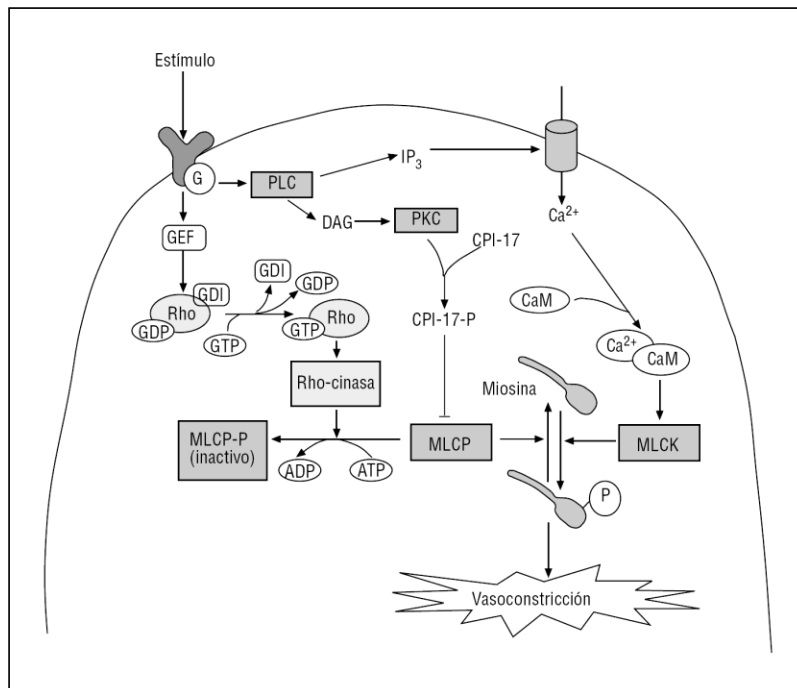


Figura 2. Mecanismo de regulación de la vasoconstricción en células musculares lisas. La activación del receptor α -adrenérgico conlleva la activación de la fosfolipasa C (PLC) la cual convierte el PIP_2 en IP_3 y DAG. Este último activa la PKC, que lleva a cabo la fosforilación de proteínas de membrana, la activación de los canales dependientes de voltaje de tipo L de Ca^{2+} . IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma celular. Por último, la activación del factor intercambiador de guanina (GEF), activa la proteína Rho que a su vez activa a la Rho-cinasa fosforilando la MLCP, y por tanto inactivándola. (Tomado de Jalil et al., 2005).

En arterias helicinas, se observa que la NA añadida de forma exógena induce contracciones las cuales no se ven afectadas tras la retirada mecánica del endotelio, pero sí se ven incrementadas en presencia del inhibidor de la NOS, L-NOARG. Al bloquear la población de receptores α con fentolamina, se observa que existe una población de receptores β que responden a la isoprenalina, adrenalina y salbutamol, produciendo una relajación dosis dependiente, en la cual no se produjo variación

alguna al añadir el antagonista β_1 atenolol. Lo que refleja una acción vasodilatadora de los compuestos anteriormente mencionados a través del receptor β_2 (Simonsen et al., 1997b).

Por otra parte, se comprobó que al bloquear de la misma forma el receptor α con fentolamina, y añadir NA y dobutamina no se obtuvo apenas respuesta alguna. Lo que demuestra que la acción de NA en el músculo liso cavernoso es principalmente a través de receptores α (Simonsen et al., 1997b), y más concretamente receptores α_1 ya que el bloqueo de α_2 con el antagonista rauwolscina no cambió la respuesta a la NA (Andersson & Wagner, 1995; Simonsen et al., 1997b).

Tanto la noradrenalina como la adrenalina pueden estimular los receptores α_1 y β_2 (Andersson & Wagner, 1995). En el caso de la NA la afinidad por α_1 es mayor con respecto a β_2 , y en el caso de la adrenalina la afinidad por β_2 es mayor con respecto a α_1 . Cuando se unen a los receptores β_2 se produce una activación de la enzima adenilato ciclasa que cataliza la ruptura de ATP en 3'5'-AMPc. Este último activa la PKA que conduce a la hiperpolarización y el cierre de los canales de Ca^{2+} tipo L. Debido a que la densidad de receptores β es menor comparada con la de α que es mayoritaria en los cuerpos cavernosos (Andersson & Wagner, 1995), en condiciones fisiológicas la noradrenalina y adrenalina mantienen la contracción de las células musculares lisas y por tanto el estado de flacidez.

En las arterias peneanas en cambio hay una población mayor de receptores α_2 (Andersson & Wagner, 1995; Porst & Sharlip, 2006) y por supuesto también receptores α_1 (Simonsen et al., 1997b). Los receptores α_2 se sitúan a nivel presináptico en los terminales sinápticos de los nervios simpáticos de los receptores α_1 , inhibiendo el tono simpático. La NA además de activar los receptores α_1 puede actuar inhibiendo la respuesta relajante mediada por los receptores α_2 presinápticos (Simonsen et al., 1997c; Villalba et al., 2007). Tanto los receptores α_1 como los α_2 se localizan en las venas peneanas.

En hombres de avanzada edad hay un incremento de la densidad, así como de la sensibilidad de receptores α_1 mientras que se observa una disminución en la población de receptores β_2 . Esto puede suponer una de las razones, por las cuales la disfunción eréctil es un proceso relacionado entre otras causas con la edad (Porst & Sharlip, 2006). Además, la vasoconstricción en respuesta a la NA tanto exógena como liberada por los nervios se encuentra incrementada en modelos de obesidad inducida genéticamente (Villalba et al., 2011).

La contractilidad del músculo liso de las arterias peneanas y del CC es modulada también por varios factores producidos localmente como el tromboxano A_2 y la endotelina-1, o liberados por los terminales como en el caso de la NA, también el neuropéptido Y ejerce una función contráctil (Andersson & Wagner, 1995; Prieto et al., 2004; Simonsen et al., 2002). En un modelo de obesidad genética en rata, la contracción inducida por el agonista del receptor de tromboxano A_2 (TXA₂) U-46619 se ve incrementada en arterias peneanas, y este incremento está asociado a un aumento tanto de la sensibilidad como de las repuestas máximas al calcio ((Villalba et al., 2011). La activación del receptor de TXA₂ está ligada con la estimulación de la proteína G a la PKC (isoformas α y δ) (Villalba et al., 2011).

Inervación somática

En el pene la inervación somática transcurre a través de los nervios pudendos y dorsales. El nervio peneano dorsal inerva el glande y la estructura principal del pene conduciendo los impulsos sensitivos hacia el centro reflexógeno de la erección en la médula espinal localizado a nivel de las vértebras sacras, S2-S4. En dicho centro las señales sensitivas son procesadas hacia los centros cerebrales o hacia las motoneuronas somáticas del nervio pudendo, el cual manda las señales motoras a través de sus ramas eferentes hacia el suelo pélvico. El nervio pudendo inerva los músculos del suelo pélvico produciendo la contracción de los músculos bulbo e isquiocavernosos. Esto conduce a un mayor bloqueo del retorno venoso desde los cuerpos cavernosos e incrementa la presión cavernosa conduciendo a un estado de completa rigidez en el pene (Porst & Sharlip, 2006).

1.1.1.2. Regulación fisiológica de la vasodilatación peneana

Factores vasodilatadores

NO de origen endotelial

El NO derivado del endotelio está implicado en los procesos de señalización intracelular, regulando el tono vascular peneano (Burnett et al., 1992; Dail et al., 1995; Prieto, 2008a; Simonsen et al., 1997a, 2002). Es sintetizado por la eNOS en las células endoteliales en los cuerpos cavernosos, así como en el endotelio de las arterias peneanas. La reacción es producida a partir de L-arginina como sustrato que se oxida a través del consumo de oxígeno y NADPH, para producir citrulina y NO (Moncada & Higgs, 2006). El NO producido por las células endoteliales es un gas que difunde hacia

las células musculares lisas estimulando la producción de GMPc a partir de GMP y a través de la guanilato ciclasa, a la que se une y activa a través de su unión al grupo hemostático de la misma (Russwurm & Koesling, 2004). El GMPc activa a la PKG la cual es capaz de abrir los canales BK_{Ca} favoreciendo la salida de potasio que conduce a una hiperpolarización celular. El GMPc es degradado por la enzima fosfodiesterasa 5, de ahí la importancia del tratamiento con inhibidores de PDE5 como el sildenafil o el vardenafilo (Carter et al., 1998; Prieto et al., 2006b; Sánchez et al., 2008; Stief et al., 2000). El NO de origen endotelial es producido en respuesta a la fuerza de cizallamiento o *shear stress*, o en respuesta a agonistas como la ACh que se libera desde las terminaciones nerviosas colinérgicas.

El *shear stress* es la fuerza de cizallamiento que ejerce el flujo sanguíneo sobre el endotelio arterial peneano y los sinusoides cavernosos. Este mecanismo, activa la vía de la PI3K/Akt que resulta en una fosforilación de la eNOS liberando NO que produce la relajación sostenida del músculo liso (Hurt et al., 2002; Joannides et al., 1995). Es el responsable del mantenimiento de la erección peneana.

La ACh liberada de los nervios se une a los receptores muscarínicos ligados a proteínas G que median la elevación del calcio intracelular, a través de la activación de la fosfolipasa C (Edwards et al., 2020). Esta elevación del calcio intracelular desencadena varias respuestas en la célula endotelial entre ellas la síntesis de NO por parte de la eNOS, a través de la activación de esta última por la unión Ca²⁺/calmodulina, además de la síntesis del factor hiperpolarizante derivado del endotelio y eicosanoides derivados del ácido araquidónico (Tran et al., 2000).

Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

A diferencia del endotelio de los cuerpos cavernosos, en el endotelio de las arterias peneanas de menor tamaño existe una relajación residual que no depende de la acción de la enzima NOS ni de la COX (Prieto et al., 1998; Simonsen et al., 1997a). Dicha relajación está asociada a un mecanismo hiperpolarizante derivado del endotelio, se denomina respuesta EDH (*Hiperpolarización Derivada del Endotelio*) y actúa produciendo una hiperpolarización de las células endoteliales que es transmitida al músculo liso a través de uniones tipo *gap* mioendoteliales (Cohen & Vanhoutte, 1995). La acción de este factor no se ve afectada por el bloqueo de las enzimas NOS y COX, sin embargo, sí que se ve afectada por el incremento de K⁺ extracelular, así como por agentes bloqueantes de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de media y baja conductancia, atribuyéndose a la liberación de EDHF (Factor hiperpolarizante derivado

del endotelio) (Prieto et al., 1998; Angulo et al., 2003). Además, parece involucrar también la activación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ en el músculo liso (Prieto et al., 1998).

Se sabe que el H_2O_2 relaja el músculo liso a través de un mecanismo dependiente de cGMP, activa los canales de potasio y produce hiperpolarización (Bény & von der Weid, 1991; Burke & Wolin, 1987; Burke-Wolin et al., 1991; Cohen & Vanhoutte, 1995; Kuo et al., 1993; Omar & Wolin, 1992). Además, ha demostrado ser un producto de la síntesis de NO cuando la utilización de arginina por parte de la enzima NOS es impedida (Heinzel et al., 1992), y por ello es un candidato a EDHF en estados patológicos (Cosentino & Katusiá, 1995). El H_2O_2 induce relajación de las arterias peneanas, que es parcialmente inhibida por la retirada mecánica del endotelio, el bloqueo de la COX y de la proteína cinasa activada por mitógenos y regulada por señales extracelulares (ERK-MAPK), y aumentada por bloqueo de la p38MAPK (Prieto et al., 2010).

El anión superóxido es generado también por las células endoteliales y puede ser otro producto de la NOS, a pesar de su papel como inactivador del NO, también ha sido implicado en la relajación dependiente del endotelio. Aunque su acción es poco probable que ocurra directamente, el anión superóxido puede reaccionar con el NO para formar peroxinitrito (Wu et al., 1994), el cual puede relajar el músculo liso, y alternativamente el anión superóxido puede dar lugar a la formación de H_2O_2 que sería entonces el agente activo.

Los productos no prostanoideos del metabolismo del ácido araquidónico también son candidatos a EDHF (Weintraub et al., 1994), ya que como productos de la fosfolipasa A2 se espera que sean liberados en respuesta a un incremento en los niveles de calcio endotelial. Además, inhibidores de la fosfolipasa A2 como la mepacrina o inhibidores de la lipooxigenasa como BW755c son reconocidos como inhibidores de las relajaciones dependientes del endotelio (Cohen & Vanhoutte, 1995; Förstermann & Neufang, 1985; Stanton & Coupar, 1986; Uotila et al., 1987).

También los productos del citocromo P450 son producidos por las células endoteliales y pueden activar los canales de potasio, igualmente inhibidores del citocromo P450 han sido reportados como inhibidores de las relajaciones producidas por el endotelio (Guengerich, 1991; Pinto et al., 1987).

Prostanoides

Los prostanoides pueden ser sintetizados tanto en las células musculares lisas como en las endoteliales. En condiciones fisiológicas la mayoría de los prostanoides son sintetizados por la isoforma constitutiva de la enzima COX-1. Sin embargo, también pueden ser sintetizados por la isoforma inducible COX-2 que se expresa a bajos niveles en las células vasculares, pero que pueden incrementarse por estímulos inflamatorios, mitógenos o físicos (Hernanz et al., 2004; Sánchez et al., 2010; Seibert et al., 1994). La COX-1 endotelial contribuye en su mayoría a la producción de PGI₂ y TXA₂. Por otra parte, la COX-2 ha demostrado estar ligada preferentemente a la síntesis celular de PGI₂ y PGE₂ y parece estar activada por estímulos como el *shear stress* (Brock et al., 1999; Sánchez et al., 2010) pero también ha sido propuesta como la isoforma responsable en su mayoría de la síntesis de PGI₂ bajo condiciones fisiológicas (Brock et al., 1999; Henrion et al., 1997; Okahara et al., 1998; Sánchez et al., 2010).

La producción de prostanoides se encuentra regulada por factores como la presión de oxígeno en sangre y puede verse suprimida en condiciones de hipoxia (Daley et al., 1996; Prieto, 2008b). En el músculo liso trabecular encontramos diferentes prostaglandinas: PGE₁ con un potente efecto relajante y PGE₂ que a bajas concentraciones tiene un efecto relajante, pero en altas concentraciones causa contracción de las células musculares lisas. Por otra parte, PGI₂ es sintetizado principalmente en el endotelio (Angulo et al., 2002; Minhas et al., 2000; Moreland et al., 2001; Prieto et al., 1998; Ruiz Rubio et al., 2004).

En arterias peneanas la presencia de receptores tipo IP ha sido confirmada por la respuesta relajante del cicaprost (agonista selectivo de los receptores IP). Se cree, por tanto, que los receptores de prostanoides IP tienen un papel más predominante en la relajación del músculo liso de las arterias peneanas coexistiendo también con receptores EP (EP₂/EP₄), mientras que los receptores EP (EP₂/EP₄) lo tienen en el músculo liso trabecular (Angulo et al., 2002).

A pesar de que el bloqueo de la NOS con L-NOARG reduce significativamente la respuesta del sildenafil, el tratamiento conjunto con L-NOARG más inhibidores de la COX, producen una inhibición adicional de estas relajaciones, lo que sugiere que el sildenafil puede estar también incrementando la liberación basal de prostanoides (Prieto et al., 2006b). Además, ni el bloqueo de la NOS ni la retirada mecánica del endotelio no alteran la respuesta relajante la respuesta relajante de PGE₁ (Ruiz Rubio et al., 2004).

PGE₁ se une a los receptores específicos de prostaglandina E (EP₂/EP₄) y prostaglandina I (IP) que se encuentran acoplados a proteínas G, activando la enzima adenilato ciclasa que genera adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Angulo et al., 2002; Prieto et al., 1998). Este último activa la PKA conduciendo a una disminución de los niveles de Ca²⁺ a través de la activación de los canales BK_{Ca}. (Ruiz Rubio et al., 2004). Por otra parte, la prostaglandina E₁ produce vasodilatación en arterias peneanas (Ruiz Rubio et al., 2004) a través de mecanismos que parecen depende de la síntesis de AMPc y de la PKA (Ruiz Rubio et al., 2004). El tratamiento con rolipram (inhibidor de la fosfodiesterasa PDE4, encargada de degradar el AMPc) incrementó de forma significativa las relajaciones producidas por PGE₁. Sin embargo, el inhibidor de la PKA Rp-CPT-cAMPS disminuyó las relajaciones inducidas por PDE₁, rolipram y el agonista de la adenilato ciclasa forskolina. Demostrando como la vía AMPc/PKA está involucrada en las relajaciones por PGE₁. Además, los agentes que incrementan las concentraciones de AMPc parecen activar de forma cruzada a la PKG ya que así lo demuestran los resultados con inhibidores de GMPc y las reducciones de estos en la respuesta a PGE₁. También se observó como la retirada mecánica del endotelio no alteró las relajaciones mediadas por PGE₁ (Ruiz Rubio et al., 2004)

A parte de su efecto relajante en el músculo liso, PGE₁ y PGE₂ pueden suprimir la síntesis de colágeno inducida por el factor de crecimiento transformante TGF- β₁ en el cuerpo cavernoso, regulando la fibrosis en el cuerpo cavernoso (Moreland et al., 1995).

PGE₁ (alprostadilo) se ha desarrollado en terapia para el tratamiento de la disfunción eréctil vía intrauretral y tópica (Porst & Sharlip, 2006; Prieto, 2008a).

Bradicinina

Es un péptido biológicamente activo que es formado entre otros tejidos en el cuerpo cavernoso, a través del sustrato quinínogeno y la enzima calicreína (Edward et al., 2015). La bradicinina posee actividad eréctil como han demostrado los experimentos *in vivo* sobre rata anestesiada realizados por Edward y colaboradores (2015) mediada por su actividad sobre los receptores quinina B2 y los productos de la COX. Los incrementos en la ICP (presión intracavernosa) no disminuyeron tras el tratamiento con el inhibidor de la NOS L-NOARG, pero sí que se vieron disminuidos por el inhibidor de la guanilato ciclasa meclofenamato sódico (Edward et al., 2015). Las respuestas a bradicinina son moduladas por cambios en la presión generados por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y la angiotensina(1-7) (Greco et al., 2006).

Se ha demostrado que la bradicinina es capaz de inducir una relajación dosis

dependiente en tiras aisladas de CC humano ya que incrementa las concentraciones de AMPc y GMPc (Kimoto et al., 1990).

Testosterona

A nivel cerebral la testosterona estimula la síntesis, almacenaje y liberación de neurotransmisores que favorecen la erección tales como la dopamina, el NO y la oxitocina. A nivel espinal las motoneuronas del bulbo y músculos isquiocavernosos son dependientes de la testosterona (T) (Porst & Sharlip, 2006).

A nivel de los CC, los nervios cavernosos que contienen la enzima NOS son también dependientes de la acción de la T. Estudios en animales han demostrado que la T tiene un efecto considerable en la relajación del músculo liso cavernoso. (Alcorn et al., 1999).

Se cree también que tiene una función en el mantenimiento y la estimulación de la actividad de la NOS, ya que hay una disminución de más del 50% en animales castrados (Chamness et al., 1995; Wespes, 2001). Y en ratas la disminución de la actividad de la NOS que sigue a la castración fue restaurada tras la administración de testosterona exógena (Garban et al., 1995; Wespes, 2001).

La densidad y sensibilidad de los α -adrenoreceptores es dependiente de T, observándose un incremento de estos tras la deprivación de T por castración (Mills TM et al., 1996)

Polipéptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

El VIP se encuentra localizado en las fibras nerviosas que inervan el cuerpo cavernoso y la vasculatura peneana y provoca una potente relajación a nivel del músculo liso, por lo que se ha postulado como un importante neurotransmisor NANC capaz de regular el mecanismo de erección. Estos efectos relajantes están acompañados de un incremento tisular de los niveles de AMPc (Gratzke et al., 2010). Sin embargo, el bloqueo mediante el uso de antagonistas no inhibió las relajaciones neurogénicas en arterias peneanas de menor tamaño, pero si fueron parcialmente bloqueadas estas respuestas relajantes mediante el bloqueo de las NOS, lo que indica que el VIP puede tener un efecto facilitador en las neurotransmisiones nitrérgicas a nivel presináptico (Simonsen et al., 2001).

Factores constrictores

Prostanoides contráctiles

Tanto en el cuerpo cavernoso como en las venas peneanas existe una producción predominante de prostanoides contráctiles, como $\text{PGF}_{2\alpha}$, TXA_2 o PGE_2 involucrados en el mantenimiento del tono miogénico espontáneo y que son modulados por la presión de oxígeno y por la hipoxia (Azadzoi et al., 1992; Christ et al., 1990; Daley et al., 1996; Martínez et al., 2005; Sánchez et al., 2010). PGH_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y TXA_2 son sintetizados mayormente en cuerpo cavernoso (Simonsen et al., 2002).

El TXA_2 se unen al subtipo de receptores de prostanoides TP y están involucrados en el efecto contráctil de los prostanoides tanto en las arterias como en músculo liso trabecular (Angulo et al., 2002). Los receptores TP se encuentran ligados a proteínas Gq que activan a la fosfolipasa C (PLC) encargada de hidrolizar el PIP en DAG y IP_3 , conduciendo a la activación de la PKC, así como del incremento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} (Rucker & Dhamoon, 2024). Por otra parte, $\text{PGF}_{2\alpha}$ se une a los receptores FP ligados tanto a proteínas Gq como Gai las cuales inhiben la formación de AMPc (Hardwick et al., 2013).

Se ha demostrado que una alteración en el equilibrio entre prostanoides vasodilatadores y contráctiles forma parte de la disfunción endotelial, así como de una función alterada del músculo liso de las arterias de roedores con diabetes tipo 1 y 2 (Matsumoto et al., 2007).

Péptido Natriurético Y (NPY)

El NPY es un péptido de 36 aminoácidos que suele encontrarse junto con la noradrenalina a nivel de los nervios simpáticos perivasculares y es ampliamente distribuido en el tejido eréctil del pene con una mayor densidad alrededor de las arterias helicinas. Aunque inicialmente parecía tener una acción detumesciente, estudios *in vitro* han demostrado que provoca un incremento de la presión intracavernosa en conejos (Kirkeby et al., 1992).

Se ha demostrado que el NPY tiene un efecto dual facilitando/inhibiendo la vasoconstricción por noradrenalina en arterias peneanas. Esto depende de la población de receptores Y. Los receptores Y₁ e Y₂ postsinápticos están involucrados en el aumento de las contracciones por noradrenalina, y los receptores Y₂ presinápticos limitan la liberación de noradrenalina por parte de los terminales de los nervios. Los receptores Y₁ se encuentran acoplados a proteínas G que normalmente incrementan las respuestas contráctiles en arterias de menor tamaño despolarizando el músculo liso arterial e inhibiendo las relajaciones por AMPc. En condiciones en que se encuentran bloqueados los receptores Y₁ e Y₂, el NPY es capaz de inducir relajaciones independientes de NO en arterias de resistencia peneanas a través de receptores atípicos localizados en el endotelio, los cuales parecen contestar a los efectos proerectogénicos reportados en estudios *in vivo* (Prieto, 2008b; Prieto et al., 2004).

Angiotensina II

La angiotensina II (Ang II) se forma localmente en el endotelio y en el músculo liso del cuerpo cavernoso (Kifor et al., 1997; Prieto, 2008b), donde tiene efectos contráctiles dosis dependientes a través de su interacción con los receptores de la angiotensina, AT1 en la musculatura cavernosa ligados a proteínas G (Becker et al., 2001; Park et al., 1997; Prieto, 2008b). También se unen a receptores AT2, dichos receptores se encuentran asociados a un efecto vasodilatador, aun así, su presencia y papel es menor en el tejido eréctil respecto a los AT1 (Fraga-Silva et al., 2013; Park et al., 1997). En las células musculares lisas, la estimulación de los receptores AT1 causa vasoconstricción a través de mecanismos dependientes e independientes de Ca²⁺ (Fraga-Silva et al., 2013; Iwamoto et al., 2001). Se incrementa la entrada de Ca²⁺ extracelular y la movilización de calcio intracelular, culminado con la activación de las cadenas ligeras de miosina (Fraga-Silva et al., 2013; Iwamoto et al., 2001). Además, los receptores AT1 también producen la activación de la vía Rho A/Rho cinasa conduciendo a la inhibición de la fosfatasa de cadenas ligeras de miosina (Fraga-Silva et al., 2013; Kanaide et al., 2003; Ying et al., 2006).

Se ha visto que el bloqueo de dicho receptor mediante antagonistas reduce las contracciones provocadas por la estimulación eléctrica transmural (EFS) en el cuerpo cavernoso *in vitro* e incrementa la presión intracavernosa *in vivo* (Comiter et al., 1997; Kifor et al., 1997; Prieto, 2008b).

Los niveles de Ang II en la sangre intracavernosa se encuentran incrementados en la fase de detumescencia (Becker et al., 2001; Prieto, 2008b). Por lo que puede ser

que la Ang II participe en la fase inicial de detumescencia como consecuencia de un incremento en la actividad simpática (Prieto, 2008b).

Endotelinas

Las endotelinas son péptidos sintetizados en el endotelio vascular con un potente efecto vasoconstrictor, aunque también pueden mediar un efecto vasodilatador a través de su unión con el receptor ET_B a nivel endotelial en condiciones fisiológicas (Holmquist et al., 1992; Parkkisenniemi et al., 2000; Prieto, 2008b).

ET_A y ET_B son los principales subtipos de receptores localizados en el músculo liso vascular y en las fibras nerviosas que inervan el tejido eréctil (Holmquist et al., 1992; Prieto, 2008b; Sánchez et al., 2014). Los receptores ET_A se encuentran localizados en el músculo liso principalmente y median las contracciones inducidas por ET₁, así como los procesos de proliferación celular en varios tipos de células (Contreras et al., 2013; Ergul, 2011; Schiffrin, 2001). Los receptores ET_B pueden tener un papel dual dependiendo de su localización, en condiciones fisiológicas se encuentran localizados en el endotelio, donde inducen vasodilataciones dependientes de NO y tiene un papel protector sobre los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando se localizan en células musculares lisas pueden causar vasoconstricción (Contreras et al., 2013; de Nucci et al., 1988; Ergul, 2011; Murakoshi et al., 2002; Schneider et al., 2007). En condiciones de resistencia a la insulina, como se demuestra en el trabajo realizado por Contreras y colaboradores (2013), se incrementa la expresión de receptores ET_B tanto en endotelio como en músculo liso, y la acción de este receptor se encuentra ligada a un incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺. Por lo que, aunque en condiciones fisiológicas los receptores ET_B parecen jugar un papel menor, en condiciones patológicas se encuentran asociados con un fenotipo contráctil/proliferativo en músculo liso (Contreras et al., 2013; Kelly-Cobbs et al., 2011; Pollock, 2010; Schneider et al., 2007).

De los tres tipos de endotelinas (ET1-3) ET-1 es el más importante, se encuentra en los cuerpos cavernosos, arterias cavernosas, vena dorsal profunda y las venas circunflejas ya que el receptor ET_A presenta una selectividad relativa por ET-1 mientras que el receptor ET_B presenta la misma afinidad por los tres tipos de endotelinas. Además, ET1 es la que presenta una mayor actividad contráctil (ET-1 > ET-2 > ET-3). ET-1 se une al receptor ET_A activando la fosfolipasa C que produce la escisión de IP₃ y DAG de PIP₂, esto desemboca en el incremento de la concentración intracelular de calcio y por tanto en la contracción y flacidez del cuerpo cavernoso (Baltazares Lipp et al., 2005; Saenz de Tejada et al., 1991a; Titus & Marappa-Ganeshan, 2024; Williams et al., 1991).

ET-1 es sintetizada por el músculo liso y las células endoteliales en el cuerpo cavernoso (Granchi et al., 2002; Saenz de Tejada et al., 1991a; Sánchez et al., 2014). Aun así, también ha sido localizada en fibras nerviosas perivasculares (Loesch & Burnstock, 2002; Sánchez et al., 2014).

ET-1 incrementa las vasoconstricciones adrenérgicas a través de los receptores ET_A presinápticos y antagoniza las respuestas relajantes al NO neural a través de los receptores ET_A postsinápticos. Además, ET-1 incrementa la producción de ROS alterando el mecanismo de dilatación dependiente de la eNOS y nNOS (Sánchez et al., 2014).

1.1.2. Disfunción eréctil

La disfunción eréctil (DE) se define como la incapacidad de alcanzar una erección suficiente para mantener una relación sexual satisfactoria (Shamloul & Ghanem, 2013). Es una condición clínica común que afecta principalmente a hombres mayores de 40 años. Un análisis realizado por el Comité Consultivo Internacional de Medicina Sexual sobre epidemiología y factores de riesgo de la DE (Lewis et al., 2010) mostró una prevalencia de la DE del 1-10% en hombres por debajo de 40 años, que incremento a un 20-40% en hombres de entre 60-69 años. En hombres por encima de 70, la prevalencia de la DE alcanza un 50-100% (Lewis et al., 2010; Shamloul & Ghanem, 2013). La prevalencia de DE a nivel mundial se ha previsto que alcanzará los 322 millones de casos en el año 2025 (Ayta et al., 1999; Bacon et al., 2006; Lewis et al., 2010).

La DE se puede clasificar en base a la severidad, etiología o el comienzo de esta (Meuleman, 2002). Atendiendo a su severidad, la DE se clasifica en leve, moderada o severa, dependiendo de la capacidad para alcanzar o mantener la erección. Así pues, una DE leve se caracteriza por una capacidad intermitente, la DE moderada por una capacidad infrecuente y finalmente la DE severa por una ausencia de capacidad para alcanzar la erección para mantener una relación sexual satisfactoria (Meuleman, 2002).

En base al comienzo de la DE, esta puede ser primaria o secundaria (Meuleman, 2002). La DE primaria correspondería a aquellos pacientes que nunca han podido

alcanzar o mantener una erección. Incluye traumas a nivel pélvico o del perineo, o conflictos psicológicos arraigados en el paciente (Meuleman, 2002). La DE secundaria es aquella que se desarrolla más tarde, pero en la que previamente ha habido un período de relaciones sexuales satisfactorias (Meuleman, 2002). Esta última tiene lugar debido a la presencia de factores de riesgo como obesidad, diabetes, hipertensión, hipo/hipertiroidismo, tabaco, sedentarismo o alcoholismo y puede ser un marcador centinela del desarrollo de otras patologías como la enfermedad cardíaca (N. Villalba et al., 2009). Los estudios sugieren que un paciente que comienza con un grado de DE severa presenta un escenario posible para desarrollar una enfermedad cardíaca dentro de un período de 5 años (Hodges L et al., 2006, Montsori P et al., 2003, Montsori P et al., 2009).

En base a su etiología puede ser psicogénica u orgánica, y esta última a su vez puede ser neurogénica, vasculogénica, endocrina o inducida por fármacos. También podría clasificarse según el mecanismo neurovascular implicado (fallo en el inicio - neurogénica, o fallo en la fase de llenado - arterial, o fallo en la retención del flujo sanguíneo, a nivel venoso) (Dean & Lue, 2005; Lizza & Rosen, 1999).

DE psicogénica

La impotencia psicogénica se cree que es la causa más común, con un 90% de hombres impotentes que se encuentran bajo esta condición (Dean & Lue, 2005). Un factor importante relacionado con la erección es la ansiedad del acto (miedo al fallo durante o ante la relación sexual (Johannes et al., 2000; Shamloul & Ghanem, 2013). Diversas teorías han desarrollado varios factores psicológicos tales como cognitivos, afectivos e interpersonales que predisponen a los pacientes a una disfunción sexual como bien pueden ser experiencias traumáticas pasadas, una inadecuada educación sexual o problemas físicos y mentales (Pastuszak, 2014; Shamloul & Ghanem, 2013).

El comportamiento sexual y la erección peneana son controlados por el hipotálamo, el sistema límbico y la corteza cerebral. Por tanto, la estimulación o inhibición de los mensajes es retransmitido a los centros de la erección espinales con el fin de facilitar o inhibir la erección (Dean & Lue, 2005). Existen dos posibles mecanismos que explican la inhibición de la erección en la disfunción psicogénica:

- 1) Una inhibición directa del centro espinal de la erección por el cerebro como una exageración de la inhibición suprasacral y una excesiva liberación simpática.
- 2) Unos niveles elevados de catecolaminas periféricas, las cuales incrementan el tono muscular liso peneano de forma que evita la relajación necesaria para alcanzar la

erección (Dean & Lue, 2005; Steers, 1990). A nivel clínico, se han reportado niveles altos de NA en suero de pacientes con una DE psicogénica comparándolos con pacientes control o paciente que tienen una DE vasculogénica (Kim & Oh, 1992).

DE neurogénica

El área preóptica medial, el núcleo paraventricular y el hipocampo son señalados como importantes centros de integración del estímulo sexual y la erección peneana (Dean & Lue, 2005). Los procesos patológicos en dichas regiones, tales como la enfermedad de Parkinson, un accidente cerebrovascular, encefalitis o las convulsiones del lóbulo temporal son frecuentemente asociadas con DE (Dean & Lue, 2005; Wermuth & Stenager, 1992).

En hombres que tienen una lesión a nivel del cordón espinal, su función eréctil depende mayormente de la naturaleza, localización y extensión de la lesión. Además de DE, también pueden presentar alteraciones en la eyaculación y en el orgasmo (Dean & Lue, 2005). La erección reflexógena se encuentra preservada en el 95% de los pacientes que tienen lesiones completas a nivel superior del cordón espinal, mientras que solamente el 25% de aquellos que presentan lesiones espinales a niveles inferiores pueden alcanzar la erección (Dean & Lue, 2005; Kirby, 1994; Lue, 2001).

Debido a la estrecha relación entre los nervios cavernosos y los órganos pélvicos, la cirugía en este tipo de órganos es una causa frecuente de impotencia. La incidencia de la impotencia iatrogénica por parte de diferentes procedimientos ha sido reportada con los siguientes casos: prostatectomía radical 43-100%, prostatectomía perineal para enfermedad benigna 29%, resección perineal abdominal 15% - 100% esfinterectomía externa en las posiciones 3 y 9 del reloj 2% - 49% (Dean & Lue, 2005; Finkle & Taylor, 1981; McDermott et al., 1981; Veenema et al., 1977; Walsh & Donker, 1982; Weinstein & Roberts, 1977; Yeager & Van Heerden, 1980).

La recuperación de la función eréctil tras una cirugía pélvica radical puede llevar de 6 a 24 meses. Un tratamiento temprano con alprostadilo o sildenafil oral ha reflejado una mejora en la recuperación de la función eréctil (Dean & Lue, 2005; Montorsi et al., 1997; Padma-Nathan et al., 2004). Se cree que las erecciones inducidas farmacológicamente previenen el tejido estructural de cambios asociados a erecciones infrecuentes o simplemente que no haya erecciones durante el periodo de recuperación a nivel de los nervios (Dean & Lue, 2005).

DE endocrina

El hipogonadismo es asociado frecuentemente a la población impotente (Barkin, 2011). La influencia de los andrógenos en el crecimiento y desarrollo del tracto reproductor masculino y características sexuales secundarias, así como sus efectos en la libido y comportamiento sexual han sido reportados y son bien conocidos (Barkin, 2011, 2010; Dean & Lue, 2005; Shabsigh, 2003; Wespes, 2001). En experimentos realizados por Mulligan y Schmitt (1993) se concluye que la testosterona incrementa el interés sexual, incrementa la frecuencia de los actos sexuales e incrementa las frecuencias de las erecciones nocturnas, pero apenas presenta efecto sobre las erecciones inducidas por fantasías o visualizaciones.

Experimentos realizados con ratas castradas han demostrado una disminución del flujo arterial, así como inducir la fuga venosa, a la vez que reducir a la mitad la respuesta eréctil a la estimulación del nervio cavernoso (Dean & Lue, 2005; Mills et al., 1994; Penson et al., 1996). El tratamiento con flutamida, estradiol u hormona liberadora de gonadotropinas añadido a la castración inhibe aún más la respuesta eréctil. Aunque la actividad NOS se encuentra reducida en estos animales, los contenidos neuronales y endoteliales de NOS no son reducidos de forma significativa con el tratamiento. La castración también incrementa las respuestas α -adrenérgicas del músculo liso peneano (Dean & Lue, 2005; Reilly et al., 1997; Shabsigh, 1997; Traish et al., 1999). Clínicamente muchos pacientes que se encuentran bajo un largo tratamiento de privación de andrógenos debido al cáncer de próstata han reportado un libido muy pobre y consiguiente DE (Bagrodia et al., 2009).

La hiperprolactinemia, tanto si es debida a un adenoma pituitario o al efecto de los fármacos, resulta en una disfunción reproductiva y sexual. Los síntomas pueden incluir falta de libido, DE, galactorrea, ginecomastia e infertilidad (Dean & Lue, 2005). La hiperprolactinemia se encuentra asociada con bajos niveles circulantes de testosterona, lo que parece ser un efecto secundario a la inhibición de la hormona liberadora de gonadotropina debido a unos niveles altos de prolactina (Leonard et al., 1989).

La DE también puede estar asociada con hipertiroidismo e hipotiroidismo. El hipertiroidismo está frecuentemente asociado con libido disminuida, lo que puede causar un incremento en los niveles circulantes de estrógenos, y menos a menudo con DE. En el caso del hipotiroidismo, la baja secreción de testosterona y unos niveles elevados de prolactina contribuyen a la DE (Chen et al., 2018; Dean & Lue, 2005; Gabrielson et al., 2019).

DE vasculogénica

La disfunción endotelial es el denominador común de muchos riesgos vasculares que conducen a la DE aterogénica (Virag et al., 1985). En pacientes con hipertensión la incidencia y prevalencia de DE puede alcanzar un 68% (Burchardt et al., 2000; Mittawae et al., 2006; Virag et al., 1985). Además, las respuestas relajantes dependientes del endotelio en respuesta a agonistas (ACh, Bradicinina) se encuentran disminuidas (Cai & Harrison, 2000; Dean & Lue, 2005; Panza et al., 1990; Taddei et al., 1998).

Se ha demostrado que la diabetes y la hipercolesterolemia modifican la función relajante del endotelio sobre el músculo cavernoso y alterando la erección (Azadzoï & Saenz de Tejada, 1991). También se ha visto como la DE mejora cuando las concentraciones elevadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) así como de colesterol disminuyen (Corona et al., 2011; Shamloul & Ghanem, 2013).

Se ha comprobado que los pacientes que presentan DE son más propensos a padecer eyaculación precoz, síntomas a nivel del tracto urinario inferior asociados con hipertrofia benigna de próstata, o vejiga hiperactiva (Seftel AD et al., 2004).

Entre los hombres diagnosticados con DE, aproximadamente el 40% presentan hipertensión, el 42% hiperlipidemia y el 20% diabetes (Selvin E et al., 2007, Seftel AD et al., 2004). Estos factores de riesgo que se mencionaban anteriormente contribuyen a cambios hormonales como una bajada en los niveles de testosterona o alteraciones en la función endotelial que contribuyen al desarrollo de la DE (Gretchen M. Irwin, 2019).

La aterosclerosis o la enfermedad arterial oclusiva del árbol de las arterias hipogástricas-cavernosas-helicinas puede disminuir la presión de perfusión y el flujo arterial a los espacios de los sinusoides cavernosos, incrementando de esta forma el tiempo de alcance de una máxima erección y disminuyendo la rigidez del pene erecto. En la mayoría de los pacientes que tienen DE aterogénica, la alteración de la perfusión peneana es un componente de un proceso aterosclerótico generalizado (Schwartz & Kloner, 2011). Experimentos realizados por Michal y Ruzbarsky (1977) reflejan que tanto el nivel de incidencia de la enfermedad coronaria como la edad se encuentran asociados a una DE. Existen una serie de factores de riesgo que están asociados a una insuficiencia arterial como la hipertensión, la hiperlipemia, el tabaco, la diabetes mellitus la disminución perineal o trauma pélvico (Dean & Lue, 2005; Goldstein et al., 1984; Levine et al., 1990; Rosen et al., 1990). La DE y la enfermedad cardiovascular comparten los mismos factores de riesgo como la hipertensión, diabetes mellitus, hipercolesterolemia y el tabaco (Dean & Lue, 2005; Feldman et al., 1994; Martin-Morales et al., 2001)

En la DE debida a la insuficiencia arterial, hay una disminución de la presión de oxígeno en la sangre que irriga los CC comparada con aquella medida en pacientes con DE psicogénica (Tarhan et al., 1997). Esto podría afectar a factores como la formación de prostanoïdes. Además, una disminución en el tamaño del lumen de las arterias contribuye a una resistencia perivascular que se traduce en hipertensión (Mulvany & Halpern, 1977).

Otra de las causas más comunes de la impotencia vasculogénica es un fallo o un mecanismo de venoclusión no eficaz (Dean & Lue, 2005; Rajfer et al., 1988). Este puede resultar de los siguientes procesos patológicos:

- La presencia o desarrollo de largos canales venosos que pueden drenar el cuerpo cavernoso
- Enfermedades degenerativas (la enfermedad de Peyronie, la edad, y la diabetes) o una lesión traumática de la túnica albugínea (fractura peneana) puede resultar en una inadecuada compresión de las venas subtúnica y emisarias. En la enfermedad de Peyronie una túnica albugínea inelástica puede evitar que las venas emisarias se cierren (Metz et al., 1983). En estudios realizados por lacono y colaboradores (1994) se observa que una disminución de las fibras elásticas en la túnica albugínea y una alteración de la microarquitectura pueden contribuir a la impotencia en algunos pacientes (Dean & Lue, 2005; lacono et al., 1994).
- Alteraciones estructurales en los componentes del sistema trabecular, el músculo liso cavernoso y el endotelio puede resultar en un escape venoso.
- Una relajación insuficiente del músculo liso trabecular causando una expansión inadecuada de los sinusoides y una insuficiente compresión de las vénulas subtunicales en individuos con un excesivo tono adrenérgico o en un paciente que tiene una liberación de neurotransmisores alterada. Se ha demostrado que una alteración de los α -adrenoceptores o una disminución de la liberación de NO incrementa el tono muscular y disminuye la relajación en respuesta a relajantes endógenos (Christ et al., 1990; Dean & Lue, 2005).

Tanto en la DE neurogénica como en la vasculogénica los daños en el músculo liso pueden ser un factor clave a la hora de agravar una causa primaria (Dean & Lue, 2005; Mersdorf et al., 1991). La pérdida de la capacidad de expansión de los sinusoides asociada con un incremento en la deposición del colágeno y una disminución de las fibras elásticas se puede observar en diabetes, hipercolesterolemia, enfermedad vascular, lesión peneana o edad avanzada (Cerami et al., 1987; Dean & Lue, 2005; Hayashi et al., 1987). En estudios realizados por Moreland y colaboradores se demostró

que PGE₁ suprime la síntesis de colágeno a través de la disminución del factor transformante de crecimiento α 1 (TFG α 1) en músculo liso cavernoso, lo que implica que la inyección de PGE₁ puede ser beneficiosa para la fibrosis intracavernosa (Moreland et al., 1995).

Los canales iónicos se encuentran íntimamente involucrados en los eventos bioquímicos de la función muscular, y una alteración de los canales iónicos puede tener un profundo efecto en la función muscular. Se ha demostrado una alteración en los canales BK_{Ca} en células de pacientes impotentes lo que sugiere que una alteración en la función o regulación de los canales de potasio puede contribuir a una disminución de la capacidad hiperpolarizante, una homeostasis de calcio alterada, y por tanto una alteración de la relajación del músculo liso. (Fan et al., 1995)

En varias enfermedades arteriales existe una pérdida o reducción del contacto por membrana entre células debido a la presencia de fibras de colágeno entre membranas (Dean & Lue, 2005; Persson et al., 1989). Esto podría suponer un desorden en la función o pérdida de las uniones *gap* que puede alterar la actividad coordinada del músculo liso.

DE inducida por medicamentos

También se incluye dentro de la DE secundaria a aquella producida por los efectos secundarios de fármacos la cual ocasiona el 25% de los casos (Bacon et al., 2006). Esta es más frecuente en medicamentos con efectos antihipertensivos, antidepresivos o antipsicóticos. Los medicamentos psicotrópicos como los antidepresivos se encuentran asociados de forma significativa a la DE, especialmente los inhibidores de la recaptación de serotonina y la venlafaxina. Los antipsicóticos como risperidona y olanzapina tienen aún mayor probabilidad de causar DE (Aversa et al., 2008; Serretti & Chiesa, 2011). Los antihipertensivos como las tiazidas seguidas de los β -bloqueantes son también los medicamentos más comunes capaces de provocar DE (Aversa et al., 2008; Thomas et al., 2003).

1.1.2.1. Disfunción eréctil y enfermedad cardiovascular

La DE es común entre pacientes con enfermedad cardiovascular (Kirby et al., 2005). Un estudio realizado por Kloner y colaboradores (2003) en 76 hombres con enfermedad coronaria arterial establecida mostró que el 75% presentaba cierto grado de DE. Existe un periodo de 3 años entre la aparición de los síntomas de la DE y el

evento cardiovascular que confiere una oportunidad para mitigar el riesgo (Gandaglia et al., 2014).

La DE y la enfermedad cardiovascular (ECV) comparten factores de riesgos comunes incluyendo la edad, hipercolesterolemia, hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes, tabaco, síndrome metabólico, estilo de vida sedentario y depresión (Jackson et al., 2010; Vlachopoulos et al., 2013b). Un estudio realizado por Roumeguère y colaboradores en 215 pacientes con DE mostró una prevalencia de hipercolesterolemia del 70,6% en pacientes con DE que respecto a los controles sin DE (Roumeguère et al., 2003). El Estudio de Reino Unido para la Prevención de la Diabetes (UKPDS) reveló que el 20% de los pacientes tenían DE en el momento en que la diabetes les fue diagnosticada (Martín-Timón et al., 2014). La ECV y la DE comparten la misma base fisiopatológica basada en su etiología y progresión (Vlachopoulos et al., 2008). Sin embargo, la relación entre las dos condiciones clínicas es compleja y puede involucrar otros mecanismos fisiopatológicos tales como neuropatías o desordenes neuronales (Gandaglia et al., 2014; Ryan & Gajraj, 2012; Shamloul & Ghanem, 2013). Varios estudios han establecido que la DE es frecuente en hombres con ECV establecida, que coexiste con una enfermedad arterial coronaria y que es un factor independiente para futuros eventos cardiovasculares tanto en hombres con ECV establecida como en aquellos que no (Jackson et al., 2010; Montorsi et al., 2006; Vlachopoulos et al., 2013b). En estos últimos la DE precede a la enfermedad coronaria, al infarto agudo de miocardio y a la enfermedad arterial periférica en un periodo que comprende de los 2 a los 5 años (de media 3 años) (Jackson et al., 2010).

Los primeros estudios retrospectivos investigaban la prevalencia de DE y ECV en pacientes y muestran un incremento del riesgo de DE en pacientes con CVS (vasoespasma arterial coronario) (Jackson, 1999; Kirby et al., 2001; O'Kane & Jackson, 2001). Las primeras evidencias de la asociación DE y enfermedad coronaria viene del estudio pionero realizado por Montorsi y colaboradores (2003). Los autores concluyeron que aproximadamente el 50% de los pacientes con dolor torácico agudo y con enfermedad coronaria arterial experimentaban DE. La disfunción sexual precedía a la enfermedad coronaria arterial prácticamente en el 70% de los casos, llegando a ser clínicamente evidente 3 años antes (a veces un periodo superior llegando a los 5 años) que los síntomas coronarios, y de este modo estableciendo una asociación temporal entre la DE y la enfermedad coronaria arterial.

Un número considerable de estudios han descrito la capacidad de la DE para predecir el riesgo de un evento cardiovascular (infarto de miocardio, embolia, revascularización) en pacientes con un alto riesgo de ECV, diabético y con algún fallo

cardíaco (Araujo et al., 2010; Böhm et al., 2010; Gazzaruso et al., 2008; Thompson et al., 2005; Vlachopoulos et al., 2013b).

Normalmente es la DE vasculogénica la que se encuentra estrechamente relacionada con la ECV, a pesar de que pueda coexistir un componente psicogénico con la DE vasculogénica (Jackson et al., 2010; Vlachopoulos et al., 2008).

La erección peneana es sobre todo un proceso vascular, tanto el endotelio como el músculo liso peneano son muy sensibles a cambios funcionales y estructurales. La DE vasculogénica resulta de una alteración de las relajaciones del VSM dependientes e independientes del endotelio (etapas iniciales), de una oclusión de las arterias cavernosas debida a un proceso de aterosclerosis (etapas posteriores) o una combinación de ambos (Vlachopoulos et al., 2008). La relación entre la DE y la ECV a nivel clínico se basa en la fisiopatología que comparten. La hipótesis del diámetro arterial explica porque la enfermedad coronaria frecuentemente se manifiesta con una DE previa, antes de que aparezca (P. Montorsi et al., 2003). De acuerdo con esta hipótesis, dada una situación de aterosclerosis las arterias más pequeñas como las peneanas (1-2 mm) sufren obstrucción mucho antes que las arterias coronarias que son más grandes (3-4 mm) (Gandaglia et al., 2014; Montorsi et al., 2006). Esta teoría sostiene lo mismo en caso de que se produzca una aterosclerosis no obstructiva, ya que cuanto más pequeña sean las arterias más grande es la capa endotelial, ya que la erección requiere un nivel alto de vasodilatación. Por lo que el mismo grado de DE es sintomático en estas arterias pequeñas pero subclínico en aquellas más grandes (coronarias) (Vlachopoulos et al., 2006).

La DE se encuentra asociada a un incremento de la respuesta inflamatoria y de la activación protrombótica endotelial (Vlachopoulos et al., 2006), al igual que ocurre en la enfermedad coronaria en pacientes que no padecen DE, mientras que cuando coexisten las dos, las complicaciones son mayores. Varios estudios demostraron que la aparición de la DE y su severidad están asociados con un incremento de la expresión de los marcadores de la inflamación (Araña Rosaínz et al., 2011; Bocchio et al., 2004; Chiurlia et al., 2005; Vlachopoulos et al., 2006). Los marcadores de la inflamación y sus mediadores (proteína C reactiva, interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-10, IL-1 β y el TNF α (factor de necrosis tumoral α) y los factores endoteliales/protrombóticos (factor de von Willebrand, el activador de plasminógeno) todos ellos se han expresado en altos niveles en pacientes con DE (Araña Rosaínz et al., 2011; Bocchio et al., 2004; Chiurlia et al., 2005; Vlachopoulos et al., 2006).

Otro factor derivado de la DE y que incrementa el riesgo de ECV es la deficiencia de testosterona (Jackson et al., 2010). Ya que, niveles bajos de testosterona incrementan los niveles de LDL, colesterol, así como la producción de marcadores proinflamatorios (Carson & Rosano, 2012). Los bajos niveles de andrógenos se han asociado con DE, síndrome metabólico, diabetes y CVD (Corona et al., 2011; Khaw et al., 2007; Mirone et al., 2009; Traish et al., 2007). Se ha demostrado que los niveles de testosterona están inversamente relacionados con el riesgo de sufrir eventos cardíacos adversos (Corona et al., 2011; Khaw et al., 2007; Vlachopoulos et al., 2013a).

Las células endoteliales y las células del músculo liso son los principales objetivos de los efectos de los andrógenos en los sistemas cardiovascular y peneano, y un hipogonadismo está asociado con un incremento del riesgo de un remodelado vascular aterosclerótico (Gandaglia et al., 2014; Mirone et al., 2009). Los andrógenos pueden reducir la expresión de los marcadores de la inflamación en estos tejidos, y unos bajos niveles de testosterona tienen un efecto proinflamatorio y proapoptótico en las células endoteliales (Mirone et al., 2009).

Los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) es el tratamiento de primera línea para la DE. Los inhibidores de la PDE5 pertenecen a esa clase de medicamentos que inicialmente fue desarrollada para tratar la angina de pecho. Además, estos fármacos no solo son activos a nivel del lecho vascular peneano, sino también a nivel sistémico, por lo que pueden resultar beneficiosos para pacientes con enfermedad coronaria arterial afectados por una DE. Varios estudios han descrito una reducción en el tamaño del infarto en animales que recibieron sildenafil comparando con sus controles (Gandaglia et al., 2014; Schwartz et al., 2012). Es más, la administración de inhibidores de PDE5 ha demostrado reducir la hipertrofia cardíaca, incrementar la síntesis de NO, y mejorar la supervivencia una vez establecido el cuadro preclínico (Gandaglia et al., 2014; Schwartz et al., 2012). En pacientes con estenosis en al menos una arteria coronaria, la administración de sildenafil mejora el pico de velocidad del flujo coronario, el diámetro arterial, el flujo sanguíneo y la resistencia vascular (Gandaglia et al., 2014; Herrmann et al., 2000). Además, el hecho de que ambas enfermedades se encuentren asociadas, y que fármacos para la DE puedan suponer una mejora y prevención de un posible evento cardiovascular no solo supone una mejora en las relaciones sexuales sino también una adherencia al tratamiento (Vlachopoulos et al., 2013b).

Como se ha mencionado al inicio de esta sección, la ECV y la DE comparten ciertos factores de riesgo como la obesidad, la hipertensión, la diabetes, el tabaco y un estilo de vida sedentario entre otros. En un estudio realizado en el modelo de obesidad

genética de rata zucker (OZR) se demuestra a nivel experimental como la DE puede ser un marcador de ECV, ya que existe una disfunción endotelial a nivel de las arterias peneanas pero no a nivel de las arterias coronarias como muestran las alteraciones en la relajación endotelial a la ACh así como diferencias estructurales entre ambas (Villalba et al., 2009). El remodelado de los vasos sanguíneos se considera un rasgo propio de los desórdenes vasculares, en el trabajo de Villalba y colaboradores se demuestra que existen alteraciones estructurales en las arterias peneanas de ratas OZR, mientras que en las arterias coronarias OZR no se apreciaron cambios significativos en la pared vascular (Villalba et al., 2009).

1.1.2.1. Disfunción eréctil y síndrome metabólico

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo que contribuyen a la enfermedad cardiovascular y se encuentra asociada con hipertensión, dislipemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Todos estos factores junto con la obesidad constituyen el síndrome metabólico (Müller & Mulhall, 2006).

El síndrome metabólico también conocido como “síndrome de resistencia a la insulina” o Síndrome X, fue descrito por primera vez en 1920 por Eskil Kylin, médico de origen sueco, como la presencia al mismo tiempo de hipertensión, hiperglicemia y gota (Eckel et al., 2005). Hoy en día se caracteriza por la presencia o tratamiento de algunas de las siguientes patologías: obesidad abdominal (cintura > 94 cm), triglicéridos > 150 mg/dL, presión sanguínea >130/85 mmHg, glucosa en ayuno >100mg/dL, y HDL <40 mg/dl (Alberti et al., 2009; Sanchez et al., 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, el síndrome metabólico presenta un conjunto de alteraciones metabólicas que establecen un alto potencial de riesgo para el desarrollo de la disfunción endotelial y conduciendo así a DE y a enfermedad cardíaca (Müller & Mulhall, 2006).

Algunos de los mecanismos específicos que desencadena el síndrome metabólico a través de los cuales se desarrolla la DE incluyen la hiperglicemia y el envejecimiento, que conducen a una glicosilación de las fibras elásticas y a un fallo en la relajación de CC cuerpo cavernoso; así como en la disfunción de las células endoteliales que tapizan los sinusoides cavernosos, provocando una disminución en la liberación de NO y por tanto una alteración de la vasodilatación. Varios estudios muestran que la disfunción del lecho vascular y el músculo liso trabecular conduce a una disfunción en el mecanismo de veno-oclusión (Gratzke et al., 2010; Moreland, 2000; Walton et al., 2021). Los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs)

conducen también a un incremento en la síntesis de las especies reactivas de oxígeno o ROS y reducen la biodisponibilidad de NO. La neuropatía diabética y la disminución en la producción neural de NO, disminuye los niveles de NO liberados hacia el músculo liso del cuerpo cavernoso, así como una reducción del flujo arterial (Fonseca & Jawa, 2005; Müller & Mulhall, 2006). Varios estudios han demostrado que la disfunción endotelial se produce de forma precoz en el estado de resistencia a la insulina, y actúa como un predictor de la disfunción vascular en enfermedades como la DE y la ECV (Gorgel et al., 2014; Grundy, 2002; Lakka et al., 2002).

Niveles bajos de andrógenos se encuentran estrechamente relacionados con MetS y sus componentes (Laaksonen et al., 2003; Sanchez et al., 2017). En un estudio realizado en hombres con bajos niveles de testosterona en suero, García-Cruz y colaboradores (2013) hallaron que el síndrome metabólico se encontraba asociado significativamente con los niveles más bajos según el IIEF (índice internacional de función eréctil). La severidad de la DE fue relacionada directamente con la severidad de MetS, con un mayor número de componentes de MetS a medida que aumentaba la severidad de la DE (García-Cruz et al., 2013; Sanchez et al., 2017).

Un grado bajo de inflamación crónica subclínica es otro de los factores que afectan a la función endotelial y ha sido asociado tanto a la DE como al MetS. La inflamación crónica conduce a un incremento de las citoquinas proinflamatorias. Los niveles plasmáticos de proteína reactiva C (PCR) se encuentran significativamente incrementados en pacientes con DE comparados con aquellos que no padecen DE, además de encontrarse asociados a la edad y a un nivel alto de riesgo coronario (Chiurlia et al., 2005; Sood et al., 2019). Un incremento en las citoquinas proinflamatorias ha sido descrito a lo largo del tiempo y a su vez en pacientes obesos y diabéticos que se encuentran bajo un desorden metabólico en la mayoría de los casos (Araña Rosaínz et al., 2011; Sood et al., 2019; Vlachopoulos et al., 2007).

Una neuropatía autonómica ha sido asociada a pacientes y modelos animales con MetS, de acuerdo con la literatura más reciente, MetS se encuentra asociado a una actividad simpática autonómica exacerbada (Nangle et al., 2009; Walton et al., 2021).

En pacientes obesos con un estilo de vida sedentario, existe una mayor incidencia de DE que en aquellos pacientes que no padecen obesidad (Derby et al., 2000; Sanchez et al., 2017). Un análisis multivariante llevado a cabo en un estudio de cohortes de 22.086 hombres americanos, aquellos con un IMC de 25-26,9 kg/m² presentaron un 19% de riesgo mayor de presentar DE que aquellos con un IMC < 25

kg/m², mientras que los que tuvieron un IMC 27-29.9 kg/m² tuvieron un incremento del riesgo de padecer DE del 33% (Bacon et al., 2006; Sanchez et al., 2017).

Varones con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 presentaron un riesgo mayor de DE comparado con aquellos hombres no diabéticos (Bacon et al., 2002; Sanchez et al., 2017). En el modelo de ratón de diabetes tipo I, las relajaciones dependientes del endotelio estuvieron disminuidas tanto en pene como en aorta a las 4-6 semanas de que se desarrollara la diabetes mellitus. En otro estudio en el cual se usó un modelo de rata de diabetes tipo I hubo también una disminución de las relajaciones producidas por el endotelio, así como un incremento del estrés oxidativo en los sinusoides cavernosos y en aorta tras 8 semanas de que se desarrollara la diabetes (Paskaloglu et al., 2004; Walton et al., 2021).

Una presión arterial alta también ha sido descrita como causa de DE, ya que un estudio preclínico reportó una menor capacidad eréctil en ratas hipertensas espontáneas que en ratas control (Assaly et al., 2019; Walton et al., 2021).

De igual forma, la presión intracavernosa en el modelo de obesidad genética/resistencia a la insulina ha resultado ser significativamente más baja que en ratas control. Además, también se han visto reducidos los valores del contenido en endotelio y músculo liso del modelo de obesidad genética respecto a las ratas control (Ruan et al., 2018; Walton et al., 2021).

Las complicaciones vasculares diabéticas se encuentran asociadas con un remodelado de la pared vascular en la circulación retinal, renal y mesentérica (Homme et al., 2018; Souza-Smith et al., 2011; Spinetti et al., 2008; Villalba et al., 2009). En el trabajo realizado por Villalba y colaboradores (2009) en el modelo de obesidad genética en ratas se observan cambios estructurales en la morfología de las arterias peneanas que pueden explicar la DE reportada en este modelo (Kovanecz et al., 2006; Wingard et al., 2007).

En el modelo de obesidad genética la disfunción veno-oclusiva se encuentra asociada con una fibrosis del tejido eréctil y una disminución del contenido de músculo liso (Kovanecz et al., 2006). En ratones diabéticos se ha demostrado que existen alteraciones en la matriz del cuerpo cavernoso que consisten en una desregularización del contenido de colágeno y elastina asociada a un mecanismo de veno-oclusión alterado y unas respuestas eréctiles reducidas (Luttrell et al., 2008).

Se ha descrito que las alteraciones metabólicas como la hiperglicemia o la hiperinsulinemia participan en la génesis de anomalías estructurales observadas en

la diabetes mellitus. La insulina promueve el crecimiento vascular, y se ha demostrado que existe una correlación entre la insulina plasmática y el radio entre la capa media y el lumen de arterias de menor tamaño (Rizzoni et al., 2001; Villalba et al., 2009). La producción exacerbada de factores vasoactivos como la endotelina-1 puede contribuir al remodelado vascular de las arterias de animales diabéticos (Harris et al., 2005; Villalba et al., 2009). Por tanto, el remodelado de los tejidos peneanos tanto arterial como del cuerpo cavernoso se correlaciona con una DE en el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (Kovanecz et al., 2006; Luttrell et al., 2008; Villalba et al., 2009).

1.2. ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo compuesto por dos tipos de membranas: una rugosa, formada por túbulos, y una lisa, compuesta por láminas membranosas. El RE se distribuye de manera amplia en el citoplasma celular, manteniendo una conexión continua con el aparato de Golgi y las mitocondrias. Además, en ocasiones puede acercarse a la membrana plasmática y la envoltura nuclear (Bola & Allan, 2009).

La proporción y distribución de las membranas rugosas y lisas varían según el tipo de célula. En otras palabras, las células que producen y secretan grandes cantidades de proteínas tienen una mayor proporción de RE rugoso. Por otra parte, se caracterizan por una mayor composición de RE liso aquellas células que sintetizan esteroides, esto se debe al mantenimiento de la composición lipídica de las membranas que forman este comportamiento a la hora de sintetizar ceramidas, colesterol y glicerofosfolípidos (Alberts et al., 2002).

Aunque es verdad que los lípidos se sintetizan en el citosol, el procesamiento final tiene lugar en el RE liso (Cortés Ginez, MC et al., 2021). El RE rugoso realiza la fabricación de proteínas a través de las subunidades ribosomales existentes que producen cadenas de polipéptidos en desarrollo, dando lugar a proteínas que pueden ser transmembranales o de secreción (Zeeshan et al., 2016). El plegamiento proteico tiene lugar dentro del RE, donde se generan y mantienen las configuraciones tridimensionales y cuaternarias de las proteínas, previniendo la acumulación de cadenas polipeptídicas mal conformadas. Esta acción tiene lugar en un entorno altamente oxidante que facilita la creación de enlaces disulfuro mediante procesos de isomerización y reducción. En este contexto, la relación entre GSH (glutación reducido) y GSSG (glutación oxidado) oscila en un rango de 1:1 o 3:1, a diferencia del entorno

reductor del citosol, donde la relación varía entre 30:1 y 100:1 (Chong et al., 2017). La creación y reestructuración de enlaces disulfuro se lleva a cabo gracias a la acción de las oxidorreductasas: PDI (proteína disulfuro isomerasa) y ERO1 (oxidorreductasa 1 del retículo endoplásmico) (Cao & Kaufman, 2014).

El proceso de plegamiento ocurre cuando la cisteína N-terminal del motivo CXXC, presente en los dominios a y a' del sitio activo de la PDI, acepta un par de electrones provenientes de una de las cisteínas en el sustrato polipeptídico, reduciéndola PDI y dando lugar a la formación del puente disulfuro en la proteína. Después, la PDI transfiere estos electrones a ERO1, oxidándose nuevamente para generar otro puente disulfuro. De manera simultánea, ERO1 transfiere el par de electrones a O₂ (oxígeno molecular), formando H₂O₂ (peróxido de hidrógeno). Con este proceso, el retículo endoplásmico aporta aproximadamente un 25% de los ROS generados (Görlach et al., 2006).

La nueva cadena polipeptídica se pliega parcialmente en el RE antes de ser exportada al aparato de Golgi para una posterior maduración post-transduccional con el fin de adquirir la conformación final (Chaudhari et al., 2014; Maamoun et al., 2019a). Sin embargo, si las proteínas se encuentran mal plegadas o agregadas, son retenidas dentro del RE y pasan por el sistema de descarte conocido como maquinaria de degradación asociada al RE (ERAD). El sistema ERAD degrada agregados proteicos y proteínas mal plegadas con la ayuda del proteasoma, de este modo se evita que salgan del RE causando algún tipo de daño en el entorno celular (Ghemrawi et al., 2018; Schwarz & Blower, 2016).

A pesar de todos estos mecanismos, las proteínas mal plegadas se pueden acumular dentro del lumen del RE, esto ocurre cuando la demanda para plegar nuevas proteínas supera la capacidad de plegamiento del RE, como se produce en las alteraciones metabólicas como la diabetes y la obesidad. Estas circunstancias conducen a la activación de la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR). El objetivo principal de la UPR es recuperar el estado de homeostasis inicial a través de: el cese de la transducción proteica con el fin de prevenir una futura sobrecarga, el incremento de la capacidad de plegado del RE y activar el sistema ERAD con el fin de deshacerse de las proteínas que no se han podido reparar. En el caso de que estas acciones fallasen se activarían entonces cascadas de señalización proapoptóticas (Battson et al., 2017; Ghemrawi et al., 2018; Minamino et al., 2010; Pandey et al., 2019).

Otra importante tarea del RE es almacenar iones Ca^{2+} . Este ion actúa como un segundo mensajero, controlando procesos de adición y eliminación de grupos fosfato, la contracción de los músculos, y procesos metabólicos, además de influir en la proliferación, diferenciación, movimiento y apoptosis celular. También desempeña un papel crucial como cofactor en las chaperonas que intervienen en el plegamiento de proteínas (Krebs et al., 2015).

El Ca^{2+} almacenado en el RE es liberado hacia el citosol mediante una bomba de Ca^{2+} conocida como ATPasa de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} varía en diferentes compartimentos celulares; en el RE es del orden de milimolar (mM), mientras que en el citosol se encuentra en concentraciones de 100 a 200 nanomolar (nM), pudiendo aumentar en este hasta 1 micromolar (μM) en respuesta a un estímulo (Cortés-Ginez et al., 2022). Este ion se une a proteínas como la calreticulina (con una constante de disociación, K_d , de 10^{-6} M). Esta proteína no solo regula la concentración de Ca^{2+} sino que también previene la acumulación de proteínas mal plegadas, gracias a su función de lectina, que le permite identificarlas y dirigirlas al proteosoma para su degradación (Görlach et al., 2015).

El Ca^{2+} tiene un papel crucial no solo en el plegamiento adecuado de proteínas, sino también es esencial para el transporte de proteínas entre el retículo RE, el aparato de Golgi y el citosol. Cualquier desequilibrio en su equilibrio homeostático no solo afectaría la formación de proteínas funcionales, sino que también permitiría la acumulación de proteínas mal plegadas en los mencionados organelos (I. X. Zhang et al., 2020).

Respuesta al plegamiento incorrecto de proteínas (UPR)

Como se ha mencionado anteriormente el buen funcionamiento del RE es esencial para la supervivencia celular, por esta razón el RE activa la respuesta al plegamiento incorrecto de proteínas (UPR) para restaurar su homeostasis. La UPR se produce por un exceso en la cantidad de proteínas que han sufrido un plegamiento incorrecto y la habilidad de subsanar estos errores de la maquinaria celular se ve sobrepasada. Una de las causas es la sobrecarga de nutrientes en los desórdenes metabólicos, junto con un incremento de la síntesis proteica y la deprivación de glucosa debido a una resistencia a la insulina (Achard & Laybutt, 2012). Esta respuesta puede ser activada por diferentes factores como la glicosilación alterada, una falta de nutrientes, depleción de calcio, estrés oxidativo o alteraciones en el metabolismo energético de la célula (Liu et al., 2016). Se han descrito tres marcadores del estrés del retículo: IRE1 α (proteína 1 α dependiente de inositol), PERK (proteína cinasa del RNA

unida a una cinasa del RE) y ATF6 (factor de transcripción activador 6). En condiciones normales estos factores se encuentran inactivos y anclados a la proteína de unión a la inmunoglobulina BiP. La UPR se desencadena cuando BiP detecta grupos sulfhidrilos o residuos hidrofóbicos libres de cadenas polipeptídicas en el lumen del RE, produciéndose un cambio conformacional en BiP dependiente de ATP que permite que se una a la cadena polipeptídica, dejando libre de esta forma a los sensores del estrés mencionados anteriormente para su activación (Cortés-Ginez MC et al., 2021).

IRE1 α

Es una proteína transmembranal formada por un dominio luminal N-terminal sensible a proteínas mal plegadas, así como un dominio transmembranal y una región citosólica con actividad cinasa y RNasa. Cuando la proteína BiP se separa, IRE1 α se activa por un proceso de oligomeración y autotransfosforilación que activa su actividad RNAasa iniciando el corte y empalme de XBP1 (proteína de unión a la caja X), mejorando el plegamiento, la glicosilación y la degradación proteica. XBP1 estimula la transcripción de varios genes que codifican proteínas y chaperonas que forman parte de la maquinaria ERAD con el fin de restaurar la homeostasis del RE (Cortés-Ginez et al., 2022; Hassler et al., 2012; Maamoun et al., 2019a). Además, activa secuencias específicas RIDD (IRE1 α regulado y dependiente del decaimiento del RNA) con el objetivo de disminuir la traducción de proteínas. Del mismo modo, induce la expresión de la MnSOD (manganeso superóxido dismutasa), enzima antioxidante que ayuda a disminuir la concentración de radicales libres de oxígeno (Cortés-Ginez et al., 2022).

Cuando la UPR falla al intentar resolver esta situación de estrés, esta misma enzima IRE1 α activa una cascada de señalización de apoptosis reclutando al factor asociado al receptor de TNF- α (TRAF-2) y la cinasa-1 señalizadora de apoptosis (ASK-1) provocando la fosforilación y por tanto la activación de moléculas señalizadoras de la inflamación como p38 MAPK y JNK (Maamoun et al., 2019a; Ron & Hubbard, 2008). La activación de JNK produce su translocación a la membrana mitocondrial y cataliza la fosforilación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la proteína proapoptótica Bim con la subsecuente inhibición y activación respectivamente, resultando en el inicio de la apoptosis. La activación de p38 MAPK fosforila y activa por tanto CHOP que altera la expresión de los genes en favor de la apoptosis (Lei & Davis, 2003; Maamoun et al., 2019a; Puthalakath et al., 2007).

PERK

Se encuentra formada por una región citoplasmática con residuos de serina/treonina con actividad cinasa. Una vez que es disociada de su unión con BiP se dimeriza y se autofosforila, fosforilando a su vez a eIF2 α (subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota), impidiendo la traducción del mRNA, disminuyendo de esta forma la síntesis de proteínas y evitando la sobrecarga (Maamoun et al., 2019a). Sin embargo, sí que activa la transducción selectiva de ATF4. ATF4 promueve la activación de genes necesarios para mediar la apoptosis inducida por estrés del RE tales como TRIB3 y CCAAT/proteína homóloga a la proteína de unión a potenciadores (CHOP). La regulación negativa de PERK se encuentra mediada por ATF4 la cual incrementa la transcripción de la proteína inducible por detención del crecimiento y daño en el ADN (GADD34) que conduce a la defosforilación de PERK y a la inactivación de la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Battson et al., 2017; Ghemrawi et al., 2018; Maamoun et al., 2019a; Minamino et al., 2010; Pandey et al., 2019). Además, activa la respuesta antioxidante al activar NRF2 (factor nuclear derivado de eritroide 2), lo que permite mantener la forma reducida de la GSH, la cual mantiene activas a las peroxirredoxinas, enzimas que controlan los niveles de peróxido (Cortés-Ginez MC et al., 2021).

ATF6

En condiciones de estrés del RE este factor se disocia de su unión a BiP y es transportado en vesículas hacia el aparato de Golgi donde es escindido secuencialmente por SIP-1 y 2 (proteasa Site-1 y 2) para luego ser traslocado al núcleo, en donde va a regular la transcripción de genes que codifican chaperonas como BiP y la proteína regulada por glucosa 94 (GRP94) y enzimas que promuevan la maduración proteica y la degradación de proteínas mal plegadas (Cortés-Ginez et al., 2022; Maamoun et al., 2019a). En caso de que la respuesta UPR no sea capaz de resolver las condiciones de estrés y el estado de estrés se prolongue esto llevaría a un proceso de apoptosis donde ATF6 tiene un papel crítico a la hora de inducir la expresión de CHOP (Bailey et al., 2007; Bailey & O'Hare, 2007; Maamoun et al., 2019a). Al igual que IRE1 α , también activa a XBP1, mejorando el plegamiento proteico (Cortés-Ginez et al., 2022).

Hasta aquí sería lo que se conoce como primera fase de la UPR. Cuando estos mecanismos de acción no son suficientes, se produce una reprogramación de la expresión génica de IRE1 α , PERK y ATF6 para inducir la apoptosis, ya que IRE1 α activa a JNK, una cinasa que controla la posterior activación de NF- κ B (factor de transcripción nuclear kappa B), la inflamación y la muerte celular. Mientras que, PERK y ATF6 activan a la proteína CHOP para que codifique genes de proteínas que aumentan el plegamiento

proteico, aunque también está relacionada con la apoptosis, ya que el incremento en el plegamiento de proteínas lleva a un aumento de ROS (Cortés-Ginez et al., 2022).

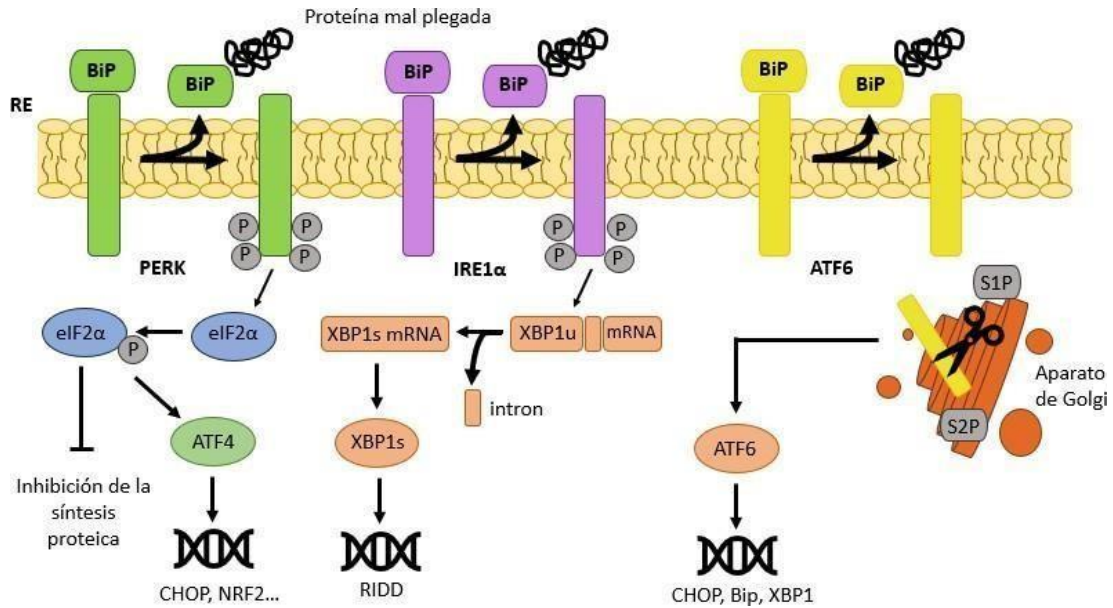


Figura 3. El plegamiento proteico incorrecto desencadena la UPR mediante la escisión de BiP que se une a la proteína mal plegada, esto activa los factores PERK, IRE1α y ATF6. PERK es entonces fosforilado activando eIF2α mediante fosforilación inhibiendo la síntesis proteica y activando a su vez a ATF4 que promueve la activación de la proteína CHOP y Nrf2 que codifican genes relacionados con la apoptosis y el correcto plegamiento proteico. IRE1α también se activa mediante fosforilación escindiendo el intrón que une a la proteína XBP1 al mRNA activando secuencias específicas que disminuyen la síntesis proteica. La activación de ATF6 resulta en la escisión de este en el aparato de Golgi por las proteínas S1P y S2P haciendo que ATF6 active XBP1 con el fin de mejorar el plegamiento proteico.

1.2.1. Estrés del RE y enfermedad metabólica

La desregulación del RE participa en la patogénesis de diversas patologías, incluidas las enfermedades metabólicas. En los desórdenes metabólicos, la respuesta al plegamiento incorrecto de proteínas (UPR) se produce como consecuencia de la sobrecarga de nutrientes, junto con la demanda incrementada de síntesis de proteínas para su metabolismo y la privación de glucosa debido a la resistencia a la insulina (Achard & Laybutt, 2012; Safiedeen et al., 2016). Además, dependiendo de los tejidos, la UPR es desencadenada por factores patológicos tales como la privación de nutrientes, la glucosilación alterada, la depleción de calcio, el estrés oxidativo, el daño al ADN y las alteraciones energéticas (Liu et al., 2016; Safiedeen et al., 2016).

El estrés crónico del RE acelera el flujo constante de ácidos grasos libres (AGL) que provienen de los adipocitos hacia la circulación y otros tejidos, lo cual eventualmente causa dislipidemia. Este fenómeno ha sido observado en adipocitos de ratas tratadas con inductores de estrés en el RE, como la tunicamicina, un antibiótico que inhibe los canales de Ca^{2+} , la glicosilación de proteínas y el transporte de proteínas hacia el aparato de Golgi (Han & Kaufman, 2016).

En experimentos realizados por Khan y colaboradores (2009a) se ha visto que el desarrollo acelerado de lesiones ateroscleróticas ocurre antes de que se establezca la diabetes asociada a dislipidemia lo que sugiere que el estrés del RE tiene lugar en un estado temprano de la diabetes.

Además, se ha demostrado que las LDLs oxidadas a través de la producción de ROS reflejan un estrés del RE en células endoteliales humanas (Sanson et al., 2009). La aterosclerosis también se ve acelerada en lesiones que sobreexpresan XBP1 en ratones ApoE^{-/-} (Khan et al., 2009a; Zeng et al., 2009).

En condiciones de hiperglicemia, las proteínas LDL también pueden someterse a un proceso de glucosilación; y la LDL glucosilada (LDL-G) se ha detectado en niveles altos en la sangre de pacientes diabéticos (Cimellaro et al., 2016; Lyons, 1993). Estudios en células endoteliales han descrito que la LDL-G es capaz de inducir la producción de ROS al activar la NADPH oxidasa, y de dañar la función mitocondrial causando apoptosis (Cimellaro et al., 2016; Xie et al., 2012). Además, las células endoteliales expuestas a LDL-G in vitro se caracterizan por una mayor activación de la UPR, como sugieren los niveles proteicos más altos de los mediadores del estrés del RE BiP, XBP-1 y CHOP (Cimellaro et al., 2016; Zhao et al., 2015). Recientemente se ha demostrado que la sobreactivación de la respuesta de estrés del RE desencadenada por la exposición de células endoteliales de la vena umbilical humana a LDL-G provoca una reducción de la expresión de la eNOS y la producción de NO, predisponiendo así a la disfunción endotelial (Cimellaro et al., 2016; Mohanan Nair et al., 2016).

Cabe remarcar que el potencial aterogénico de las proteínas LDL se amplifica aún más cuando se someten tanto a oxidación como a glucosilación. Se ha demostrado que las células endoteliales bovinas y los anillos aórticos de ratones incubados en presencia de LDL oxidada y glucosilada (HOG-LDL) mostraron una respuesta desproporcionada de estrés del RE y una actividad reducida de la ATPasa de calcio sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA), una enzima clave en el control de los niveles de calcio intracelular. Se demostró que la HOG-LDL aumenta los niveles de oxidación de la SERCA mediante una mayor liberación de ROS, inhibiendo su actividad y alterando

consecuentemente la homeostasis del calcio del RE (Cimellaro et al., 2016; Dong et al., 2010).

En conjunto, estos datos sugieren que la hiperglucemia y la hiperlipidemia cooperan para promover la disfunción en pacientes diabéticos, y el estrés del RE puede ser el efector común de su acción dañina.

Por el contrario, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) tienen propiedades protectoras cardiovasculares conocidas, además de la función tradicional en el transporte inverso del colesterol. En particular, las HDL contrarrestan la oxidación de las LDL y otros efectos adversos, como la muerte celular endotelial y la respuesta inflamatoria, desencadenada por citocinas y LDL oxidadas (Cimellaro et al., 2016; Kratzer et al., 2014). Cabe destacar que cada vez hay mayor evidencia sobre estos efectos beneficiosos a un contrapeso del estrés del RE desencadenado por las LDL oxidadas. Las HDL inhiben las cascadas IRE-1 y PERK/ATF-6, con la consiguiente reducción de la expresión de las moléculas proapoptóticas CHOP y JNK, y atenúan la señalización autofágica al prevenir el aumento del calcio citosólico en células endoteliales humanas cultivadas (Cimellaro et al., 2016; Muller et al., 2011).

De forma interesante, también se ha demostrado que los lípidos dietéticos inducen una activación desproporcionada de las vías de estrés del RE en el endotelio (Cimellaro et al., 2016; Wang et al., 2013). Específicamente, la exposición de células endoteliales aórticas humanas a lipoproteínas ricas en triglicéridos posprandiales, purificadas de muestras de sangre de sujetos humanos después de una comida rica en grasas, exacerba la respuesta de estrés del RE inducida por TNF- α y da como resultado una mayor expresión de moléculas de adhesión endotelial. Además, los niveles elevados de triglicéridos y AGL en sangre inducen una respuesta temprana de estrés del RE, con activación de IRE-1 y ATF-6, en células endoteliales vasculares periféricas de sujetos sanos sometidos a infusión intravenosa de lípidos (Cimellaro et al., 2016; Tampakakis et al., 2016). Esta observación reciente confirma los datos obtenidos por Kaplon y colaboradores en sujetos obesos, sugiriendo una correlación entre la vasodilatación mediada por flujo anormal y los niveles aumentados de marcadores de estrés del RE. Es notable que en este estudio más antiguo los valores del perímetro de la cintura muestran una correlación directa con la expresión de ARNm y proteínas de IRE1 α y ATF6 en células endoteliales vasculares periféricas (Kaplon et al., 2013). Este resultado podría explicarse, al menos en parte, por el aumento del flujo de AGL asociado con la obesidad abdominal aumentada, de la cual el perímetro de la cintura es un marcador (Cimellaro et al., 2016; Kaplon et al., 2013).

La administración de tunicamicina provoca el estrés del RE y, como consecuencia, dislipidemia, al activar la fosforilación de la perilipina, una proteína específica de los adipocitos que recubre las gotas de lípidos en su superficie, formando una barrera que impide la hidrólisis de los triacilglicéridos. La perilipina funciona de manera óptima cuando su nivel de fosforilación es mínimo. Sin embargo, cuando al menos tres de las seis serinas en su sitio de consenso son fosforiladas por la PKA, su función se reduce, permitiendo que los triacilglicéridos sean expuestos a las lipasas para que estos sean hidrolizados, lo que resulta en la liberación de ácidos grasos y glicerol hacia la sangre y otros tejidos. Curiosamente los sensores de UPR activan la cinasa PKA, que a su vez fosforila la perilipina (Ramos-López et al., 2018).

El tratamiento con chaperonas como el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) mejora las alteraciones metabólicas con efectos tales como una mayor sensibilidad a la insulina en pacientes con obesidad (Kars et al., 2010).

En las células β pancreáticas, la activación de la UPR tiene dos finalidades distintas. En primer lugar, promueve una respuesta adaptativa que asegura la homeostasis y la supervivencia celular. En segundo lugar, puede inducir apoptosis y muerte celular. Para lograr el primer objetivo, es crucial que los sensores de la UPR funcionen correctamente. Por ejemplo, se ha observado que ATF6 contribuye a la proliferación de las células β en respuesta al aumento de la demanda de insulina (Li et al., 2020). Sin embargo, una UPR alterada está relacionada con la disfunción y muerte de las células β pancreáticas, así como el procesamiento incorrecto de la proinsulina, lo que puede dar lugar al desarrollo de diabetes tipo 2. Un ejemplo de esto es la falta de XBP1 en ratones, lo que compromete la función y supervivencia de las células β (Good& Stoffers, 2020).

En experimentos realizados in vitro con islotes humanos cultivados en condiciones de alta concentración de glucosa, así como en islotes de ratones db/db, se ha demostrado que la demanda de insulina promueve una proliferación descontrolada de células β y una síntesis acelerada de insulina, lo que activa la UPR. La UPR, a su vez, induce la activación de la cinasa JNK, que interfiere con la señal de la insulina. Ante esta situación, las células β pancreáticas aumentan la secreción de insulina como mecanismo de compensación, lo que resulta en la producción y acumulación de insulina con plegamiento defectuoso. Esto activa la UPR y desencadena una nueva inducción de JNK. Todo este proceso da lugar a un círculo vicioso que refuerza la muerte de las células β y contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2 (Rabhi et al., 2014).

1.2.2. Estrés del RE y disfunción endotelial

La disfunción endotelial es una condición caracterizada por el deterioro de la función de las células endoteliales que recubren la superficie interna de los vasos sanguíneos. Esta disfunción se manifiesta a través de alteraciones en la vasodilatación dependiente del endotelio, un aumento de la inflamación vascular, el estrés oxidativo y cambios en los factores derivados del endotelio, como la producción de NO y la expresión de endotelina-1 (ET-1). A menudo, está asociada con factores de riesgo cardiovascular subyacentes como la hipertensión, la diabetes mellitus, la dislipidemia y la obesidad. La disfunción endotelial desempeña un papel fundamental en la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis, la enfermedad coronaria, la hipertensión y la enfermedad vascular periférica. Sirve como un marcador crítico para evaluar la salud vascular y predecir el riesgo de eventos cardiovasculares (Maamoun et al., 2019a; Prieto et al., 2014).

La capa endotelial debido a su localización estratégica es una de las principales dianas en las alteraciones metabólicas, ya que se encuentra en contacto directo con concentraciones elevadas de glucosa, insulina y triglicéridos en sangre (Safiedeen et al., 2016).

Se ha demostrado que en pacientes que presentan síndrome metabólico existe una alteración de la vasodilatación mediada por NO que conduce a una disfunción endotelial además de una resistencia a la insulina, un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de moléculas proinflamatorias, así como un incremento de la producción de ROS (Safiedeen et al., 2016). En modelos de ratón ApoE^{-/-} con hiperglucemia inducida por estreptozotocina, la hiperglucemia favorece la sobreexpresión de marcadores de estrés del RE endoteliales en las paredes de la aorta antes de que se produzca cualquier cambio morfológico en la estructura vascular u organización celular. Además, el desarrollo acelerado de lesiones ateroscleróticas ocurre antes del inicio de la dislipidemia asociada a la diabetes, lo que sugiere que el estrés del RE ocurre en una etapa temprana de la diabetes (Khan et al., 2009b). Por otra parte, las LDLs oxidadas, mediante la producción de ROS, inducen una respuesta de estrés del RE en las células endoteliales humanas (Sanson et al., 2009).

Experimentos realizados en ratones tratados con Angiotensina II han demostrado que la UPR, específicamente las proteínas ATF4 y CHOP, se activa en la aorta y los vasos mesentéricos. Además, se observa que el estrés vascular y del RE conlleva una disminución en la NOS y una reducción en la capacidad de vasodilatación endotelial (Lenna et al., 2014; Santos et al., 2014).

Galán y colaboradores han demostrado que el tratamiento *in vivo* con tunicamicina conduce a una respuesta de estrés del RE que se asocia con disfunción endotelial vascular debido a la alteración en los mecanismos de relajación de la acetilcolina (Galán et al., 2014). Por el contrario, la inhibición *in vivo* del estrés del RE con TUDCA no solo mejora la neovascularización inducida por isquemia al aumentar las vías proangiogénicas (eNOS y señalización VEGFR2), sino que también normaliza los niveles de glucosa, insulina y colesterol en ratones diabéticos, lo que sugiere que la respuesta de estrés del RE contribuye a las complicaciones metabólicas en la diabetes (Amin et al., 2012). De manera coordinada, el estrés del RE, a través de la UPR, se combina con la activación de NF- κ B y TGF β ₁ (factor de crecimiento transformante β ₁), lo que también contribuye al daño vascular y a la disfunción endotelial (Young, 2017).

Otro vínculo entre la UPR y el daño vascular lo establecen las isoformas Nox2 y 4 (NADPH oxidasa 2 y 4), proteínas de señalización que participan en el estrés del RE. Esto ha sido demostrado con el tratamiento de Angiotensina II en células de músculo liso vascular, donde Nox4 interactúa con PDI. La interacción entre Nox4 y PDI es esencial para ensamblar y activar a las Nox. Las Nox4-PDI, además de generar ROS, alteran la homeostasis del RE, impidiendo la fosforilación y activación de Akt (proteína quinasa B), lo que evita la muerte celular (Santos et al., 2014).

Utilizando un marcador fluorescente de ROS dirigido al RE, se ha comprobado que Nox4 produce ROS en células endoteliales en respuesta a factores estresantes del RE, similares a los provocados por la tunicamicina (Laurindo et al., 2014).

1.2.2.1. Resistencia a la insulina, estrés del RE y disfunción endotelial

La disminución en la sensibilidad y los niveles circulantes de insulina afecta profundamente la función endotelial y contribuye en gran medida al desarrollo y progresión de las complicaciones micro y macrovasculares diabéticas (Maamoun et al., 2019a; Potenza et al., 2009). Estudios realizados por Okon y colaboradores (2005) mostraron que las arterias de pacientes diabéticos humanos tenían una reducción del 50% en los niveles de PKB fosforilada en comparación con los de sujetos sanos. Estos hallazgos estuvieron acompañados por una alteración de la vasodilatación mediada por el endotelio, que se correlacionó con una disminución en la producción de NO, así como una menor expresión y actividad de eNOS (Okon et al., 2005). Por otro lado, para demostrar el efecto de la resistencia a la insulina en la función endotelial, Duncan y colaboradores (Duncan et al., 2008) generaron ratones transgénicos que sobreexpresaban un receptor de insulina mutante específico del endotelio.

Estos ratones presentaron una disfunción endotelial severa y una producción de NO disminuida (Duncan et al., 2008; Maamoun et al., 2019a).

Özcan y colaboradores (Özcan et al., 2004) demostraron que los marcadores de estrés del RE estaban elevados en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) y en ratones genéticamente obesos. También se ha observado que el estrés del RE contribuye al deterioro de la vasodilatación controlada por insulina inducida por una dieta HFD, la cual se ve mejorada tras el tratamiento de los animales con TUDCA (Kim et al., 2015). Además, se mostró que la inducción del estrés del RE origina resistencia a la insulina al debilitar la señal de transducción de la insulina y prevenir la fosforilación de PKB (Maamoun et al., 2019a; Özcan et al., 2004).

Se han propuesto dos mecanismos celulares principales para vincular la respuesta al estrés del RE con la resistencia a la insulina. El primer mecanismo es a través de la activación de la rama IRE1 α de la vía de la respuesta al estrés del RE, que conduce a la activación de JNK. JNK activado induce la fosforilación de serina del sustrato del receptor de insulina (IRS-1), lo que resulta en su inhibición y, por lo tanto, la alteración de la cascada de señalización de la insulina (Andreozzi et al., 2007; Maamoun et al., 2019a). El segundo mecanismo es a través de la otra rama de la respuesta al estrés del RE, la vía PERK. ATF-4 activa la regulación transcripcional al alza de la proteína 3 similar a *tribbles* (TRB3), una quinasa inhibitoria de PKB, que en última instancia inhibe PKB y causa la alteración de la respuesta de señalización de la insulina (Maamoun et al., 2019a; Villalobos-Labra et al., 2019). Además, la activación del estrés del RE puede contribuir a la alteración de la señalización de la insulina a través de la acumulación de pro-insulina mal plegada y la supresión de la traducción de proteínas de PKB, lo que atenúa la liberación de insulina y su vía de señalización. Se observó que los ratones heterocigotos que expresaban eIF-2 α no fosforilable (Ser51 sustituido por una alanina) desarrollaban diabetes cuando se les alimentaba con una dieta alta en grasas y tenían una secreción de insulina severamente alterada y un tráfico defectuoso de pro-insulina que se acumulaba dentro del lumen del RE (Scheuner et al., 2005).

Tanto la diabetes tipo 1 como la diabetes tipo 2, a pesar de sus etiologías diferentes, están asociadas con un riesgo significativamente mayor de desarrollar aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Cimellaro et al., 2016; König et al., 2013). Lo que sugiere que la hiperglucemia tiene un papel causativo directo en el daño vascular, y específicamente en la disfunción endotelial (Fiorentino et al., 2013).

Se ha demostrado que la hiperglucemia causa disfunción endotelial promoviendo tanto el estrés oxidativo como el estrés del RE, y la evidencia experimental sugiere un vínculo bidireccional entre los dos mecanismos (Cimellaro et al., 2016; Fiorentino et al., 2013). El RE normalmente funciona bajo un ambiente oxidativo regulado que se altera en respuesta a la hiperglucemia debido a la acumulación de ROS que lleva al estrés del RE (Cimellaro et al., 2016; Malhotra & Kaufman, 2007).

Por otro lado, la NADPH oxidasa, la principal fuente de ROS en las células endoteliales, se activa al exponerse a altos niveles de glucosa y es capaz de causar disfunción endotelial tanto directamente, mediante el desacoplamiento de eNOS, como indirectamente, promoviendo una respuesta amplificada al estrés del RE (Cimellaro et al., 2016; Li et al., 2010). Además, la generación de ROS inducida por la hiperglucemia altera el equilibrio de los niveles de calcio intra-retículo endoplásmico y citosólico, provocando apoptosis mediada por estrés del RE y vías de muerte celular mitocondrial (Bishara & Ding, 2010; Cimellaro et al., 2016).

Se ha observado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tirosina quinasa representa un nuevo regulador ascendente del estrés del RE en las células endoteliales. La fosforilación del EGFR conduce a la activación de la vía PERK/eIFa2/ATF-4; por el contrario, la inhibición de la actividad quinasa del EGFR induce una mejora de la vasodilatación dependiente del endotelio y una reducción de la carga oxidativa en las arterias mesentéricas de ratones diabéticos (Cimellaro et al., 2016; Galán et al., 2012).

1.2.2.2. Estrés oxidativo, estrés del RE y disfunción endotelial

El estrés del RE está estrechamente asociado, en un círculo vicioso, con el estrés oxidativo, un importante contribuyente a la disfunción endotelial (Maamoun et al., 2019a, 2019b). El espacio cisternal del RE es altamente oxidante en comparación con el compartimento citosólico debido al alto nivel de glutatión reducido (GSH) para fomentar el establecimiento de enlaces disulfuro nativos entre las cadenas de proteínas recién sintetizadas (Maamoun et al., 2019a; van der Vlies et al., 2003). Cuando se produce el plegamiento de proteínas dentro del RE, la formación de enlaces disulfuro requiere la oxidación de proteínas recién traducidas bajo la acción de isomerasas. Errores en el emparejamiento adecuado de residuos de cisteína entre cadenas de polipéptidos generan enlaces disulfuro no nativos, lo que conduce a la acumulación de proteínas mal plegadas. Durante el proceso normal de plegamiento, los electrones se transfieren a través de moléculas de cisteína en las cadenas de polipéptidos en formación. Esta

transferencia de electrones de las cadenas al oxígeno para formar H_2O_2 está coordinada por la acción de isomerasas especializadas, la disulfuro isomerasa (PDI) y la RE oxidoreductasa (ERO)-1 α . En condiciones de alta demanda de síntesis de proteínas, como la obesidad y la diabetes, una formación abrumadora de enlaces disulfuro no nativos lleva a un consumo excesivo de GSH para neutralizar los ROS y proteger la célula. La disminución de las reservas de GSH en la célula conduce a un aumento del estrés oxidativo (Maamoun et al., 2019b, 2019a; van der Vlies et al., 2003).

Se ha demostrado que los ROS inactivan las isomerasas del RE contribuyendo, por lo tanto, a la acumulación de proteínas mal plegadas y sin plegar (Maamoun et al., 2019b; Tu & Weissman, 2004). El plegamiento de proteínas requiere ATP y, por lo tanto, la acumulación de proteínas mal plegadas o sin plegar estimula el uso de glucosa y activa la fosforilación oxidativa en las mitocondrias para generar más ATP con la producción subsiguiente de cantidades elevadas de ROS (Maamoun et al., 2019a).

El RE y las mitocondrias están interconectados física y fisiológicamente como orgánulos intracelulares. Durante la fase pro-supervivencia de la UPR, la relación entre el RE y las mitocondrias estimula la síntesis de ATP mediante el transporte de Ca^{2+} desde el RE hasta las mitocondrias a través de estructuras específicas llamadas membranas asociadas a las mitocondrias (MAMs). Bajo condiciones de estrés del RE, se ha demostrado que la mayor demanda de energía controla la composición y funciones de las MAMs (Carreras-Sureda et al., 2018; Maamoun et al., 2019a). Se ha observado que las células deficientes en PERK tenían menos MAMs y estaban asociadas con un transporte perturbado de Ca^{2+} desde el RE hasta las mitocondrias y una menor susceptibilidad a la apoptosis mediada por ROS (Kirkman et al., 2021). Tras la acumulación de proteínas mal plegadas dentro del lumen del RE, grandes cantidades de Ca^{2+} se filtran hacia las mitocondrias a través de las MAMs, lo que aumenta aún más la producción de ROS por la cadena de transporte de electrones mitocondrial, debido a la capacidad del Ca^{2+} para difundirse hacia la membrana interna de las mitocondrias y bloquear el complejo III, lo que eventualmente causa fugas de electrones y producción de radicales libres (Görlach et al., 2006; Hong et al., 2012; Maamoun et al., 2019b). El exceso de Ca^{2+} dentro de las mitocondrias conduce a una mayor producción de ROS, contribuyendo, por lo tanto, a la disfunción endotelial (Dong et al., 2017; Maamoun et al., 2019b). La pérdida de homeostasis de Ca^{2+} en el RE puede, a su vez, estimular más estrés del RE y estrés oxidativo, en un círculo vicioso, manteniendo, por lo tanto, la disfunción endotelial (Maamoun et al., 2019b, 2019a).

Se ha demostrado que las estrategias para aliviar el estrés oxidativo mejoran el estrés del RE y la disfunción endotelial *in vitro* e *in vivo*. como la administración de quercetina, un compuesto polifenólico antioxidante natural, a ratas diabéticas inyectadas con STZ (Maamoun et al., 2019a; Suganya et al., 2018).

1.2.2.3. Inflamación, estrés del RE y disfunción endotelial

En la pared vascular, la inflamación induce cambios en la permeabilidad que facilitan el movimiento de células inmunitarias hacia los tejidos, donde pueden llevar a cabo su acción en respuesta a diversas lesiones. Si los estímulos inflamatorios persisten, las células endoteliales experimentan filtraciones morfológicas e impedimentos funcionales, además de liberar más citoquinas proinflamatorias que alimentan este ciclo vicioso. Todos estos mecanismos predisponen a la iniciación y progresión de la aterosclerosis (Cimellaro et al., 2016; Tabas et al., 2015).

Cuando la respuesta UPR es incapaz de hacer frente a la sobrecarga proteica dentro del lumen, las vías de la apoptosis tanto intrínseca como extrínseca son estimuladas (Maamoun et al., 2019b). Se activan entonces a través del estrés del RE varios mecanismos involucrados en la muerte celular: I) La inducción del factor de transcripción proapoptótico CHOP a partir de la vía PERK/eIF-2 α ; II) El factor IRE1 α activa TRAF2 que a su vez activa estimula la cascada de señalización ASK-1/JNK y III) Bax y Bcl2 provocan la depleción de calcio de los almacenes del RE. De todos ellos CHOP se ha identificado como el mayor mediador de la apoptosis en condiciones de estrés del RE (Maamoun et al., 2019a; Oyadomari et al., 2002).

Entre las diferentes funciones de CHOP se encuentra la de activar los siguientes factores proapoptóticos: el dominio de muerte por arresto del crecimiento 34 (GADD34), DR5 (Receptor TRAIL-2, un receptor de muerte celular que activa caspasas), y ERO-1 α , que hiperoxida el RE, exacerbando así la condición de estrés a un estado irresoluble que promueve la muerte celular. ERO-1 α , al activar el receptor de inositol trifosfato (IP₃R), puede causar un exceso de transporte de Ca²⁺ desde las reservas de RE hacia el espacio mitocondrial, lo que puede resultar en apoptosis (G. Li et al., 2009; Maamoun et al., 2019a). La activación de la fosfatasa GADD34 por CHOP va a provocar la defosforilación de eIF-2 α , lo que conlleva a la reactivación del proceso de traducción de proteínas (Maamoun et al., 2019a; Novoa et al., 2001). La reactivación de la traducción de proteínas contribuirá, por lo tanto, a la acumulación adicional de proteínas mal plegadas y desplegadas dentro del lumen del RE, al tiempo que permite selectiva y específicamente la traducción de ARNm que codifican moléculas proapoptóticas.

CHOP, también es capaz de inducir la muerte celular mediante la inhibición directa de la molécula antiapoptótica Bcl-2 (Maamoun et al., 2019a; McCullough et al., 2001), y la sobreexpresión de la molécula proapoptótica Bim (Maamoun et al., 2019a; Puthalakath et al., 2007), permitiendo así la liberación mitocondrial de citocromo c en el citoplasma, desencadenando, por lo tanto, una cascada de reacción apoptótica intrínseca. Otros mecanismos apoptóticos activados por estrés del RE pueden incluir la función quinasa intrínseca de IRE1 α , que puede fosforilar y, por lo tanto, activar ASK-1, p38 MAPK y JNK; p38 MAPK también puede activar CHOP mediante la fosforilación de su dominio de transactivación (Maamoun et al., 2019b; Wang & Ron, 1996). Además, tanto p38 MAPK como JNK son conocidos por fosforilar y, por lo tanto, activar Bim e inhibir Bcl-2 promoviendo la apoptosis (Kim et al., 2006; Maamoun et al., 2019a).

Así como se ha observado la importancia de CHOP en el proceso de apoptosis, de los tres efectores de la UPR, IRE1 α parece ser el que mayor predominancia presenta de los tres en la regulación de las señales proinflamatorias (Maamoun et al., 2019a). Esto se debe principalmente a la activación de factores de transcripción como NF- κ B y el activador de la proteína-1 (AP-1) (Maamoun et al., 2019a; Verfaillie et al., 2013). NF- κ B es un mediador central de las señales proinflamatorias y puede ser activado por las tres ramas de la UPR a través de diferentes rutas. Pero solamente IRE1 α es capaz de activar AP-1, factor de transcripción que participa en la regulación de los genes de la respuesta inflamatoria, a través de la vía TRAF2/JNK. Los genes que son transcripcionalmente regulados por AP-1 incluyen: TNF- α , KGF (el factor de crecimiento de queratinocitos), IL-8 y algunos receptores de citoquinas (Angel et al., 2001; Maamoun et al., 2019a). Además, la UPR puede activar una respuesta inflamatoria conocida como respuesta de fase aguda (APR) que depende de un equilibrio entre la señalización intercelular paracrina y/o autocrina, que comprende la respuesta inflamatoria temprana y las reacciones que le siguen inmediatamente (Baumann & Gauldie, 1994; Maamoun et al., 2019a; Verfaillie et al., 2013). En la mayoría de las células es ATF-6 el que se encarga de activar la cascada de señalización que desemboca en APR (Maamoun et al., 2019a; Zhang & Kaufman, 2008).

En los últimos años, el RE ha ganado relevancia como un mediador clave de la inflamación subyacente a las enfermedades cardiovasculares (Cimellaro et al., 2016; Hotamisligil, 2010a, 2010b).

Se ha demostrado que la activación del receptor de tipo Toll (TLR), un efector de la inmunidad innata, puede estimular a IRE-1 y este a su vez a XBP-1, que es crucial para la producción de citoquinas proinflamatorias en células endoteliales (Gargalovic et

al., 2006a). XBP-1 también es importante para la diferenciación de linfocitos B, un paso crítico para iniciar la respuesta inflamatoria en la pared vascular (Cimellaro et al., 2016; Iwakoshi et al., 2003). Además, diversos estudios han demostrado que los TLRs, especialmente la isoforma 4, median la activación del estrés del RE inducido por ácidos grasos saturados, dificultando la respuesta vasodilatadora a la insulina en células endoteliales aórticas humanas (Cimellaro et al., 2016; Kim et al., 2015).

El estrés crónico del RE conduce a una acumulación tóxica de ROS dentro de las células, causada por la regulación al alza de enzimas involucradas en la formación de enlaces disulfuro. Estas enzimas suelen facilitar reacciones redox en el lumen del RE, pero su función se ve afectada durante el estrés del RE. La acumulación subsiguiente de ROS desencadena un programa apoptótico mediado por PERK, que implica al Nfr2, con el objetivo de neutralizar especies tóxicas (Cimellaro et al., 2016; Cullinan & Diehl, 2006; Haynes et al., 2004).

Además de sus efectos inmediatos sobre la función vascular, la inflamación inducida por estrés del RE también ha sido implicada en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. La carga de macrófagos con colesterol libre en las membranas del RE de las células endoteliales activa las vías JNK y NFkB a través de PERK e IRE1 α , haciendo que la lesión sea vulnerable a la ruptura (Cimellaro et al., 2016; Li et al., 2005).

A nivel celular el tratamiento con tunicamicina en células humanas endoteliales de aorta induce una secreción de las citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y la quimiocina CXC motivo ligando 3 (CXCL3) los cuales juega un papel clave durante la aterogénesis (Gargalovic et al., 2006b).

1.3. MITOCONDRIA Y DISFUNCIÓN VASCULAR

La mitocondria es un orgánulo celular con un tamaño aproximado de $0,75-3 \mu\text{m}^2$ que se encuentra en el citoplasma de las células eucariotas (con algunas excepciones como los eritrocitos maduros). Su función principal entre otras es la de la síntesis de energía en forma de ATP para la correcta actividad de la célula. Está compuesta por una membrana mitocondrial externa (MME) y una membrana mitocondrial interna (MMI) separadas por un espacio intermembranoso entre $60-80 \text{ \AA}$. La MME tiene un grosor entre $60-70 \text{ \AA}$ y es permeable a pequeñas moléculas como sales, nucleótidos de adenina y nicotinamida, azúcares y coenzimas. Además, contiene porinas que son proteínas que permiten el flujo de iones dentro y fuera de la célula (Rossmann et al., 2021; Xian & Liou, 2021).

A nivel de la mitocondria se localizan enzimas que participan en el proceso de elongación de ácidos grasos como la acil CoA-sintetasa o la oxidación de la molécula de adrenalina mediante la monoamino oxidasa (Midzak & Papadopoulos, 2016). También podemos encontrar enzimas que participan en los procesos de fusión/fisión mitocondriales como es el caso de las mitofusinas (Mtf 1 y Mtf2) (Gupta & Becker, 2021).

La MMI está dispuesta formando una serie de pliegues que se conocen como crestas mitocondriales con el objetivo de incrementar la superficie disponible para la producción de ATP, ya que embebidas en estos pliegues se van a encontrar las proteínas que conforman los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC) a través de la cual se produce el flujo de electrones necesario para la síntesis de ATP. La MMI es permeable a pequeñas moléculas neutras como agua, oxígeno y CO_2 . Sin embargo, la permeabilidad de moléculas cargadas como protones o aniones es limitada.

El espacio que contiene la MMI se conoce como matriz mitocondrial, que es más viscosa y rica en proteínas, enzimas y ácidos grasos. En la matriz encontramos las enzimas que participan en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), la β -oxidación de ácidos grasos y toda la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

La función principal de la mitocondria es suministrar energía para la actividad de la célula y este proceso tiene lugar a través de la respiración aeróbica. La respiración aeróbica es el proceso por el cual a partir de una molécula de glucosa se genera una molécula de piruvato, por medio de una serie de reacciones que conllevan la síntesis de ATP. Una vez formada la molécula de piruvato, esta entra en la mitocondria. Y en la matriz mitocondrial va a reaccionar con el oxalacetato produciendo ácido cítrico. Esta

serie de reacciones entran dentro de lo que se conoce como el ciclo de los TCA. Los dos productos de este ciclo son el NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) y el FADH₂ (Flavín Adenina Dinucleótido) que van a actuar como moléculas transportadoras de electrones (Demirel, 2002). En la ETC, NADH y FADH₂ son oxidados a NAD⁺ y FAD⁺, mientras que las proteínas de la ETC son reducidas. Para volver a su estado basal, las proteínas reducidas de la ETC donan los electrones al siguiente transportador de electrones hasta llegar a la molécula de oxígeno que es el aceptor final de electrones. Durante esta transferencia de electrones, las proteínas en el espacio intermembranoso generan un gradiente de protones que constituye el potencial electroquímico (Demirel, 2002; Osellame et al., 2012; Sánchez-Gómez et al., 2015). Los complejos que forman la cadena de electrones mitocondrial son los siguientes:

Complejo I: NADH-Coenzima Q oxidorreductasa (ubiquinona oxidorreductasa)

Es el punto de entrada de los electrones en la cadena respiratoria. Es la enzima más grande compuesta por 45 subunidades. La enzima está formada por dos dominios principales, un brazo hidrofílico que sobresale en la matriz mitocondrial y un brazo hidrofóbico que se encuentra embebido en la IMM. El brazo hidrofílico transfiere los electrones desde el NADH al Coenzima Q (CoQ), a través de moléculas como el Flavin Mononucleótido (FMN) y varios grupos Fe-S, mientras tanto el brazo hidrofóbico de la membrana es el encargado de transportar los protones generados al espacio intermembranoso (Protasoni et al., 2020; Zhao et al., 2019).

Complejo II: Succinato-Coenzima Q oxidorreductasa

Está compuesto por 4 subunidades. Las subunidades hidrofílicas más largas, SDHA y SDHB, se encuentran orientadas hacia la matriz y contienen los grupos redox activos FADH₂ y tres grupos Fe-S. Las subunidades más pequeñas SDHC y SHD se encuentran ancladas a la membrana y contienen dos sitios de unión al CoQ. Participa tanto en la ETC como en el TCA, oxidando una molécula de succinato en fumarato transfiriendo los electrones al CoQ (Protasoni et al., 2020; Zhao et al., 2019).

Complejo III: Citocromo bc1 oxidorreductasa

Acepta los electrones que provienen del CoQ reducido del complejo II, y los dona uno por uno, al citocromo c. Este proceso tiene lugar mediante una serie de subunidades catalíticas como son el citocromo b, que contiene dos sitios de unión al CoQ y dos grupos hemo b, UQCRFS1 (la proteína Fe-S de Rieske) y CYC1, que contiene un grupo hemo c como grupo prostético. (Protasoni et al., 2020; Zhao et al., 2019).

Complejo IV: Citocromo c oxidasa

Transfiere los electrones desde el citocromo c hasta el aceptor final de la ETC, el O_2 para generar H_2O . Está formado por 13 subunidades diferentes que contiene cuatro grupos redox activos, los cuales son: Cu_A , un grupo hemo a (Fe_a) y un centro binuclear compuesto del grupo hemo a_3 (Fe_{a_3}) y Cu_B . La subunidad I contiene tres de los cuatro cofactores, el grupo hemo a y el centro binuclear, los cuales transfieren los electrones desde el grupo hemo al O_2 . Las subunidades II y III, se encuentran localizadas a ambos lados de la subunidad, de tal forma que quedan los dos Cu_A del complejo II orientados hacia el espacio intermembranoso. La subunidad III estabiliza las otras dos y participa en la translocación de protones al espacio intermembranoso (Protasoni et al., 2020; Zhao et al., 2019).

El citocromo c al igual que la coenzima Q, funciona como un transportador de electrones móvil, capaz de desplazarse por la MMI, ya que se encuentra unido a ella mediante interacciones electrostáticas. Una vez es reducido el citocromo c, este se desplaza e interacciona con la subunidad II del complejo IV mediante interacciones electrostáticas, y transmite los electrones al grupo Cu_A , y de aquí los electrones serán transferidos del grupo hemo al centro binuclear de la subunidad I, donde el O_2 es reducido a H_2O . En total son transferidos 4 electrones y translocados 8 protones, de los cuales la mitad serán utilizados para formar dos moléculas de agua (Protasoni et al., 2020; Zhao et al., 2019).

Complejo V: F_1 - F_0 ATP sintetasa

Se encuentra constituido por dos dominios funcionales F_0 y F_1 . El dominio F_0 se localiza en la MMI. Este dominio está formado por una subunidad c en anillo, que incluye las subunidades a,b,d, F6 y la proteína sensible a oligomicina (OSCP), así como las subunidades accesorias e,f,g y A6L. Las subunidades b,d, F6 y OSCP forman el tallo periférico. El dominio F_1 está situado en la matriz mitocondrial y consiste en las siguientes subunidades solubles: 3 subunidades α , 3 β , y una subunidad γ,δ,ϵ (una de cada). Las 3 subunidades α y las 3 β constituyen el centro catalítico del dominio F_1 , y las subunidades γ,δ,ϵ forman el tallo central que conecta F_1 con la subunidad c en anillo de F_0 (Protasoni et al., 2020; Zhao et al., 2019).

Es en este complejo donde los protones que han sido translocados en los pasos previos hacia el espacio intermembranoso vuelven a la matriz mitocondrial a través de F_0 , que transfiere la energía almacenada originada por el gradiente electroquímico de protones a F_1 , provocando un cambio conformacional en la F_1F_0 ATP sintasa de forma

que el ADP pueda ser fosforilado para formar la molécula de ATP (Protasoni et al., 2020; Zhao et al., 2019).

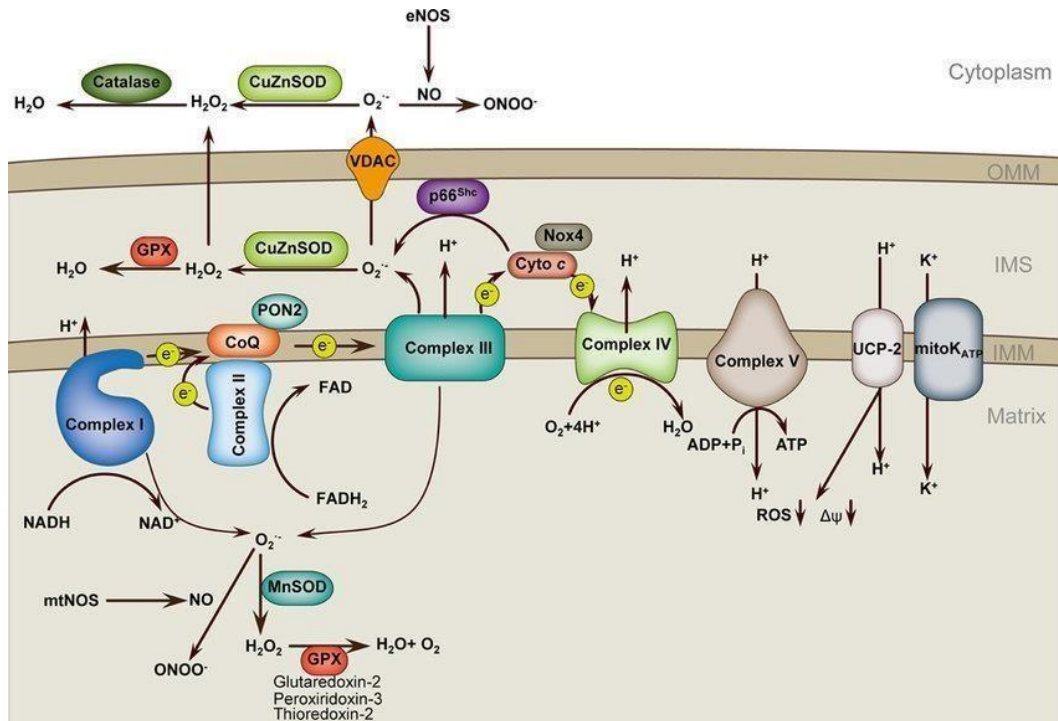


Figura 4. Cadena de electrones mitocondrial y formación de ROS. Los complejos de la cadena respiratoria I-IV generan el gradiente de protones sobre la membrana interna mitocondrial que impulsa la generación de ATP por la ATP sintasa (complejo V). Los electrones (e⁻) de NADH y FADH₂ pasan a través del complejo I y del complejo II, respectivamente, y luego al complejo III a través de la coenzima ubiquinol (CoQ). El citocromo c transfiere electrones del complejo III al complejo IV, que reduce el O₂ para formar H₂O. El flujo de electrones está acompañado por la transferencia de H⁺ a través de la IMM en los complejos I, III y IV, creando un gradiente electroquímico, $\Delta\psi_m$. Los protones reingresan a la matriz mitocondrial a través del complejo V, que utiliza la fuerza motriz de protones para generar ATP. Las UCPs y los mitoK_{ATP} permiten que los protones regresen a la matriz, reduciendo la formación de ROS. El complejo I filtra electrones para generar O₂^{•-} hacia la matriz, mientras que el complejo III genera O₂^{•-} tanto hacia la matriz como hacia el espacio intermembranoso (IMS). El superóxido es dismutado a H₂O₂ por CuZnSOD en IMS y por MnSOD en la matriz. El H₂O₂ se reduce a H₂O por la glutación peroxidasa (GPX) utilizando GSH, y la glutación oxidada resultante (GSSG) se reduce nuevamente a GSH por la glutación reductasa. O₂^{•-} puede interactuar con NO para formar ONOO[•], que puede cooperar con O₂ para desacoplar la eNOS y amplificar la producción de ROS. Tomado de Tang et al., 2014.

1.3.1. Mitocondria y función vascular

Tradicionalmente la mitocondria es reconocida como el orgánulo encargado de producir ATP para abastecer las demandas energéticas de la célula. En aquellas células que dependen mayormente de la fosforilación oxidativa tales como las fibras de músculo esquelético o cardiomiocitos para atender sus necesidades energéticas, las mitocondrias componen el 15 y hasta un 35% del volumen celular (Hom & Sheu, 2009;

Kirkman et al., 2021; Larsen et al., 2012). En comparación, las células endoteliales dependen principalmente de la glucólisis anaeróbica para el aporte de ATP y la mitocondria compone el 5% del volumen citoplásmico de las células vasculares en la mayoría de los lechos vasculares (Culic et al., 1997; Kirkman et al., 2021; Oldendorf et al., 1977). Por ello, hasta hace relativamente poco tiempo el papel de las mitocondrias en estas células se había pasado por alto. Sin embargo, ahora se sabe que juegan un papel clave en la señalización celular sobre todo por su capacidad de generar ROS y su papel en la homeostasis del calcio (Kirkman et al., 2021; Quintero et al., 2006).

La localización de la mitocondria dentro de las células varía según la señalización requerida y su respectivo lecho vascular. Por ejemplo, en las células endoteliales de las arterias pulmonares donde es necesaria la detección de O₂, las mitocondrias se localizan alrededor del núcleo lo que permite la regulación transcripcional inducida por la hipoxia (Al-Mehdi et al., 2012; Kirkman et al., 2021). Por otra parte, en las arterias coronarias, las mitocondrias endoteliales se encuentran ancladas (Kirkman et al., 2021; Park et al., 2014) al citoesqueleto con el fin de iniciar la señalización dilatadora en respuesta al estímulo mecánico del *shear stress* (Liu et al., 2008).

En las células musculares lisas, el número de mitocondrias es también reducido en comparación con el contenido en músculo esquelético y cardiomiocitos, aunque no tanto como en las células endoteliales vasculares (Kirkman et al., 2021; Park et al., 2014). La producción energética en estas células es requerida para el control del tono miogénico, el transporte celular y las funciones secretoras que participan en el mantenimiento de la integridad estructural de la pared vascular (Chiong et al., 2014; Kirkman et al., 2021; Ungvari et al., 2008). En comparación con los cardiomiocitos y las fibras esqueléticas, las células musculares lisas tienen incrementada la fuga de protones durante la respiración aeróbica (Kirkman et al., 2021; Park et al., 2014). Normalmente, un incremento en la fuga de protones durante la respiración anaeróbica se encuentra asociada con un incremento de la producción de ROS (Kirkman et al., 2021; Park et al., 2014), esto es indicativo de funciones de señalización celular de las mitocondrias mediadas por ROS. En las células musculares lisas las mitocondrias se encuentran inmóviles y localizadas cerca del retículo endoplásmico (Dai et al., 2005; Kirkman et al., 2021) lo que permite el acoplamiento mitocondria - RE necesario para la homeostasis del Ca²⁺.

La calidad, contenido y morfología mitocondrial se encuentran regulados y coordinados por procesos de control de calidad mitocondrial incluyendo la biogénesis mitocondrial, la fisión o fusión mitocondrial y la mitofagia. Un desequilibrio en estos

procesos debido al incremento de la edad, enfermedades relacionadas inician procesos de senescencia y apoptosis (Kirkman et al., 2021; Kluge et al., 2013).

Procesos mitocondriales como la despolarización o la liberación de ROS inician una serie de mecanismos que protegen el endotelio y las neuronas del daño letal que provocan eventos como el estrés celular, así como son capaces de promover cambios en el tono vascular cerebral (Busija et al., 2016). La despolarización mitocondrial en el músculo liso vascular a través de la activación farmacológica de los canales mitoK_{ATP} conduce a la vasodilatación a través de la generación de corrientes *sparks* de calcio desde el RE y sus consecuentes mecanismos de señalización. Las relajaciones del músculo liso también se pueden alcanzar de forma indirecta a través de las acciones del NO y otros agentes vasoactivos producidos por el endotelio y los nervios perivasculares seguidos de la activación mitocondrial. Lo que sugiere una conexión entre ratio metabólico y el flujo sanguíneo (Busija et al., 2016). Jaggar y colaboradores (Cheranov & Jaggar, 2004; Xi et al., 2005a) fueron los primeros en demostrar como la despolarización mitocondrial a través del diazóxido (Dzx) promueve la relajación de células de músculo liso vascular en arterias cerebrales sin endotelio. El tratamiento con Dzx incrementaba la producción de ROS en la mitocondria, que secuencialmente provocaba la activación de los canales de rianodina del RE y por tanto la generación de corrientes *sparks* de calcio que produce la apertura de los canales BK_{Ca} adyacentes que conlleva la salida de K⁺ de la célula lo que conduce a una hiperpolarización y disminución de las concentraciones intracelulares de calcio, y por tanto la relajación del músculo liso vascular (Busija et al., 2016).

En experimentos realizados por Katakam y colaboradores (2014) se han descrito mecanismos similares a los del Dzx con el compuesto BMS191095 en arterias cerebrales, pero sin la participación de los ROS. La despolarización mitocondrial de BMS191095 incrementa la actividad de las corrientes *sparks* de calcio en el VSM, la apertura de los canales BK_{Ca} adyacentes y la relajación de las arterias cerebrales sin endotelio, así como en aquellas que si presentaron endotelio. La razón por la razón por la cual el BMS consigue este efecto no está del todo clara. (Busija et al., 2016).

1.3.1.1. Bioenergética mitocondrial y especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales

La mitocondria es el orgánulo celular que más oxígeno consume, así como el que mayor cantidad de ATP genera (Busija et al., 2016; McBride et al., 2006; Rutkai et al., 2014). La tasa de consumo máximo de oxígeno mitocondrial se correlaciona

positivamente con la masa proteica mitocondrial, aunque esta relación puede variar en función del tamaño y del estatus de la mitocondria. A su vez, se ha visto el flujo sanguíneo cerebral se encuentra directamente relacionado con el consumo de oxígeno (Armstead et al., 1992; Busija et al., 2016, 1988; Busija & Leffler, 1987).

Además de la producción de ATP, las mitocondrias son productores constantes de ROS a través de la ETC (Armstead et al., 1992; Busija et al., 1988; Busija & Leffler, 1987). En células sanas estos ROS participan en mecanismos de señalización que contribuyen al mantenimiento de las funciones celulares basales. Por ejemplo, el anión superóxido se produce en los complejos respiratorios en la matriz mitocondrial y es capaz de salir de ella (Busija et al., 2016; Han et al., 2003, 2001; Lu et al., 2008) tras una conversión enzimática por la MnSOD a H_2O_2 y por los canales tipo acuaporina en la MMI (Bienert et al., 2007; Busija et al., 2016; Calamita et al., 2005; Lustgarten et al., 2012). La MnSOD, la cual tiene una alta capacidad para convertir el anión superóxido en H_2O_2 y agua, por lo que este anión es rápidamente eliminado en cuanto se forma en la matriz (Busija et al., 2016). El H_2O_2 en el espacio intermembranoso, o el anión superóxido directamente liberado al espacio intermembranoso por el complejo III en ciertas condiciones, puede atravesar la MME a través de los canales VDACs y llegar al citosol (Brown et al., 2007; Busija et al., 2016; Han et al., 2003; Muller et al., 2004).

Cuando el *shear stress* tiene lugar, se produce también una distorsión física entre las dos membranas mitocondriales en las células endoteliales de la pared vascular que conlleva el aumento de la producción y la liberación de ROS por las mitocondrias, lo que en el caso de las arterias coronarias provoca la dilatación a través de un mecanismo basado en el H_2O_2 (Busija et al., 2016; Widlansky & Gutterman, 2011a; Zhang & Gutterman, 2007). Hallazgos recientes señalan que las proteínas cinasas en el espacio intermembranoso son dianas de los ROS generados en la mitocondria y estas pueden iniciar un mecanismo de señalización en la mitocondria e incluso a su vez en el citosol (Busija & Leffler, 1987; Patterson et al., 2015).

Aunque la liberación continua de ROS desde la mitocondria parece tener un papel fundamental en el mantenimiento de las funciones celulares, niveles elevados y transitorios de ROS pueden promover la síntesis de determinadas proteínas, así como cambios en el tono vascular. Sin embargo, estos incrementos de ROS de forma crónica pueden conducir a una disfunción celular. En el caso de las células endoteliales esto lleva a una disminución de la biodisponibilidad del NO (Kirkman et al., 2021; Kluge et al., 2013; Quintero et al., 2006) a través de mecanismos que incluyen la reacción de O_2^- con NO para formar $ONOO^-$ (Li & Shah, 2003, 2002) que además de contribuir al estrés

oxidativo es capaz de desacoplar a la eNOS (Cassuto et al., 2014; Kirkman et al., 2021), ya que el $O_2^{\cdot-}$ es capaz de oxidar a la tetrahidrobiopterina (BH_4) un cofactor esencial para el correcto funcionamiento de la eNOS a BH_2 , lo que conlleva al desacoplamiento de la enzima produciendo más $O_2^{\cdot-}$. (Kirkman et al., 2021; Schulz et al., 2008). Por otra parte, en el síndrome metabólico, existe un incremento crónico de la producción de ROS que altera la función vascular regulada por los canales de mitoK_{ATP} mitocondriales (Bariet et al., 1997, 1996; Busija et al., 2016; Erdős et al., 2006, 2004a, 2004b; Katakam et al., 2007). Asimismo, se ha visto que los ROS mitocondriales promueven un exceso de inflamación que también contribuye a la disfunción endotelial y al estrechamiento de los vasos arteriales (Della Corte et al., 2016; Kirkman et al., 2021; Mozos et al., 2017; Park & Lakatta, 2012). Además, se ha comprobado que el tratamiento con antioxidantes mitocondriales mejora la función vascular en ensayos preclínicos (Dikalov et al., 2014; Gioscia-Ryan et al., 2014; Kirkman et al., 2021), así como en ensayos con pacientes (Kirkman et al., 2021, 2018; Kizhakekuttu et al., 2012; S. H. Park et al., 2020; S.-Y. Park et al., 2020; Rossman et al., 2018).

Estudios recientes han señalado que la producción mitocondrial de ROS puede promover la producción de ROS a nivel extramitocondrial por el sistema NADPH oxidasa, o viceversa, en un *feedback* positivo (Busija et al., 2016; Chalmers et al., 2015; Dikalov et al., 2014; Fukai & Ushio-Fukai, 2020; Sheldon & San Martín, 2015; Springo et al., 2015). Por tanto, el diálogo entre la mitocondria y la NADPH oxidasa citosólica conduce al daño celular debido a una excesiva producción de ROS por un mecanismo de ROS inducido por ROS. Las mitocondrias localizadas cerca de la superficie de membrana plasmática parecen mediar este tipo de respuesta (Chaplin et al., 2015). El mejor ejemplo en el que se da este tipo de interacciones ocurre en la exposición de células tanto vasculares como no vasculares a la angiotensina II (Busija et al., 2016; Chalmers et al., 2015; Chaplin et al., 2015; Dikalov et al., 2014; Dikalov & Ungvari, 2013; Fukai & Ushio-Fukai, 2020; Sheldon & San Martín, 2015) que es capaz de incrementar los niveles mitocondriales de H_2O_2 y al utilizar el inhibidor inespecífico de la Nox, apocinina, estos niveles disminuyeron significativamente. Además, el silenciamiento de la subunidad p22^{phox} de la Nox con RNA pequeño de interferencia inhibe también la producción de ROS mitocondriales ocasionados por la angiotensina II, lo que indica un papel relevante de la Nox a la hora de producir ROS mitocondriales (Doughan et al., 2008; Kirkman et al., 2021). Además, la angiotensina II no tiene ningún efecto en mitocondrias aisladas sobre la producción de ROS (Dikalov et al., 2014; Kirkman et al., 2021).

El incremento de radicales libres como el ONOO⁻ es capaz de inactivar el antioxidante mitocondrial SOD (sobre todo SOD2) a través de un proceso de nitrosilación, esta reacción es muy común en procesos relacionados con el envejecimiento (Kirkman et al., 2021; van der Loo et al., 2000) La hipertensión puede provocar un incremento en el estrés mediado por la producción de ROS mitocondriales en la vasculatura cerebral (Busija et al., 2016; Dikalov & Ungvari, 2013). La edad es un factor clave que puede exacerbar la presión arterial en la vasculatura cerebral por mecanismos dependientes de ROS mitocondriales (Busija et al., 2016; Dai et al., 2012; Springo et al., 2015).

1.3.1.2. Potencial de membrana mitocondrial, despolarización de la mitocondria y canales de potasio mitocondriales (mitoK_{ATP})

Tanto la hiperpolarización como la despolarización mitocondrial han sido asociadas con la producción de ROS, aunque probablemente esto dependa de los agentes farmacológicos y los sustratos usados, así como del ambiente redox en la mitocondria (Daiber, 2010; Dikalov et al., 2014; Doughan et al., 2008; Katakam et al., 2013; Kirkman et al., 2021; Kizhakekuttu et al., 2012). Por ejemplo, como se ha mencionado anteriormente, tanto el BMS191095 como el Dzx, abridores de canales mitoK_{ATP}, son capaces de disminuir el potencial de membrana mitocondrial en la vasculatura cerebral (Katakam et al., 2013; Kirkman et al., 2021). Sin embargo, solamente el Dzx y no el BMS191095 es capaz de incrementar la producción de ROS en la mitocondria (Katakam et al., 2013; Kirkman et al., 2021).

El tratamiento con 5-hidroxicanoato (5-HD) bloqueante específico de los canales mitoK_{ATP} y con el bloqueante de canales mitoK_{ATP} glibenclamida evita la despolarización mitocondrial causada por la angiotensina II y la consecuente producción de ROS mitocondriales (Doughan et al., 2008; Kirkman et al., 2021). Se cree, por tanto, que los ROS citoplasmáticos son capaces de activar los canales mitoK_{ATP} y despolarizar la mitocondria, lo que resulta en la liberación de ROS mitocondriales por los complejos respiratorios o a través de la formación mPTP (poro de transición de la permeabilidad mitocondrial). La liberación de ROS mitocondriales activa a su vez a la Nox a través de la proteína cinasa C, lo que conduce a un incremento de la producción de O₂⁻ y una reducción de la biodisponibilidad de NO (Kirkman et al., 2021).

Canales de potasio mitocondriales sensibles a ATP (mitoK_{ATP})

Los canales K_{ATP} actúan como sensores del metabolismo celular. En la membrana plasmática se encuentran ligados a la excitabilidad celular y a la disponibilidad energética. A su vez, existen canales mediadores de las corrientes de potasio sensibles a ATP a nivel mitocondrial (mitoK_{ATP}) que actúan regulando el volumen y función de la mitocondria. Descritos por primera vez en cardiomiocitos en 1983 (Noma, 1983) e identificados también por primera vez en 1991 en mitocondrias de hígado de rata (Inoue et al., 1991), en las que se describió un canal selectivo para iones K⁺ que era bloqueado por ATP con un IC₅₀ de 800 μM.

La apertura de estos canales permite la entrada de potasio desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial, provocando la despolarización mitocondrial. Se ha demostrado en neuronas corticales primarias aisladas de rata, que la despolarización mitocondrial favorece la activación de la enzima NOS y en consecuencia la producción de NO (Katakam et al., 2016) Cuando el potasio entra en la mitocondria es acompañado de forma osmótica por agua que resulta en el incremento de volumen de este orgánulo (Garlid & Paucek, 2001).

Los canales mitoK_{ATP} se encuentran inhibidos por ATP en una forma dependiente de Mg²⁺ (Bednarczyk et al., 2005; Paucek et al., 1992; Pereira & Kowaltowski, 2021a). Presentan muchas características similares a los canales K_{ATP} de la membrana plasmática incluyendo la inhibición por sulfonilureas (Paucek et al., 1992; Pereira & Kowaltowski, 2021a; Szewczyk et al., 1993). Sin embargo, su regulación no es idéntica, ya que los mitoK_{ATP} (y no los plasmK_{ATP}) son activados por GTP y por GDP, e inhibidos por ADP y ésteres de Acil CoA de cadena larga (Paucek et al., 1996; Pereira & Kowaltowski, 2021a). Esto significa que mitoK_{ATP} a diferencia de plasmK_{ATP} no se encuentran regulados directamente por el ratio ADP/ATP. Ya que la afinidad del canal por el ATP es mucho mayor que las concentraciones celulares y que su inhibición también se produce por el ADP, la regulación de este canal *in vivo* depende de los niveles de guanilnucleótidos y ésteres de Acil-CoA de cadena larga (Paucek et al., 1996; Pereira & Kowaltowski, 2021a), así como oxidantes y antioxidantes (Facundo et al., 2007; Pereira & Kowaltowski, 2021a).

Estructuralmente, por lo que se sabe gracias a estudios de reconstrucción, el canal mitoK_{ATP} está formado por dos subunidades. La primera es la subunidad formadora del poro de potasio nombrada como MitoKIR, y la segunda es una subunidad que presenta un sitio de unión a ATP así como a moduladores farmacológicos como las

sulfonilureas, esta subunidad se denomina MitoSUR (Bajgar et al., 2001; Garlid et al., 1996; Mironova et al., 1999; Paucek et al., 1992; Pereira & Kowaltowski, 2021a). Los genes que codifican ambas subunidades se denominan MITOK y MITOSUR, respectivamente (Pereira & Kowaltowski, 2021a). Se ha demostrado que una sobreexpresión de MITOK desencadena una inflamación y posterior fragmentación mitocondrial, así como una ablación genética provocando la inestabilidad del potencial de membrana, separando el espacio entre las crestas y disminuyendo la fosforilación oxidativa. A su vez, la pérdida de MitoKIR elimina la cardioprotección farmacológica provocada por Dzx (Paggio et al., 2019). La subunidad MitoKIR está codificada por el gen CCDC51. Esta subunidad se encuentra localizada en la MMI con los extremos N- y C- terminal orientados hacia la matriz. Posee dos isoformas: la isoforma 1, la cual muestra mayor expresión en tejido humano y la isoforma 2 apenas detectable (Paggio et al., 2019). La pérdida de MITOK aumenta la producción de ROS. Los canales mitoK_{ATP} modulan la adaptación mitocondrial al stress celular a través de la regulación del volumen de la matriz (Paggio et al., 2019).

Las consecuencias de la activación de canales mitoK_{ATP} son diferentes a las consecuencias que se producen tras la activación de los canales K_{ATP} del plasmalema. La matriz mitocondrial tiene un potencial de membrana negativo y la apertura de los canales de potasio permite la entrada de potasio haciendo que el potencial sea menos negativo y por tanto despolarizando la matriz mitocondrial. Al contrario que los canales plasmK_{ATP} cuya apertura permite la salida de K⁺ hacia el espacio extracelular haciendo que el potencial del citosol sea más negativo y por tanto se produzca la hiperpolarización de la célula (Busija et al., 2016; Erdös et al., 2004b; Katakam et al., 2013, 2009).

Las funciones del canal mitoK_{ATP} aún están siendo investigadas, pero parece estar involucrado en la homeostasis del volumen mitocondrial. Ya que la salida de K⁺ depende del potencial de la membrana interna y este varía con las demandas energéticas de la célula, es necesaria una vía que asegure la entrada de K⁺ a la mitocondria para mantener la estructura del orgánulo, de tal forma que se mantenga la relación entre la membrana interna y externa, ya que la inflamación y contracción de la matriz puede interferir entre estas dos membranas. La regulación del volumen de la matriz también es importante para mantener la arquitectura de las crestas mitocondriales al igual que su función (Bajgar et al., 2001; Facundo et al., 2005).

Los canales mitoK_{ATP} se encuentran fisiológicamente regulados entre otros factores por cinasas, y son activados en respuesta a agonistas de la PKC (Pereira & Kowaltowski, 2021a; Sato et al., 1998). También se encuentran regulados por la

actividad del complejo II y pueden responder a inhibidores del complejo II como el malonato (Pereira & Kowaltowski, 2021a; Wojtovich & Brookes, 2008).

El canal de mitoK_{ATP} es altamente sensible al estado redox. Mientras que oxidantes como los radicales superóxido, el H₂O₂ y los S-nitrosotioles activan los canales, reductores como la N-acetilcisteína, 2-mercaptopropionilglicina y el ditrititol (Facundo et al., 2007; Pereira & Kowaltowski, 2021a) inhiben el canal directamente lo que indica que es sensible a los reductores tiólicos. El NADPH es también un inhibidor de los canales mitoK_{ATP} (Carreira et al., 2005; Dos Santos et al., 2002; Pereira & Kowaltowski, 2021a). Esta regulación redox del canal forma a la vez parte de su función como regulador de la producción mitocondrial de ROS (Ferranti et al., 2003; Pereira & Kowaltowski, 2021a; Queliconi et al., 2011).

Se espera que el ciclo del K⁺ en las mitocondrias provoque una disminución del potencial de membrana interna a través de la acción combinada del K⁺ que entra a través del mitoK_{ATP} y sale a cambio de protones, desacoplando el transporte de electrones de la síntesis de ATP. El desacoplamiento que provoca este ciclo es limitado debido a las bajas tasas de transporte de K⁺ a través del mitoK_{ATP} en la mayoría de los tejidos, y únicamente es capaz de producir una disminución de entre 1-2% en los potenciales de membrana interna mitocondrial en el corazón (Kowaltowski et al., 2001; Pereira & Kowaltowski, 2021b). Sin embargo, y a pesar de los pequeños cambios en el potencial de membrana, incluso estos niveles bajos de desacoplamiento pueden modificar significativamente las tasas de producción de ROS (Pereira & Kowaltowski, 2021b).

La mitocondria produce ROS a través de diferentes maneras, y una de ellas es la fuga de electrones a través de la ETC, la cual genera radicales superóxido y H₂O₂ (Pereira & Kowaltowski, 2021b; Tahara et al., 2009). Altos potenciales de membrana son necesarios para la fuga de electrones, y depende también de la actividad reversible de los complejos mitocondriales (Kowaltowski et al., 2009; Murphy, 2009; Pereira & Kowaltowski, 2021b; Turrens, 2003), la cual es termodinámicamente factible a altos potenciales de membrana. De hecho, se ha demostrado que la activación de mitoK_{ATP}, disminuye la liberación mitocondrial de H₂O₂ en diferentes tejidos (Carreira et al., 2005; Pereira & Kowaltowski, 2021b). Además de regular la producción de ROS, los canales mitoK_{ATP} son también sensibles a la producción de ROS, por lo que actúan como sensores de ROS regulando su producción (Pereira & Kowaltowski, 2021b).

Mientras que los efectos de la apertura del canal de mitoK_{ATP} son suficientes para inducir cambios en la producción de oxidantes mitocondriales, los pequeños cambios en

el potencial de membrana son insuficientes para cambiar la entrada de calcio en condiciones fisiológicas de respiración. Sin embargo, en condiciones en las que la respiración mitocondrial no está presente y el potencial de membrana es mantenido por la actividad reversa de la ATP sintetasa la apertura de canales mitoK_{ATP} provoca que la incorporación de Ca²⁺ por parte de la mitocondria disminuya (Kowaltowski et al., 2009; Murphy, 2009; Turrens, 2003). Una entrada masiva de calcio puede dar lugar a su acumulación en la matriz mitocondrial y a la apertura del poro de transición de membrana (mPTP), esto provoca una disrupción en la integridad de la membrana mitocondrial interna que promueve la muerte celular (Menezes-Filho et al., 2017; Pereira & Kowaltowski, 2021b; Wong et al., 2012). Ya que la apertura de mPTP es facilitada por la oxidación de proteínas tiólicas (Pereira & Kowaltowski, 2021a; Singh et al., 2011) y por un incremento de la producción mitocondrial de ROS (Gogvadze et al., 1996; Pereira & Kowaltowski, 2021b), no es de extrañar que haya evidencia que sostenga que la activación de los canales mitoK_{ATP} puedan prevenir la apertura de mPTP (Costa et al., 2006; Pereira & Kowaltowski, 2021b). La actividad protectora frente a la formación y apertura del mPTP forma parte del rol protector que juegan estos canales frente al daño isquémico en el corazón y en otros tejidos (Garlid et al., 1997; Liu et al., 2002; Pereira & Kowaltowski, 2021a).

Durante la isquemia, la interrupción del flujo sanguíneo adecuado conduce a una disminución en el abastecimiento de oxígeno que suprime la actividad de la ETC, por lo que la actividad motriz impulsada por los protones rápidamente desaparece. Bajo estas condiciones, la ATP sintetasa puede funcionar mediante su actividad reversa e hidrolizar ATP, una actividad que restablece parcialmente el potencial de membrana (Classen et al., 1989; Pereira & Kowaltowski, 2021b; Rego et al., 2001). Las concentraciones de Ca²⁺ citosólicas incrementan durante la isquemia (Kihara et al., 1989; Pereira & Kowaltowski, 2021b) este incremento en la fuerza de conducción (potencial de membrana) puede ocasionar una acumulación de Ca²⁺ en la mitocondria y lleva a la apertura de mPTP. Una vez tiene lugar la reperfusión, las células cardíacas son conocidas por presentar un incremento en la producción de oxidantes inducido por la isquemia (da Silva et al., 2003; Pereira & Kowaltowski, 2021b), lo cual favorece la apertura de mPTP.

Se ha propuesto la activación de los canales mitoK_{ATP} como bloqueante del daño isquémico manteniendo las propiedades de transporte de la membrana y previniendo la entrada de ATP a la matriz mitocondrial (Dos Santos et al., 2002; Pereira & Kowaltowski, 2021a). Esto bloquea la hidrólisis de ATP que produce la actividad reversa de la ATP

sintasa, con un restablecimiento transitorio del potencial de membrana que podría prevenir la pérdida de ATP y una acumulación excesiva de Ca^{2+} a nivel mitocondrial (Korge et al., 2002; Pereira & Kowaltowski, 2021b). Además de que los abridores de canales mitoK_{ATP} bloquean una excesiva producción de oxidantes en la mitocondria previniendo el daño isquémico en el miocardio. El activador BMS191095 además de prevenir el daño isquémico en las células cardíacas también lo hace inhibiendo la agregación plaquetaria (Cho et al., 2005; Pereira & Kowaltowski, 2021b).

La protección isquémica que otorga la apertura de canales mitoK_{ATP} no solamente ocurre en el corazón, también se han observado resultados en neuronas y cerebro de rata (Pereira & Kowaltowski, 2021b; Shimizu et al., 2002) que muestran como el Dz_x puede proteger estas células contra el daño ocasionado por la hipoxia asociado con la isquemia a través de la prevención de la repolarización mitocondrial (Liu et al., 2002; Pereira & Kowaltowski, 2021b).

La acción protectora de los canales mitoK_{ATP} no se limita solo a la reperfusión isquémica. De hecho, el tratamiento con Dz_x también es capaz de proteger el corazón de la hipertrofia controlando la producción de oxidantes como se ha demostrado en estudios realizados en roedores (Lucas et al., 2020; Pereira & Kowaltowski, 2021a) y prevenir el daño neuronal en modelos de la enfermedad metabólica de acidemia metilmalónica impidiendo la apertura de mPTP (Kowaltowski et al., 2006; Maciel et al., 2004; Pereira & Kowaltowski, 2021a).

Además, los mecanismos protectores de los canales mitoK_{ATP} son parte de vías de señalización endógenas. El *pre-acondicionamiento* es una intervención protectora en la que el corazón es sometido a períodos breves y no dañinos de isquemia (Carreira et al., 2005; Pereira & Kowaltowski, 2021b), lo cual disminuye significativamente el daño asociado a un posterior evento isquémico dañino. Esta protección que otorga el *pre-acondicionamiento* puede ser bloqueada por los inhibidores de los canales mitoK_{ATP} (Auchampach et al., 1992; Mannhold, 2004; Pereira & Kowaltowski, 2021b; Testai et al., 2007; Toombs et al., 1993). Otro factor clave en la señalización del *pre-acondicionamiento* es la PKC, cuya activación incrementa la actividad de los canales mitoK_{ATP}, de hecho, PMA, un activador de la PKC ha demostrado indirectamente promover la activación de los canales mitoK_{ATP} en células intactas (Pereira & Kowaltowski, 2021b; Sato et al., 1998).

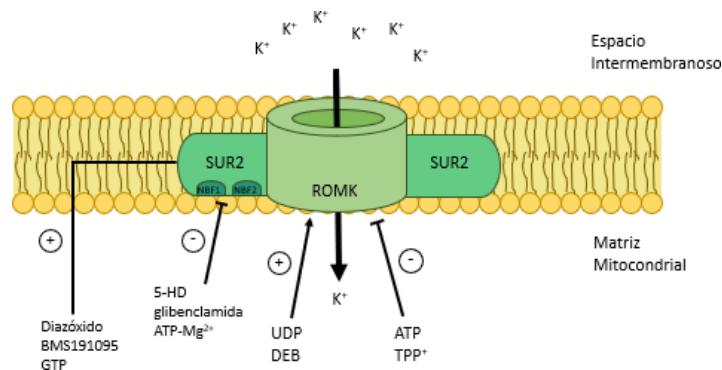


Figura 5. Estructura del canal mitoK_{ATP} compuesta de la subunidad ROMK activada por UDP y DEB y ATP y TPP⁺, y la subunidad MITOSUR a la cual se unen los inhibidores 5-HD, glibenclamida y ATP-Mg²⁺ y en la cual activadores del canal BMS191095, Dzx y GTP.

Activadores de los canales mitoK_{ATP}

Diazóxido

Fue descubierto a principios de los años 60, durante un estudio en el que se buscaba evitar los efectos diuréticos de las benzotiodiazinas a la hora de disminuir la presión arterial, en el que se descubrió que el diazóxido causaba una vasodilatación directa sin presentar efectos diuréticos (Hutcheon & Barthalmus, 1962; Rubin, 1963; Rubin et al., 1962). Sin embargo, en la misma década, también se descubrió que determinados fármacos que provocaban la vasodilatación arterial como el Dzx provocaban la subida de los niveles de glucosa, es decir, una hiperglucemia (Drash et al., 1966; Kvam et al., 1964; Tabachnick et al., 1964; Wolff & Parmley, 1963). También se encontraron afectaciones a nivel de la función excretora renal (Johnson, 1971).

El diazóxido llegó a ser aceptado para su administración oral en el manejo de la hipoglucemia intratable por otros fármacos y por vía intravenosa para casos de emergencias de pacientes con hipertensión (Coetzee, 2013). A mediados de los años 80 la ratio de publicaciones que mencionaban el diazóxido disminuyó. No fue hasta mediados de los años 90 cuando tuvo lugar un incremento en las publicaciones y el interés en este compuesto. Esto tuvo lugar debido a los descubrimientos que se produjeron en los cuales el diazóxido actuaba como un agente con propiedades cardioprotectoras (Garlid et al., 1997; Nakai & Ichihara, 1994).

En 1969, se descubrió que el diazóxido inhibía el complejo II de la ETC, el complejo succinato deshidrogenasa (SDH) (Schäfer et al., 1969). Se cree que parte de esos efectos cardioprotectores son debidos, al menos parcialmente, a la inhibición de la

SDH, ya que otros inhibidores de la SDH, como el tenoiltrifluoroacetona han presentado también efectos cardioprotectores (Coetzee, 2013; Duda et al., 2007). Los mecanismos de estos efectos continúan investigándose, pero parecen tener relación con un desacoplamiento parcial de la fosforilación oxidativa (Coetzee, 2013; Kopustinskiene et al., 2003; Liu et al., 2010).

La inhibición del complejo II provoca la producción de ROS. Esta producción moderada de ROS es capaz de abrir los canales de rianodina del retículo sarcoplásmico, liberando lo que se conoce como *sparks* de Ca^{2+} o corrientes pequeñas de Calcio, que activan los canales de potasio de larga conductancia BK_{Ca} produciendo la salida de potasio (Coetzee, 2013; Duda et al., 2007).

BMS191095

El BMS191095, también conocido como monohidrocloreto de (3R)-trans-4-[(4-clorofenil)-N-(1H-imidazol-2-ilmetil) dimetil-2H-1-benzopirano-6-carbonitrilo, pertenece a la clase de medicamentos de benzopiranos con una mayor selectividad cardíaca y potencia anti-isquémica. Se ha demostrado que mejora la función cardíaca después de un episodio isquémico y reduce la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa). Grover y colaboradores, a través de sus estudios utilizando mito K_{ATP} reconstituido, observaron que el BMS191095 activaba los canales mito K_{ATP} y que esta activación era inhibida tanto por 5-HD como por glibenclamida. (Grover et al., 2001; Testai et al., 2007).

NO

Las propiedades cardioprotectoras del NO sugieren que puede interactuar con los canales de potasio mitocondriales. Al medir el potencial redox mitocondrial y utilizarlo como un índice de apertura de los canales mitocondriales mito K_{ATP} en miocitos ventriculares de conejo, se demostró que el NO puede activar los canales mito K_{ATP} (Sasaki et al., 2000). En el mismo estudio el uso del donante de NO S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) activó los mito K_{ATP} sin estimular los canales K_{ATP} del sarcolema, ya que sus efectos fueron bloqueados específicamente por el 5- hidroxidecanoato (5-HD) y los secuestradores de NO. Debido a que muchos efectos del NO son mediados por la vía dependiente de cGMP, se determinó si la activación inducida por el NO de los mito K_{ATP} dependía de 8Br-cGMP. Los resultados negativos de este experimento sugirieron que los mito K_{ATP} son activados directamente por el NO (Sasaki et al., 2000).

En estudios realizados por Ljubkovi. y colaboradores se muestra también la activación directa de los mitoK_{ATP} por el NO al reconstituir los canales cardiacos mitoK_{ATP} en bicapas lipídicas (Ljubkovic et al., 2007), momento en el cual los canales mitoK_{ATP} fueron activados por donantes exógenos de NO. La actividad de un solo canal fue inhibida por los bloqueadores mitoK_{ATP} 5-HD o glibenclamida (Ljubkovic et al., 2007). En contraste, se han realizado medidas de la actividad de los canales mitoK_{ATP} utilizando la técnica de patch-clamp siendo esta inhibida por el NO en las células linfocitos-T humanas (Jurkat) (Dahlem et al., 2004). Tales diferencias podrían resultar de diferencias en los mecanismos moleculares que subyacen a la acción del NO en las proteínas de los canales mitoK_{ATP}. Desafortunadamente, no existen estudios que expliquen el mecanismo sobre los canales mitocondriales que puedan responder a tales preguntas. Sin embargo, tales diferencias podrían ser dilucidadas mediante estudios realizados en canales K_{ATP} en la membrana plasmática. Por ejemplo, registros de corrientes K_{ATP} en neuronas grandes de ganglios de raíces dorsales de ratas mostraron que los canales K_{ATP} son activados debido a que el NO disminuye su sensibilidad al bloqueo por ATP intracelular (Kawano et al., 2009). Este efecto también estuvo presente después de la aplicación de inhibidores de sGC y PKG, lo que indica que la vía de señalización sGC/cGMP/PKG no fue responsable de este fenómeno. Esta activación permaneció intacta en la técnica de inside-out patches y fue revertida por el ditiotreitól (DTT) y bloqueada por un agente tiol-alquilante, NEM. Estos hallazgos indicaron que el NO activa los canales K_{ATP} a través de la S-nitrosilación directa de residuos de cisteína. Durante experimentos adicionales en los que se midieron las corrientes producidas por los canales recombinantes SUR1/Kir6.2 expresados en células COS7, se demostró que la activación mediada por el NO involucra su interacción con residuos en la NBD1 de la subunidad SUR1. Por otro lado, el NO también puede regular los canales mitoK_{ATP} indirectamente a través de la vía sGC/cGMP/PKG (Sánchez-Duarte et al., 2012).

H₂S

Mustafa y colaboradores (2011) demostraron que el residuo Cys43 en la subunidad Kir6.1 del canal K_{ATP} es una diana importante de la S-sulfhidratación mediada por H₂S (se utilizó NaHS como donante) en células HEK293, produciendo la activación del canal. Curiosamente, un aumento en la actividad de los canales mitoK_{ATP} causada por la S-sulfhidratación estuvo acompañada de una reducción en la unión del ATP y una mayor unión del PIP2 a Kir6.1. Es posible que la S-sulfhidratación de Cys43 en Kir6.1 obstaculice la unión del ATP al canal debido a cambios electrostáticos o espaciales, lo que podría resultar, a su vez, en un mayor acceso del PIP2 a su sitio de unión (Mustafa

et al., 2011). Recientemente se ha demostrado que el H₂S afecta la actividad de otros canales Kir, Kir2 y Kir3, de manera opuesta a la de Kir6.1 mencionada anteriormente (Ha et al., 2018). Específicamente, el uso de NaHS como donante de H₂S originó la inhibición de los canales Kir3.2 en oocitos de *Xenopus* y en células CHO-K1 (Walewska et al., 2018).

Tang y colaboradores (Tang et al., 2005) revelaron un efecto directo tanto del H₂S exógeno en forma de una solución que contiene H₂S, como del H₂S endógeno en la actividad de los canales K_{ATP} en las células musculares lisas vasculares. También se mostró que las corrientes K_{ATP} hacia adentro y la probabilidad de apertura de un solo canal K_{ATP} aumentaron después de la exposición al H₂S. Para demostrar los efectos del H₂S endógeno en la actividad de los canales K_{ATP}, se utilizaron varios inhibidores de la CSE y la CBS, lo que resultó en una disminución de las corrientes K_{ATP} de toda la célula de manera independiente de la actividad de la vía de señalización del cGMP (Tang et al., 2005; Walewska et al., 2018).

En contraste, se sabe menos sobre la regulación de la actividad de los canales mitoK_{ATP} por el H₂S. En 2016, Testai y colaboradores (Testai et al., 2016) mostraron que el 4-carboxifenil isotiocianato (4CPI), que es un donante de H₂S, mejoró significativamente la recuperación de varios parámetros de la función miocárdica después de la isquemia y limitó la extensión de la lesión tisular. El pretratamiento de las ratas con un bloqueante selectivo del canal mitoK_{ATP}, el ácido 5-hidroxicanoico (5-HD), llevó a la abolición de los efectos citoprotectores de 4CPI, lo que sugiere que el mitoK_{ATP} podría ser uno de los objetivos del H₂S donado por 4CPI. Además, la adición de 4CPI a las mitocondrias aisladas del corazón de rata provocó la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial, y este efecto fue anulado por el ATP, que es un bloqueador fisiológico del canal mitoK_{ATP}. Se observó un efecto similar en la acción del NaHS en los cardiomiocitos de rata, donde la exposición a un donante de H₂S resultó en una reducción del tamaño del infarto miocárdico, que a su vez se vio afectado por el 5-HD (Sivarajah et al., 2009). A partir de estos experimentos, se dedujo que el H₂S abre los canales mitoK_{ATP}. Desafortunadamente, no hay datos electrofisiológicos sobre la regulación de los canales mitoK_{ATP} por el H₂S (Walewska et al., 2018).

Minoxidil

Estudios realizados por Sato y colaboradores (Sato et al., 2004) han demostrado un efecto cardioprotector del minoxidil a través de la apertura de canales mito K_{ATP} . Ya que vieron que el minoxidil abría los canales mito K_{ATP} con una selectividad 25 veces mayor que los canales de K_{ATP} en el sarcolema. El efecto cardioprotector se vio reflejado en que la coadministración de minoxidil con ouabaína, evitó la sobrecarga de calcio mitocondrial inducida por la ouabaína. Además, la administración de minoxidil previa a la inducción de la isquemia mejoró significativamente la recuperación de la contractilidad tras 60 minutos de reperfusión. Estos efectos se vieron reducidos tras la administración de 5-HD y glibenclamida (Sato et al., 2004). A pesar de ello la utilización clínica para tales usos del minoxidil es limitada debido a la arritmia ventricular y la hipotensión severa (Sato et al., 2004).

Inhibidores de los canales mito K_{ATP}

Sulfonilureas

Las sulfonilureas son una familia de medicamentos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Su mecanismo de acción consiste en la unión a los canales K_{ATP} del sarcolema de las células β -pancreáticas y su posterior inhibición, causando una disminución del flujo de salida de iones potasio y con ello la despolarización de la célula. Dicha despolarización hace que los canales de calcio se abran permitiendo la entrada de calcio a la célula e incrementando con ello el calcio intracelular lo que estimula secreción de insulina de la célula β -pancreática (Confederat et al., 2015; Proks et al., 2002).

Las sulfonilureas se diferencian según su afinidad por el subtipo de receptor SUR (una de las subunidades que compone el canal de K_{ATP} y que forma parte de la superfamilia de proteína del cassette de unión de ATP). SUR1 sobre todo está presente en el cerebro y en células β del páncreas. SUR2 se localiza en el músculo cardíaco como SUR2A y en el músculo liso como SUR2B (Hambrock et al., 2002). SUR1 tiene una mayor afinidad por las sulfonilureas que SUR2. Esto se debe en parte al residuo de serina en la posición 1206 de SUR1 que es intercambiado por un residuo de tirosina en SUR2. Sin embargo, en el caso de la glibenclamida el residuo de tirosina 1206 incrementa la afinidad por el receptor de 5 a 10 veces (Aguilar-Bryan & Bryan, 1999; Ashfield et al., 1999; Dörschner et al., 1999; Hambrock et al., 2002).

Se ha demostrado que la glibenclamida inhibe ambos canales mitoK_{ATP} y sarcK_{ATP} en células cardíacas (Fosset et al., 1988; Zhang et al., 2001). En estudios realizados por Sato y colaboradores las sulfonilureas glimepirida, gliclazida y tolbutamida no tuvieron ningún efecto sobre los canales de mitoK_{ATP} y no bloquearon los efectos cardioprotectores de diazóxido, mientras que la glibenclamida revirtió el efecto protector de diazóxido en cardiomiocitos (Sato et al., 2006). Además, se ha demostrado que glibenclamida previene los efectos beneficiosos de la apertura de los canales de mitoK_{ATP} ya que conduce a una hipertrofia cardíaca (Bednarczyk et al., 2005; Mironova et al., 2004).

ATP

En la membrana plasmática el ATP se une a la subunidad 6.2 del canal K_{ATP} produciéndose entonces la inhibición de la actividad del canal (Craig et al., 2008). En el canal de mitoK_{ATP} se une a la subunidad reguladora mitoSUR compuesta por la isoforma 8 de la proteína que forma el cassette de unión de ATP (ABCB8). En experimentos realizados por Palácio y colaboradores (Palácio et al., 2023) se ha demostrado la inhibición dosis dependiente de la actividad de estos canales por parte del ATP (IC₅₀ = 21.24 ± 1.4 µM). Por otra parte, se ha visto que el GTP es capaz de activar los canales mitoK_{ATP} (Palácio et al., 2023).

Mg²⁺

El cation Mg²⁺ es indispensable para la actividad inhibidora de ATP que se mencionaba anteriormente. De igual forma se ha visto que la inhibición de la actividad de los canales mitoK_{ATP} por parte de los derivados estéricos de acyl-CoA de cadena larga presenta también una dependencia de Mg²⁺. Cuando el Mg²⁺ se une a ATP el complejo ATP/Mg²⁺ se une al canal mitoK_{ATP} inhibiendo su actividad en el sitio “cis”. Dado que los derivados estéricos de cadena larga de Acil coenzima A no son quelante de Mg²⁺, implica que el Mg²⁺ puede interactuar independientemente, y esto lo hace uniéndose al sitio “trans” del canal mitoK_{ATP} (Garlid & Paucek, 2001). Forma parte de la estructura ABCB8 de la subunidad MITOSUR (Palácio et al., 2023). Se ha demostrado que el cation Mg²⁺ no presenta ningún efecto en ausencia de ATP (Bednarczyk et al., 2005).

Ácido 5-hidrodecanoico (5-HD)

5-HD inhibe el *pre-acondicionamiento* isquémico tanto fisiológico como el inducido por fármacos. Esto se debe a su acción como bloqueante de los canales

mitoK_{ATP} (Hanley et al., 2003). Originalmente se estudió por sus efectos antiarrítmicos (Notsu et al., 1992). Recientemente se ha visto que 5-HD es un sustrato de la enzima acil CoA sintasa, lo que abre la posibilidad de que puede que sea la forma activa 5-HD-CoA, y por tanto que sea la responsable de inhibir el mecanismo de *pre-acondicionamiento* isquémico (Hanley et al., 2003).

1.3.1.3. Mitocondria y protección celular: “pre-acondicionamiento”

El *pre-acondicionamiento* representa una condición en la cual la exposición inicial de la célula a ciertos eventos confiere protección frente a una respuesta subsecuente y potencialmente letal a través de la limitación de la producción de ROS, suprimiendo el incremento de las concentraciones citosólicas de calcio y otros mecanismos que aseguran la supervivencia de la célula (Busija et al., 2016).

Existen dos tipos de *pre-acondicionamiento*: el inmediato y el retardado. El *pre-acondicionamiento* inmediato tiene lugar durante los minutos en los que tiene lugar el estímulo inicial y dura varias horas antes de que desaparezca, mientras que el *pre-acondicionamiento* retardado necesita varias horas para desarrollarse y persiste durante varios días (Busija et al., 2016; Gáspár et al., 2009, 2008a, 2008b; Kirino, 2002; Kis et al., 2003).

En el *pre-acondicionamiento* inmediato se producen cambios en las actividades o funciones de las enzimas, segundos mensajeros y canales iónicos, mientras que el *pre-acondicionamiento* retardado se debe principalmente a una síntesis *de novo* de proteínas como por ejemplo un incremento de los niveles de catalasa (Busija et al., 2016; Busija & Katakam, 2014; Gáspár et al., 2008b). Muchos de los mecanismos de señalización que se producen, incluidos la activación de la vía PI3K/Akt y la producción de NO, no solo inducen el *pre-acondicionamiento* sino que producen cambios en el tono vascular.

Varios estudios han señalado a la mitocondria como el centro donde estos mecanismos de *pre-acondicionamiento* parecen iniciarse en neuronas, astroglia y células endoteliales cerebrales (Busija et al., 2016; Domoki et al., 2005, 2004; Dutta et al., 2015; Gáspár et al., 2006; Gidday, 2006; Grover et al., 2003; Jiang et al., 2011; Kalogeris et al., 2014; Kis et al., 2004; Kubli & Gustafsson, 2012; Lenzser et al., 2005; Mayanagi et al., 2007; Perez-Pinzon et al., 2005; Rajapakse et al., 2003; Yokoyama et al., 2019). Al igual que también se ha visto en estudios realizados en miocardio

(Katakam et al., 2007), músculo esquelético (Grover et al., 2001) y células endoteliales periféricas (Broadhead et al., 2004; Loukogeorgakis et al., 2007). Algunas de las dianas farmacológicas más importantes encargadas de inducir el *pre-acondicionamiento* son: los canales mitoK_{ATP}, las enzimas de la cadena respiratoria y la limitación de sustratos metabólicos (Busija et al., 2016).

Se ha demostrado que el Dzx es capaz de provocar este *pre-acondicionamiento* en neuronas aisladas y protegerlas frente a la privación de oxígeno o glucosa, a través de una serie de pasos que incluyen la activación mitocondrial y la generación de NO (Busija et al., 2016; Dutta et al., 2015; Katakam et al., 2016).

La reducción en metabolitos clave como la glucosa o el oxígeno pueden inducir el *pre-acondicionamiento* (Auchampach & Gross, 1993; Busija et al., 2016; Gáspár et al., 2008a; McIntosh & Lasley, 2012) así como cambios en el tono vascular. La retirada transitoria de glucosa, así como la privación de ciertos aminoácidos resultan en la despolarización mitocondrial y la reducción de ATP (Busija et al., 2016; Gáspár et al., 2008a).

1.3.1.4. Mitocondria y regulación del tono vascular

Durante años se ha pensado que los ROS mitocondriales eran productos tóxicos generados durante la producción de energía. Sin embargo, una característica metabólica única de las células endoteliales les confiere la flexibilidad a la hora de modular el ratio de la respiración mitocondrial y por tanto regular la producción de ROS. Bajo la mayoría de las condiciones metabólicas, las necesidades energéticas de las células endoteliales son abastecidas a través de la glucólisis anaeróbica (Culic et al., 1997; Widlansky & Gutterman, 2011a) en lugar de la fosforilación oxidativa (Dagher et al., 2001; Mertens et al., 1990; Spahr et al., 1989; Widlansky & Gutterman, 2011a). De este modo, la producción endotelial de ROS mitocondriales dentro de la ETC puede ser modulada por segundos mensajeros sin poner en peligro las necesidades energéticas celulares (Widlansky & Gutterman, 2011a). Los ROS mitocondriales pueden salir desde el espacio intermembranoso o desde la matriz mitocondrial y alcanzar el citosol. El anión superóxido en el espacio intermembranoso puede abandonar la mitocondria a través de canales de aniones voltaje dependientes localizados en la membrana externa (Han et al., 2003; Widlansky & Gutterman, 2011a). Sin embargo, debido a su naturaleza electrófila y a su corta vida media, el superóxido tiene pocas posibilidades como candidato a participar en la señalización mitocondria-célula. Por otra parte, el radical superóxido es rápidamente

reducido a H_2O_2 tanto en el espacio intermembranoso a través de la superóxido cobre zinc dismutasa (CuZn SOD, SOD1) y en la matriz a través de la superóxido manganeso dismutasa (MnSOD, SOD2) (Cadenas & Davies, 2000; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001; Widlansky & Gutterman, 2011a). La MnSOD se dirige postraduccionalmente a la matriz mitocondrial y tiene una importancia fundamental en la homeostasis vascular. (Widlansky & Gutterman, 2011a; Wispé et al., 1989).

El H_2O_2 como molécula señalizadora es más estable, lo que le hace tener una vida media más larga. La concentración de H_2O_2 en la mitocondria es 100 veces mayor que la de superóxido (Cadenas & Davies, 2000; Widlansky & Gutterman, 2011a). La ausencia de carga en la molécula de H_2O_2 le permite atravesar libremente las membranas celulares. Varios estudios sugieren que el transporte del H_2O_2 desde la mitocondria al citosol se ve incrementado por la presencia de acuaporinas, en especial, la acuoporina 8, en las membranas mitocondriales (Bienert et al., 2006, 2007; Calamita et al., 2005; Widlansky & Gutterman, 2011a). La presencia de estas acuaporinas en la membrana interna parecen tener un papel importante en la regulación de la viabilidad celular a través de la regulación del volumen mitocondrial (Lee et al., 2005; Widlansky & Gutterman, 2011a).

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es sensible a los cambios y condiciones de la ETC y del pH (Fink et al., 2005; Skulachev, 1998; Widlansky & Gutterman, 2011a). Un incremento de la producción mitocondrial de superóxido está relacionado con $\Delta\Psi_m$ más polarizados (Skulachev, 1998; Widlansky & Gutterman, 2011a). Cuando el $\Delta\Psi_m$ es máximo, los protones son expulsados de la matriz con menor avidez, lo que reduce el flujo de la ETC incrementando la vida media de los intermediarios redox más inestables (Thomas et al., 2008; Widlansky & Gutterman, 2011a). Las proteínas reguladoras de la membrana mitocondrial interna también juegan un papel fundamental en la modulación de $\Delta\Psi_m$. Dentro de estas, las proteínas mitocondriales desacoplantes (UCPs) pueden abrirse en la membrana mitocondrial interna, conduciendo a una despolarización de la membrana y a un desacoplamiento parcial de la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa debido a una reducción del gradiente de protones (Widlansky & Gutterman, 2011a). La supresión de estas proteínas UCP incrementa la producción de ROS (Duval et al., 2002; Widlansky & Gutterman, 2011a), mientras que una sobreexpresión es capaz de atenuar la producción de ROS de forma dependiente al estatus de ATP celular (Fink et al., 2005; Lee et al., 2005; Widlansky & Gutterman, 2011a). Además, la transcripción de UCP2 se encuentra

regulada de forma significativa en estados de exceso de estrés oxidativo y elevado $\Delta\Psi_m$ (Pecqueur et al., 2001; Widlansky & Gutterman, 2011a).

Las peroxidasas son un grupo de enzimas que se encargan de convertir el H_2O_2 en agua. En la matriz mitocondrial encontramos la tioredoxina-2 (Tanaka et al., 2002), la peroxirredoxina-3 (Chang et al., 2004), y la glutarredoxina-2 (Lundberg et al., 2001). Estas enzimas se encuentran reguladas al alza en condiciones de estrés oxidativo probablemente con el fin de reducir las consecuencias tóxicas de unos elevados niveles de H_2O_2 (Imai & Nakagawa, 2003; Rhee et al., 2001; Trujillo et al., 2006; Widlansky & Gutterman, 2011a). Se ha visto que el regulador transcripcional PGC-1 α (coactivador del receptor gamma 1 α) ejerce una regulación coordinada de la peroxidasa y de la MnSOD (Valle et al., 2005; Widlansky and Gutterman, 2011a). El factor PGC-1 α se encuentra a su vez regulado por el NO, otro factor clave en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial en las células endoteliales (Erusalimsky & Moncada, 2007; Valle et al., 2005; Widlansky & Gutterman, 2011a). A su vez, las peroxidasas también se encuentran reguladas por las concentraciones de calcio (Monteiro et al., 2004; Rigobello et al., 2006; Widlansky & Gutterman, 2011a).

Los estudios recientes muestran como los ROS generados fuera de la mitocondria a través de las enzimas NADPH oxidasa (Doughan et al., 2008; Fukai, 2009; Fukai & Ushio-Fukai, 2020; Lee et al., 2006; Wenzel et al., 2008; Widlansky & Gutterman, 2011a), xantina oxidasa (XO) (Baudry et al., 2008; Widlansky & Gutterman, 2011a) y la eNOS (Ceylan-Isik et al., 2009; Widlansky & Gutterman, 2011a) desacoplada pueden estimular a su vez la producción de ROS mitocondriales.

Los ROS mitocondriales están estrechamente regulados en las células endoteliales, lo que les confiere un papel dentro de la señalización de la regularización vascular. Los ROS generados en la mitocondria son responsables de la respuesta vasodilatadora en respuesta al *shear stress* en pacientes con enfermedad coronaria (Widlansky & Gutterman, 2011a; Zhang & Gutterman, 2007).

En la microvasculatura, tenemos reguladores importantes de la homeostasis vascular como el NO y los prostanoïdes, pero también el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Aunque la identidad del EDHF puede variar según el lecho vascular y los diferentes estados patológicos, el H_2O_2 ha sido identificado como EDHF en múltiples lechos vasculares como por ejemplo en pacientes con enfermedad coronaria (Liu et al., 2003; Miura et al., 2003; Phillips et al., 2007; Widlansky & Gutterman, 2011a) así como en arterias mesentéricas de humano y de ratón (Matoba et

al., 2000, 2002; Widlansky & Gutterman, 2011a). El H_2O_2 participa en la respuesta relajante tipo EDH en arteriolas renales preglomerulares, donde incrementa las corrientes de potasio activadas por calcio (K_{Ca}) de las células endoteliales y disminuye el calcio intracelular y relaja el MLV (Muñoz et al., 2017).

En arterias coronarias obtenidas de muestras descartadas del apéndice auricular derecho ligado durante la cirugía de *bypass* cardiopulmonar, canuladas, presurizadas y expuestas a un flujo laminar, se observó un aumento en la producción de superóxido y H_2O_2 , el cual fue revertido al ser expuestas a rotenona, un inhibidor del complejo I mitocondrial. La inhibición del complejo I o el complejo III reduce la vasodilatación inducida por el *shear stress*. El mecanismo de vasodilatación inducido por el *shear stress* incrementa los ROS mitocondriales y parece involucrar un incremento en el $\Delta\Psi_m$ al contrario que en la inhibición de la ETC por NO (Han et al., 2007; R. Li et al., 2009; Widlansky & Gutterman, 2011a). En modelos animales, el *shear stress* laminar regula tanto la MnSOD como la peroxirredoxina en el endotelio, en lo que parece ser un mecanismo compensador para atenuar las concentraciones mitocondriales de H_2O_2 y superóxido (Ai et al., 2008; Mowbray et al., 2008; Widlansky & Gutterman, 2011a). Aunque el mecanismo de transducción de la señal del *shear stress* a la mitocondria de la célula está por determinar, parece ser que el citoesqueleto endotelial juega un papel fundamental en este proceso. Señales mecánicas desde la superficie de las células endoteliales son transducidas a los orgánulos celulares a través de los filamentos de actina (Davies, 1995; Helmke & Davies, 2002; Widlansky & Gutterman, 2011a). El papel del citoesqueleto en la transducción de la dilatación mediada por el *shear stress* se ha observado en el músculo liso de las arterias, donde el NO y las prostaglandinas son mediadores de la vasodilatación (Sun et al., 2001), así como en las arterias de pacientes con enfermedad coronaria donde el H_2O_2 juega un papel clave.

En arteriolas coronarias humanas expuestas a inhibidores de actina y de la formación de microtúbulos se ha demostrado una disminución de la respuesta vasodilatadora al *shear stress* junto a una pérdida de la producción de H_2O_2 y superóxido (Liu et al., 2008; Widlansky & Gutterman, 2011a). El mecanismo a través del cual, esta señal se transmite a la mitocondria se encuentra aún bajo investigación, pero parece involucrar el incremento de las concentraciones de calcio intracelulares que son moduladas por la producción local de NO (Mendoza et al., 2010; Widlansky & Gutterman, 2011a).

Jaggar y colaboradores (Xi et al., 2005b) fueron los primeros en demostrar que la despolarización de la mitocondria con Dzx era capaz de inducir relajaciones en las

células del VSM en arterias cerebrales sin endotelio a través de un mecanismo que incluía la producción y efectos locales de ROS. De este modo, el Dzx era capaz de incrementar la producción de ROS mitocondriales la cual, secuencialmente activaba los canales de rianodina sensibles a Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico, generando las corrientes transitorias de Ca^{2+} conocidas como Ca^{2+} sparks que producen la apertura de los canales BK_{Ca} produciendo una salida de K^+ , que conduce a una hiperpolarización y por tanto a una disminución de las concentraciones intracelulares de calcio conduciendo a la relajación del músculo liso (Busija et al., 2016; Xi et al., 2005b).

En estudios realizados por Katakam y colaboradores, aparte de utilizar Dzx se vio también que el compuesto BMS191095 era capaz de producir relajaciones en el MLV, pero sin la respuesta mediada por ROS (Katakam et al., 2016, 2014). Por lo que demostraron que el BMS-191095 no incrementaba ni la producción mitocondrial ni la citosólica de ROS, y la vasodilatación en arterias sin endotelio producida por el BMS191095 no se veía afectada por el empleo de scavengers de ROS. Sin embargo, el uso de BMS191095 sí que incrementaba las corrientes de Ca^{2+} sparks en músculo liso tanto en arterias con endotelio como sin endotelio (Busija et al., 2016; Busija & Katakam, 2014; Katakam et al., 2013).

Además, se ha demostrado que el uso de abridores mito K_{ATP} como el Dzx y el BMS191095 promueven el incremento de la producción de NO en células endoteliales, lo que parece producirse a través de la vía PI3K/Akt que fosforila la eNOS así como el incremento en las concentraciones intracelulares de calcio que activan a su vez la eNOS (Katakam et al., 2016, 2013). La despolarización mitocondrial también puede conducir a la producción de prostanoïdes y a otros agentes vasoactivos en el endotelio (Katakam et al., 2009), sin embargo, los efectos del NO parecen ser más importantes al menos con el BMS191095 (Busija et al., 2016; Katakam et al., 2016).

1.3.1.5. NO y respiración mitocondrial

Durante muchos años se ha sabido que el NO se une a la enzima citocromo c oxidasa, la enzima terminal en la ETC mitocondrial. Sin embargo, la relevancia biológica potencial de esta acción solo se hizo evidente después del descubrimiento en la década de 1980 de que el NO es un mediador biológico, y la demostración en la década de 1990 de que inhibe la respiración en células de mamíferos. El hallazgo de que concentraciones bajas de NO en el rango de los nanomolares inhiben de manera reversible y competitiva a la citocromo oxidasa con el oxígeno molecular (O_2), indica que estas interacciones tienen un papel fisiológico potencial en el control de la respiración

celular y que el efecto inhibitorio podría estar involucrado en el inicio de patologías (Moncada & Erusalimsky, 2002).

El NO activa la guanilato ciclasa soluble con una DE50 de aproximadamente 20 nM (Bellamy et al., 2000), y este efecto es independiente de la concentración de O₂. En contraste, el efecto inhibitorio del NO en la citocromo oxidasa depende totalmente de la concentración de O₂. Así, a una concentración de O₂ de 145 µM (que es aproximadamente igual a la concentración arterial de O₂), el IC50 para el NO fue de 270 nM. Sin embargo, a 30 µM (aproximadamente la concentración de O₂ en los tejidos), el IC50 se redujo a 60 nM (Brown & Cooper, 1994). Se ha descrito que la concentración intracelular de O₂ es tan baja como 10 µM (Tamura et al., 1989), y hay evidencia de que existe un gradiente intracelular de O₂, lo que indica que este valor podría ser aún más bajo. A una concentración de O₂ de 10 µM, se predice que el IC50 del NO para la citocromo oxidasa sea de aproximadamente 20 nM, lo que indica que las concentraciones de NO que se han detectado en los tejidos (10-450 nM) serían suficientes para competir con el O₂ intracelular. Esto hace que la citocromo oxidasa sea tan sensible al NO como lo es la guanilato ciclasa soluble y destaca a estas dos enzimas como los únicos objetivos de las concentraciones fisiológicas de NO que se han descrito hasta ahora (Moncada & Erusalimsky, 2002).

En diversas células, tejidos aislados y animales *in vivo* se ha demostrado que el NO generado endógenamente inhibe la respiración, y se ha comprobado que los inhibidores de la NOS endotelial aumentan la respiración (Loke et al., 1999; Shen et al., 1995).

Algunas células pueden adaptarse a concentraciones más bajas de O₂ sin cambios importantes en su estado metabólico. Esto podría ser parte de un mecanismo adaptativo. La relación NO: O₂ a nivel de la citocromo oxidasa podría proporcionar un mecanismo de percepción que regulará el consumo de O₂ en el punto preciso donde se utiliza (Clementi et al., 1999). Una consecuencia de inhibir la citocromo oxidasa sería un mayor suministro de O₂ en los tejidos circundantes (Poderoso et al., 1996; Thomas et al., 2001).

1.3.2. Mitocondria y disfunción endotelial

A pesar de que el contenido mitocondrial en las células endoteliales es relativamente bajo en comparación con los cardiomiocitos y hepatocitos (Tang et al.,

2014), las mitocondrias desempeñan un papel clave en la función endotelial. De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de PGC-1 α , factor que regula la biogénesis mitocondrial, protege contra el estrés oxidativo y limita la formación de lesiones ateroscleróticas (Stein et al., 2010).

Además, la expresión alterada de componentes de la cadena OXPHOS está relacionada con la biogénesis mitocondrial deteriorada, lo cual puede contribuir al envejecimiento celular del endotelio (Ungvari et al., 2008). Asimismo, se ha descrito la fragmentación mitocondrial y la subsiguiente pérdida de las redes mitocondriales en las células endoteliales de pacientes diabéticos, así como en células endoteliales aórticas humanas cultivadas expuestas a una concentración elevada de glucosa (Shenouda et al., 2011). Esto se asoció con el deterioro de la actividad de eNOS y el aumento de la producción de ROS.

Los ROS mitocondriales pueden dañar el ADN mitocondrial, los lípidos y las proteínas, así como los complejos que forman la cadena OXPHOS, lo que a su vez puede contribuir a la producción autosostenida de ROS mitocondriales (Safiedeen et al., 2016). Además, en un modelo murino de obesidad, una dieta alta en grasas induce la fragmentación mitocondrial junto con una disminución en los niveles de mitofusina 2 (Mfn2), un componente clave de la fusión mitocondrial (Jheng et al., 2012; Schneeberger et al., 2013).

Canales mitoK_{ATP} y disfunción endotelial

En modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson se ha observado disfunción endotelial. En la médula oblongata, la capa endotelial de la barrera hematoencefálica presentaba hiperhidratación, mientras que, en el miocardio, los cambios destructivos en la barrera sangre-tejido se acompañaban de una disminución en el grosor medio de la capa endotelial. Estos cambios pueden explicar el desarrollo de patologías cardiovasculares en el parkinsonismo, que es una de las causas más comunes de muerte en estos pacientes (Mosentsov et al., 2021).

La uridina 2-difosfato actúa como un activador de los canales de mitoK_{ATP}. Este metabolito es producido de forma natural por las células tras la administración exógena de uridina. En el modelo experimental de Parkinson la administración exógena de uridina normalizó los procesos dinámicos de las mitocondrias de las células de la médula oblonga. Al mismo tiempo, disminuyó la hidratación de la capa endotelial de la barrera hematoencefálica (Mosentsov et al., 2021). Si se utilizaba simultáneamente un bloqueador del canal mitoK_{ATP} como es el 5-HD junto con un activador del canal, el

efecto positivo de este último se cancela. De este modo, los resultados indican claramente la participación del canal mitoK_{ATP} en la formación de la disfunción mitocondrial y endotelial en la encefalopatía hepática (Mosentsov et al., 2021).

1.3.2.1. ROS mitocondriales y disfunción vascular

Como se ha demostrado en diferentes estudios, la mitocondria es la mayor fuente de estrés oxidativo vascular (Dikalov et al., 2014; Doughan et al., 2008; Gioscia-Ryan et al., 2014; Kirkman et al., 2018; Rossman et al., 2018). Y a su vez, varios estudios han comprobado cómo tras el uso de antioxidantes mitocondriales se mejora la función vascular tanto en estudios preclínicos (Dikalov et al., 2014; Gioscia-Ryan et al., 2014; Kirkman et al., 2018) como en ensayos humanos (Kihara et al., 1989; Kirkman et al., 2021, 2018; Kizhakekuttu et al., 2012; S. H. Park et al., 2020; S.-Y. Park et al., 2020).

La producción de ROS mitocondriales es uno de los principales mecanismos de señalización en las células endoteliales. Las células endoteliales son capaces de producir diferentes ROS que incluyen superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y otros radicales oxidantes y nitrosantes (Freed & Gutterman, 2013; Kirkman et al., 2021; Zhang & Gutterman, 2007). Sin embargo, el estrés oxidativo que resulta de una mayor producción de oxidantes, una menor capacidad antioxidante o ambos, conduce a la disfunción endotelial al reducir la biodisponibilidad de NO (Kirkman et al., 2021; Kluge et al., 2013; Quintero et al., 2006). Otra de las mayores fuentes de ROS y estrés oxidativo en la vasculatura incluyen la Nox y la xantino oxidasa (Kirkman et al., 2021; Schulz et al., 2011; Touyz & Briones, 2011). Como ya se ha mencionado, puede haber una relación entre los ROS mitocondriales y los ROS producidos por la Nox (Dikalov & Nazarewicz, 2013; Kirkman et al., 2021). Aunque los ROS puedan tener un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular, un exceso de ROS reduce la biodisponibilidad de NO a través de mecanismos como la interacción de $O_2^{\cdot-}$ con NO para formar $ONOO^{\cdot}$ (Kirkman et al., 2021; Li & Shah, 2003, 2002) lo cual contribuye al estrés oxidativo vascular, así como el desacoplamiento de la enzima eNOS. De hecho, se ha visto que con la edad incrementan los monómeros de eNOS frente a los dímeros de eNOS, lo que indica el mayor desacoplamiento de la enzima asociado al envejecimiento (Kirkman et al., 2021; Yang et al., 2009). Además, el $O_2^{\cdot-}$ puede oxidar el cofactor de la eNOS BH_4 a BH_2 lo que a su vez contribuye al desacoplamiento de la enzima donde eNOS va a producir más $O_2^{\cdot-}$ y menos NO (Kirkman et al., 2021; Thomas et al., 2001).

Los ROS mitocondriales a su vez promueven un exceso de inflamación, que contribuye a su vez a la disfunción endotelial y a la rigidez arterial (Kirkman et al., 2021). Este incremento en la rigidez se produce a partir de una rigidez primaria en la pared arterial que se origina a través de una estimulación de la síntesis y deposición de colágeno y una degradación de elastina y secundariamente un incremento en el tono muscular liso debido a una pérdida de NO (Kirkman et al., 2021; Lakatta & Levy, 2003; Lessiani et al., 2016), por último, esto se traduce en complicaciones que van a dar lugar a la enfermedad coronaria (Dikalov et al., 2014; Griendling et al., 2016; Kirkman et al., 2021).

Los mecanismos mediante los cuales el exceso de ROS y la inflamación afectan a la rigidez arterial incluyen la alteración en la expresión génica, el remodelado estructural, y la contribución a la invasión de la pared arterial por factores proinflamatorios (Kirkman et al., 2021; Wu et al., 2017). Además, los ROS mitocondriales también inducen la formación de variantes en el ADN mitocondrial (mtDNA) relacionados con el envejecimiento y la hipertensión resistente (Hajam et al., 2022; Kirkman et al., 2018) Dichas alteraciones en el mtDNA alteran el número de copias y la expresión de las subunidades mitocondriales que se traducen en pérdida de la función vascular y el desarrollo de hipertensión (Dai et al., 2012; Golob et al., 2015; Kirkman et al., 2021; Pauls et al., 2020). Estas alteraciones en el mtDNA también influyen en la expresión de péptidos como la humanina que tiene un importante efecto protector de la función vascular endotelial (Kadlec et al., 2016; Kirkman et al., 2021; Oh et al., 2011).

La activación de NFκB y de la PKC ocurren tras un exceso en la producción de ROS mitocondriales, dando lugar a una serie de alteraciones proinflamatorias y protrombóticas en el fenotipo endotelial (Ali et al., 2006; Banfi et al., 2009; Pearlstein et al., 2002; Pueyo et al., 2000; Ungvari et al., 2007; Widlansky & Gutterman, 2011b). Esto hace que se incremente la expresión de moléculas de adhesión celulares como ICAM-1, selectina-P y selectina E (Ichikawa et al., 2004; Widlansky & Gutterman, 2011b). La depleción de las reservas mitocondriales de glutatión que funcionan como antioxidante de defensa contribuye al entorno proinflamatorio con una sobreexpresión de la selectina E y VCAM-1 que resulta en un incremento en el reclutamiento de monocitos por las células endoteliales (Chen et al., 1999; Widlansky & Gutterman, 2011b).

Los ROS producidos en la ETC mitocondrial que activan NFκB originan un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 (Pearlstein et al., 2002; Srinivasan et al., 2003; Widlansky & Gutterman, 2011b) y del factor tisular protrombótico (Banfi et al., 2009; Widlansky & Gutterman, 2011b).

1.3.2.2. Disfunción mitocondrial, disfunción vascular y enfermedad metabólica

La inflamación vascular y el incremento de los niveles basales de ROS tanto mitocondriales como no mitocondriales son responsables de la disfunción vascular y cardíaca (Busija et al., 2004; Katakam et al., 2016; Nishikawa et al., 2000).

La resistencia a la insulina (IR) es capaz de alterar el funcionamiento de los canales K_{ATP} en arterias cerebrales y periféricas (Busija et al., 2016, 2004; Erdös et al., 2006, 2004a, 2004b), por lo que no es de extraña que los canales $mitoK_{ATP}$ se vean afectados de forma similar (Busija et al., 2016; Katakam et al., 2009, 2007). De este modo, el *pre-acondicionamiento* inducido por el Dzx es incapaz de proteger al corazón en la isquemia/repercusión en el modelo de obesidad genética con IR en ratas (Busija et al., 2016; Katakam et al., 2007). Además, la zona infartada es mayor en ratas obesas que en ratas control, la igual que se ha visto en cerebro en experimentos realizados mediante oclusión de la arteria cerebral media (Brown et al., 2007; Busija et al., 2016; Mayanagi et al., 2008; Terao et al., 2008).

Al igual que los fallos descritos anteriormente en el *pre-acondicionamiento* en el modelo genético de obesidad, las respuestas vasoactivas en arterias cerebrales se encuentran alteradas en ratas con resistencia a la insulina (Busija et al., 2016; Katakam et al., 2014, 2009). Esta disminución de la vasodilatación parece ser debida a una reducción de la despolarización mitocondrial en el músculo liso, así como una disminución de las corrientes *sparks* de calcio y generación de ROS en el caso del Dzx, además de una disminución de la producción y biodisponibilidad de NO (Busija et al., 2016; Katakam et al., 2014, 2009). El uso de *scavengers* de ROS e inhibidores de la PKC es capaz de restaurar la función vascular en arterias cerebrales de animales con IR (Busija et al., 2016; Erdös et al., 2004a, 2004b).

La diabetes y la resistencia a la insulina se caracterizan por alteraciones en la morfología mitocondrial que incluyen mitocondrias más pequeñas con estructuras menos complejas además de una disminución en la capacidad para llevar a cabo la fosforilación oxidativa, un elevado potencial de membrana y una reducción de la masa mitocondrial (Morino et al., 2005; Petersen et al., 2004; Widlansky & Gutterman, 2011b). Análisis *microarray* de músculo esquelético de pacientes diabéticos mostraron una reducción de los elementos que participan en la fosforilación oxidativa. Esto puede verse revertido por receptor α activado por el PGC-1 α (Stein et al., 2010; Widlansky & Gutterman, 2011b). PGC-1 α juega un papel esencial en la regulación de la biogénesis mitocondrial, una inhibición de la actividad PGC-1 α conduce a una reducción en el

número de mitocondrias (Widlansky & Gutterman, 2011b; Wu et al., 1999). Datos de cultivos celulares y biopsias muestran que una disminución de la masa mitocondrial está también presente en la descendencia de pacientes con diabetes tipo 2 (Morino et al., 2005; Widlansky & Gutterman, 2011b).

La diabetes y la IR se caracterizan por elevados niveles de glucosa y ácidos grasos libres circulantes (Bogardus et al., 1984; Reaven et al., 1988; Widlansky & Gutterman, 2011b). En las células endoteliales, la hiperglicemia induce la fisión mitocondrial con el subsecuente desarrollo de una excesiva producción de ROS mitocondriales, una reducción en la producción de ATP y una atenuación del crecimiento celular (Widlansky & Gutterman, 2011b; Yu et al., 2006). Estudios en células endoteliales aisladas demuestran como una exposición a glucosa alta (30 mM durante 7 días) incrementa la producción de ROS. Este fenómeno está relacionado principalmente con el aumento de ROS mitocondriales ya que sólo se produce con la inhibición farmacológica del complejo II, la sobreexpresión de UCP1 o la exposición a la MnSOD. Los inhibidores de los ROS mitocondriales también reducen la activación de NFκB y de la PKC, lo que es indicativo de la capacidad de señalización celular de los ROS mitocondriales, y a su vez, estos inhibidores son capaces de mitigar la producción de productos finales de glicosilación avanzada tóxicos y de sorbitol (Nishikawa et al., 2000; Widlansky & Gutterman, 2011b). La expresión de moléculas de adhesión celular en la superficie endotelial depende de los ROS mitocondriales en condiciones de glucosa elevada (Basta et al., 2005; Srinivasan et al., 2003; Widlansky & Gutterman, 2011b).

La exposición de células endoteliales a altas concentraciones de ácidos grasos libres (lisofosfatidilcolina y ácido linoléico) incrementa el $\Delta\Psi_m$, los ROS mitocondriales y la NFκB en células endoteliales de arteria aorta humana (Lee et al., 2005; Widlansky y Gutterman, 2011b). Cada una de estas respuestas es inhibida por la sobreexpresión de UCP2, demostrando que las reducciones en los ROS mitocondriales se encuentran ligadas a reducciones en el $\Delta\Psi_m$ mejorando la función endotelial. Resultados similares se han descrito en arteria aorta de rata en la cual la sobreexpresión de UCP2 revirtió la disfunción endotelial inducida por la lisofosfatidilcolina (K.-U. Lee et al., 2005; Widlansky & Gutterman, 2011b; Williams et al., 1998).

Se ha demostrado que los ROS mitocondriales generados por una alta exposición a glucosa son capaces de inhibir la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Zhang et al., 2023). Este proceso conduce a la inhibición de la glucólisis y la subsecuente acumulación de gliceraldehido-3-fosfato, fructosa-6-fosfato y

glucosa. La acumulación de estos productos activa múltiples mecanismos que contribuyen a las complicaciones vasculares diabéticas como son la activación de la PKC, la producción de AGEs y sorbitol (Brownlee, 2001; Widlansky & Gutterman, 2011b). Estudios *in vivo* han verificado que la hiperglucemia conduce a la disfunción endotelial a través de un exceso de estrés oxidativo y una disminución de la biodisponibilidad de NO (Widlansky & Gutterman, 2011b; Williams et al., 1998). Esto se ha visto reflejado en experimentos con células endoteliales aórticas bovinas expuestas a altas concentraciones de glucosa en las cuales se incrementa la metilación de la histona H3K4 y se reduce la metilación de H3K9. Estos cambios epigenéticos conducen a la activación crónica de NFκB lo que da lugar a la inflamación endotelial y a la reducción de la biodisponibilidad de NO (Keating y El-Osta, 2012; Pirola et al., 2011; Widlansky y Hill, 2018). Esta reducción en la vasodilatación también se ha observado en pacientes diabéticos que mejoraron tras el tratamiento antioxidante (Beckman et al., 2001; Taddei et al., 1998; Timimi et al., 1998; Widlansky & Gutterman, 2011b).

Las oxLDL contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis (Stocker & Keaney, 2004; Widlansky & Gutterman, 2011b). Los ROS mitocondriales son importantes en la generación de oxLDL en células endoteliales (Mabile et al., 1997; Widlansky & Gutterman, 2011b). A su vez las oxLDL pueden inhibir la ETC resultando en un incremento de la producción de ROS mitocondriales (Roy Chowdhury et al., 2010; Widlansky & Gutterman, 2011b).

El desarrollo de hipertensión se encuentra asociado a una elevación de los niveles de superóxido en el tejido vascular, mientras que el uso de *scavengers* reduce la presión arterial en modelos animales de hipertensión (Laursen et al., 1997; Miyagawa et al., 2007; Nakazono et al., 1991; Schnackenberg et al., 1998; Widlansky & Gutterman, 2011b). También se ha visto como la NADPH oxidasa juega un papel clave en el inicio de la hipertensión asociada al estrés oxidativo (Harrison & Gongora, 2009; Hoch et al., 2009; Widlansky & Gutterman, 2011b). Tanto la NADPH oxidasa como la mitocondria generan un exceso de ROS en diferentes modelos de hipertensión (Pueyo et al., 2000; Widder et al., 2009; Widlansky & Gutterman, 2011b). La sobreexpresión de la tiorredoxina-2 en modelos de ratón transgénico reducen la producción de superóxido y disminuye los efectos hipertensivos de la infusión de angiotensina II (Widder et al., 2009; Widlansky & Gutterman, 2011b).

El daño oxidativo afecta también al mtDNA el cual codifica proteínas importantes como el complejo I o la ATP sintasa cuya alteración puede conducir a un incremento de la producción de ROS, por lo que la generación de ROS produce a su vez más ROS

(Nijtmans et al., 2001; Widlansky & Gutterman, 2011b). Estos daños en el mtDNA se han visto reflejados en mayor medida en regiones de tejido humano arterial que presentaban aterosclerosis respecto a aquellas regiones de los mismos pacientes que no presentaban aterosclerosis (Ballinger et al., 2002; Widlansky & Gutterman, 2011b). En modelos de ratón ApoE-*knockout*, el daño en el mtDNA precede el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Ballinger et al., 2002; Widlansky & Gutterman, 2011b). Cuando se induce una sobreexpresión transgénica de tiorredoxina-2 en el mismo modelo de ApoE-*knockout* se reduce la formación de placas ateroscleróticas, así como se mejora la función endotelial (Widlansky & Gutterman, 2011b; Zhang et al., 2007).

1.3.2.3. Relación entre el estrés del RE y la disfunción mitocondrial

El RE y la mitocondria son dos orgánulos que interactúan entre ellos a través de uniones que les permiten el intercambio de lípidos y calcio entre otros metabolitos (Kornmann, 2013). Estas uniones se conocen como membranas mitocondriales asociadas a RE (MAMs) y juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y procesos de señalización celular (Kornmann, 2013). Ejemplo de ello es el incremento en el número de estas uniones MAMs en situaciones de estrés aumentando la transferencia de iones Ca^{2+} con el fin de adaptar la célula a las condiciones de estrés que requieren un aumento de la producción metabólica (Kopeck et al., 2010).

En situaciones de estrés crónico la sobrecarga de Ca^{2+} conlleva la activación de la respuesta apoptótica y con ello la muerte celular (Decuypere et al., 2011).

También se ha visto que la pérdida de función de MAM-asociada a Mfn2 afecta la señalización de la insulina en el hígado, como se refleja en la fosforilación defectuosa del receptor de insulina y la fosforilación de Akt (Sebastián et al., 2012).

En ratones *ob/ob* y en ratones alimentados con una dieta alta en grasas y sacarosa, la integridad de MAM se ve alterada en el hígado y el tratamiento antidiabético mejora la comunicación entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Tubbs et al., 2014). Además, en el hígado de ratones alimentados con una dieta alta en grasas, se ha reportado una notable reorganización de los MAMs que resulta en una sobrecarga de Ca^{2+} en las mitocondrias (Arruda et al., 2014).

La sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y el estrés oxidativo comprometen la capacidad de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y aumenta a su vez el estrés oxidativo.

Además, la rápida inducción de la respuesta de estrés del retículo endoplásmico (ER) con tunicamicina provoca cambios en los MAM, lo que indica que el estrés del RE regula el diálogo con las mitocondrias independientemente de la obesidad. Sin embargo, no está claro si la respuesta de estrés del RE regula la función mitocondrial (Rainbolt et al., 2014) o, por el contrario, la respuesta de estrés del RE surge como resultado de una disfunción mitocondrial (Kozlov et al., 2009; Safiedeen et al., 2016).

Lu y colaboradores descubrieron que una dieta alta en grasas rica en ácido graso saturado palmitato induce la inflamación de las mitocondrias y se extiende al RE en células endoteliales de la aorta de ratones. Estos cambios morfológicos están asociados con un aumento de ROS, una sobreexpresión de marcadores de estrés del RE y resistencia a la insulina y disfunción endotelial (Lu et al., 2013).

Cuando las células endoteliales se exponen a condiciones de isquemia/reperfusión, que es una fuente robusta de ROS, se produce un aumento del flujo de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico hacia las mitocondrias a través de las interacciones MAM, y la alteración de los MAM protege a las células endoteliales del daño por isquemia/reperfusión (He et al., 2015).

Curiosamente, la morfología y función tanto del RE como de las mitocondrias en las células endoteliales dependen del NO. De hecho, se ha demostrado que una reducida disponibilidad de NO induce un cambio de estructura de los túbulos a láminas en el RE, la fragmentación del aparato de Golgi y un aumento de la fibrilaridad de las mitocondrias, lo cual se asocia con el desarrollo de un fenotipo prosecretor en las células endoteliales (Lee et al., 2013).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debido a su estrecha asociación con factores de riesgo como la hipertensión, diabetes, dislipidemia, obesidad y tabaquismo, la DE se considera en la actualidad una manifestación temprana de desórdenes subclínicos sistémicos que conducen a la enfermedad cardiovascular y un síntoma centinela de enfermedad arterial coronaria (Gandaglia et al., 2014; Montorsi et al., 2006; Vlachopoulos et al., 2013b). La evidencia clínica y experimental demuestra que la disfunción endotelial es el vínculo entre la disfunción eréctil y la enfermedad cardiovascular, y representa el punto de partida en la patogénesis de la disfunción eréctil vasculogénica (Kirby et al., 2005). La disfunción endotelial es un fenotipo endotelial mal adaptado al estrés metabólico, mecánico y/u oxidativo, caracterizado por la alteración de la vasodilatación donde el NO está comprometido, y de la función de barrera del endotelio, así como por el incremento en la expresión de factores pro-inflamatorios y pro-trombóticos en la pared vascular (Prieto et al., 2014).

Por otro lado, los desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina, la diabetes, dislipidemia y obesidad, conjuntamente conocidos como síndrome metabólico, representan factores de riesgo implicados en la patogénesis de enfermedad cardiovascular y de la disfunción eréctil, siendo la hiperglucemia, la dislipidemia y la hipertensión, los principales determinantes de riesgo de disfunción eréctil (Corona et al., 2023; Esposito & Giugliano, 2005). Una amplia evidencia experimental obtenida en tejido eréctil de pacientes diabéticos y en modelos animales de diabetes y de obesidad genética-síndrome metabólico, demuestran que la disfunción endotelial con alteración de la disponibilidad y las vías de señalización del NO, el incremento de la vasoconstricción, el estrés oxidativo y la inflamación son la causa de la disfunción vascular que subyace a la disfunción eréctil (Angulo et al., 2010; Azadzoï & Saenz de Tejada, 1992; Contreras et al., 2010; Sánchez et al., 2012a, 2014; Villalba et al., 2009; Wingard et al., 2007).

Las investigaciones realizadas en la última década indican que la disfunción mitocondrial y el estrés del RE están involucrados en las complicaciones vasculares de estados de resistencia a la insulina como la obesidad y la diabetes. El estrés del RE altera las vías de señalización de la insulina, la producción de NO y la vasodilatación, promueve estrés oxidativo, inflamación y apoptosis (Agouni et al., 2014; Galán et al., 2014; Özcan et al., 2004). La disfunción mitocondrial altera la función vascular mediante alteraciones en la biogénesis y en la bioenergética mitocondrial que conducen a estrés oxidativo y apoptosis (Tang et al., 2014). La hipótesis de la presente tesis es que la

alteración mitocondrial y el estrés del RE subyacen a la disfunción endotelial en la DE asociada a la enfermedad metabólica.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue determinar el papel de la disfunción mitocondrial y del estrés del RE en la patogénesis de la disfunción vascular peneana, como sustrato de la disfunción eréctil asociada a la obesidad. De forma específica, los objetivos de este trabajo han sido:

1. Determinar el papel de la mitocondria en la regulación del tono arterial peneano en condiciones fisiológicas, mediante el uso de activadores selectivos de los canales mitoK_{ATP} y la valoración de la participación del endotelio vascular, el NO y los ROS mitocondriales en los efectos vasoactivos de estos compuestos.
2. Determinar las características de la bioenergética mitocondrial en las arterias peneanas y de su posible regulación por el NO y por la activación de los canales mitoK_{ATP}.
3. Valorar el posible papel de la disfunción mitocondrial en la disfunción endotelial y vascular de las arterias peneanas en la obesidad y estados de resistencia a la insulina, utilizando un modelo en rata de obesidad inducida por dieta con el fin de determinar:
 - a. Las alteraciones de la función endotelial.
 - b. Los cambios en la producción de ROS mitocondriales
 - c. Las alteraciones en el perfil de la bioenergética mitocondrial
 - d. Las variaciones en los marcadores de estrés del RE.
4. Determinar los mecanismos de estrés del RE que subyacen a la disfunción endotelial y vascular peneana utilizando un modelo en rata de estrés del RE inducido por tunicamicina, para valorar:
 - a. Las alteraciones de la función endotelial.
 - b. Los cambios en la producción de ROS mitocondriales.
 - c. Las alteraciones en el perfil de la bioenergética mitocondrial.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El manejo de los animales en el estudio actual se realizó conforme a las normativas vigentes en materia de protección de animales destinados a la experimentación y otros propósitos científicos (R.D. 1201/2005). Todos los protocolos experimentales se ajustaron a las Directrices de la Unión Europea para el cuidado y protección de animales utilizados con fines científicos (Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE) y fueron aprobados por los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Complutense y la Comunidad de Madrid (Ref. PROEX 192.3/20).

Para la realización de los experimentos se han utilizado ratas Wistar de aproximadamente 4 meses (16-18 semanas). Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (40-60%) y luz 12:12 hr del ciclo luz/oscuridad en las instalaciones del animalario del departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, donde fueron alimentados con pienso y agua *ad libitum* hasta el momento de su sacrificio.

En el presente estudio se ha utilizado el modelo en rata de obesidad inducida por dieta para el estudio de la influencia de la obesidad en la función vascular peneana. Este modelo es desarrollado a través de la ingesta a demanda de una dieta alta en grasa (60%) *High Fat Diet* en ratas recién destetadas, suministrada durante 4 meses.

También se ha utilizado como modelo de obesidad genética la rata de Zucker obesa (RZO) y la rata Zucker lean (RZL) como control sano. Los RZO son animales que presentan una mutación en el gen que codifica para el receptor de leptina, lo que los lleva a perder la sensación de saciedad simulando un estado de ayuno constante, lo que provoca que se alimenten de manera descontrolada y desarrollen obesidad y síndrome metabólico. Para este estudio, se emplearon animales macho suministrados por Charles River Laboratories S.A. (Barcelona, España).

Como modelo de estrés del RE se utilizaron ratas Wistar de 4 meses en las cuales se inyectó una solución de tunicamicina (0,75 mg/kg) cada dos días durante dos semanas y en el caso de los controles, una solución del vehículo etanol (96°, 200 μM).

El mismo día del experimento los animales fueron pesados y se tomaron muestras de sangre para la determinación de los niveles de glucosa, colesterol total, triglicéridos y lactato mediante *kits* comerciales.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, método de sacrificio permitido ya que las ratas pesan menos de 500g según la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE o también previa anestesia con CO₂ y posterior decapitación en el caso de ratas con un peso mayor de 500g. Inmediatamente se procedió a la disección y montaje de las arterias peneanas dorsales.

3.2. MATERIAL DE LABORATORIO

3.2.1. Instrumentación general

Los aparatos utilizados para la preparación de soluciones y medios fisiológicos se enumeran a continuación:

- Agitadores magnéticos
- Balanza de precisión Sartorius
- pHmetro Crison
- Sistema de filtración Mili-Q (Milipore™)
- Termostato de inmersión B. Braun, modelo Thermomix 1420

3.2.2. Equipamiento para el registro de la tensión isométrica arterial

- Fuente de luz fría Leica, para la disección y montaje de las preparaciones arteriales
- Microscopio estereoscópico Leica
- Miógrafos vasculares dobles y de cuatro canales de 10 mL de capacidad con temperatura regulada y transductores de fuerza isométricos (*Danish Myo Technology, Dinamarca*).
- Powerlab, software informático de adquisición de datos para el registro digital de la fuerza en tiempo real.

3.2.3. Equipamiento para las medidas de bioenergética mitocondrial

- Analizador XF HS (Seahorse, Agilent)
- Placas de calibración y análisis de 8 pocillos

3.2.4. Equipamiento para las medidas de especies reactivas de oxígeno

- Fluorímetro (BMG Fluostar Optima)
- Placa multipocillos negra
- MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator 5µM
- Kit Amplex Red assay (Thermo Fischer Scientific Life Technologies SA, Madrid)

3.2.5. Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting

- Agitadores con distintas velocidades para las cubetas de Western Blotting.
- Centrífuga.
- Cubetas, sandwicheras perforadas y generador de campo ortogonal, para la transferencia proteica desde el gel a una membrana (Bio-Rad, Gran Bretaña).
- Cubetas y generador de campo para la separación proteica por electroforesis (Invitrogen).
- Geles de poliacrilamida NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gel (Invitrogen).
- Lector de absorbancia colorimétrica.
- Placas de 96 pocillos para la lectura de absorbancia.

3.3. REACTIVOS

Para la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes fármacos y reactivos:

- Acetilcolina (ACh) clorato (Sigma Aldrich, España).

- Ácido 5-Hidroxicanoico (5-HD) (Sigma Aldrich, España).
- Antimicina A (Sigma Aldrich).
- BMS-191095 (Sigma Aldrich, España).
- Cianuro de carbonilo 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) (Sigma Aldrich).
- Cocktail inhibidor de proteasas (Roche, España).
- Diazóxido (Sigma Aldrich, España).
- EGTA (Ácido etilenglicol bis (2-aminoetiléter) N,N,N',N' tetra-acético) (Sigma Aldrich, España).
- Femtol (Thermo Fischer Scientific, USA).
- Glibenclamida (Sigma Aldrich, España).
- Glicina (Thermo Fischer Scientific, USA).
- HEPES sal de sodio (Sigma Aldrich, España).
- L-Fenilefrina (Phe) hidrocloreto (Sigma Aldrich, España).
- LY-294002 hidrocloreto, inhibidor selectivo de PI3K (Tocris, Reino Unido).
- N^ω-Nitro-L-Arginina (L-NNA), inhibidor de NOS (Sigma Aldrich, España).
- Oligomicina (Sigma Aldrich, España)
- Ortovanadato sódico, inhibidor de fosfatasas (Calbiochem, Alemania).
- Patrón molecular, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad, Gran Bretaña).
- Reactivos A, B, C, Dc Protein Assay Reagents (Bio-Rad, Gran Bretaña).
- Rojo Ponceau S, solución al 0,1% (p/v) en 5% (v/v) de ácido acético (Sigma Aldrich, España).

- Rotenona (Sigma Aldrich).
- SDS 2X Solución al 20% (Euromedex, Francia).
- Tampón de carga, NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Tris HCl, Trizma® Base, 99,9% tritacion (Sigma Aldrich, España).
- Tween 20 (Euromedex, Francia).

3.4. SOLUCIONES

Todas las soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico, disueltas en agua desionizada de alta pureza (Mili-Q).

3.4.1. Soluciones fisiológicas

3.4.1.1. Solución salina fisiológica (PSS)

La composición de la solución salina fisiológica (PSS) utilizada fue la siguiente (en mM):

-Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027
-Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	25.00
-Cloruro cálcico (CaCl ₂)	1.50
-Cloruro magnésico (MgCl ₂)	1.20
-Cloruro potásico (KCl)	4.60
-Cloruro sódico (NaCl)	119.00
-Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.40
-Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11.00

La solución de PSS se preparó a diario diluyendo los reactivos en agua destilada y en continua agitación. Previamente a la adición de CaCl₂ se dejó oxigenar la solución durante 20 minutos con una mezcla de gases 95% O₂ – 5% CO₂ con el fin de optimizar el pH de esta a 7.4. La adición de EDTA tuvo como objetivo retrasar la oxidación e impedir el crecimiento bacteriano en la solución.

3.4.1.2. Solución salina rica en potasio (KPSS)

Para la elaboración de esta solución se sustituyeron cantidades equimolares de NaCl por KCl con respecto a la solución PSS normal, de igual forma que la solución anterior se preparó diariamente, y su composición fue la siguiente (en mM):

-Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027
-Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	25.00
-Cloruro cálcico (CaCl ₂)	1.50
-Cloruro magnésico (MgCl ₂)	1.20
-Cloruro potásico (NaCl)	119.00
-Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.40
-Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11.00

De igual forma, los reactivos se diluyeron conjuntamente en agua desionizada y en agitación continua, para después oxigenar con carbógeno durante 20 minutos antes de añadir el CaCl₂.

3.4.2. Tampones utilizados en Western Blotting

3.4.2.1. Tampón de lisis para la extracción de proteínas

-SDS	1%
-Ortovanato de sodio	1mM
-Tris HCl	10mM
-Antiproteasa	

3.4.2.2. Solución tampón para la electroforesis

-Solución 20X NuPAGE® de Invitrogen	25ml-
-------------------------------------	-------

Ajustando a un volumen final de 500 ml con agua desionizada

3.4.2.3. *Tampón de transferencia 10X*

-Tris base (250 mM)	30g
-Glicina (1920 mM)	144g
-SDS 20% (0,1% final) - 500 μ M	5ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

3.4.2.4 *Tampón de transferencia 1X*

-Tampón de transferencia 10X	100ml
-Metanol (20%)	200ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

3.4.2.5. *TBS-T 10X:*

-Tris base (200 mM)	24.2 g
-NaCl (615 mM)	80 g
-Agua desionizada	800 ml
-Ajustar el pH a 7,8	
-Tween 20 (1%)	10 ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

3.4.2.6. *TBS-T 1X*

-TBS-T 10X	100 ml
------------	--------

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada

3.4.2.7. Solución de strip

-Glicina (2 M)	150 g
-Agua desionizada	800 ml
-Tween 20 (1%)	10 ml-
- SDS 20% (1% final)	50 ml

Ajustando a un volumen final de 1 litro con agua desionizada y a un pH de 2,2.

3.4.3. Soluciones para los estudios morfológicos

3.4.3.1. Tampón fosfato salino (PBS)

Ajustando el pH a 7.4, su composición en concentraciones mM es:

-NaCl	137.0
-KCl	2.6
-KH ₂ PO ₄	1.5
-Na ₂ HPO ₄	8.1

3.4.4. Soluciones para estudios bioenergéticos mitocondriales

3.4.4.1. Medio Seahorse para análisis

Glucosa	5.0 mM
Piruvato	2.0 mM
Glutamina	2.0mM

3.5. METODOLOGÍA PARA LOS ESTUDIOS FUNCIONALES

3.5.1. Estudio de la reactividad arterial

3.5.1.1. Preparación y disección de las arterias

Para la realización de los experimentos se utilizaron arterias peneanas de ratas Wistar de 5 meses de edad, que fueron sacrificadas por dislocación cervical y posterior exanguinación. El pene y los cuerpos cavernosos se extrajeron de la rata recién sacrificada y se mantuvieron en PSS a 4-8°C para la inmediata disección de las arterias dorsales peneanas y los cuerpos cavernosos, con ayuda de un microscopio estereoscópico y una fuente de luz fría, retirando el tejido conjuntivo y adiposo (pene) y abriendo la túnica albugínea y extrayendo el cuerpo cavernoso con la ayuda de pinzas y tijeras de microdisección utilizadas habitualmente en cirugía oftálmica, obteniendo segmentos arteriales de segundo orden de la arteria peneana dorsal de aproximadamente 2 mm de longitud.

3.5.1.2. Montaje de las arterias en el miógrafo

Los segmentos de la arteria dorsal peneana fueron montados en paralelo en miógrafos microvasculares de dos y de cuatro canales insertando dos alambres de tungsteno de 40 μm de diámetro a través de la luz vascular, anclando los extremos de los mismos a unos tornillos. Cada uno de los canales que componen el miógrafo se encuentra conectado por un lado a un transductor de fuerza isométrico, que registra los cambios de tensión en las arterias, y por otro, a un tornillo micrométrico que regula la separación entre los alambres que atraviesan el segmento arterial y que permite el cálculo del diámetro arterial *in situ* (Mulvany & Halpern, 1977).

3.5.1.3. Normalización de las arterias

Tras el montaje en el miógrafo de los segmentos arteriales, estos se mantuvieron durante 30 minutos en PSS a una temperatura de 37°C y aireadas con carbógeno (95% O₂/ 5% CO₂) con el fin de mantener un pH de 7.4. Una vez estabilizados, se aplicó un diámetro óptimo de trabajo (l_1) para cada preparación. Para ello se calculó la relación existente entre la tensión en reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso para calcular la circunferencia interna (L_{100}) correspondiente a una presión transmural de 100 mm de Hg para un vaso relajado *in situ*. A continuación, para cada segmento, se aplicó giró el tornillo micrométrico hasta

conseguir una circunferencia interna $L_1=0.9 \times L_{100}$, circunferencia a la cual el desarrollo de la fuerza es máximo. El cálculo del diámetro luminal interno efectivo se determinó como $l_1 = L_1/\pi$ (Mulvany & Halpern, 1977).

3.5.1.4- Protocolos experimentales para los estudios funcionales

La integridad funcional del endotelio vascular fue puesta de manifiesto al añadir una dosis de acetilcolina (ACh) de 10 μM a cada segmento vascular previamente contraído con fenilefrina (Phe, 1 μM).

Con el objeto de caracterizar las funciones vasculares de los abridores de canales mitoK_{ATP} diazóxido y BMS191095, las vías de señalización que desencadena este último, así como las posibles alteraciones bajo condiciones de síndrome metabólico se realizaron los siguientes protocolos experimentales.

Se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) de diazóxido y BMS191095 en dosis semilogarítmicas crecientes (10^{-7} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M) en arterias previamente precontraídas durante 10 min con Phe. El tiempo de espera entre las dosis de ambos compuestos fue de aproximadamente 10 minutos.

Con el objetivo de evaluar el papel del endotelio vascular en la respuesta inducida por el BMS191095 en las arterias peneanas, se retiró previamente el endotelio de manera mecánica mediante la fricción de la luz vascular con un cabello humano en el caso de las arterias peneanas (diámetro 100-150 μM). Posteriormente, se comprobó la viabilidad de las preparaciones estimulándolas con KPSS durante 3 minutos. La ausencia de endotelio funcional se comprobó por la falta de relajación ante una dosis única del agonista endotelial ACh (10^{-5}) en arterias precontraídas con Phe (1 μM).

La participación del NO endotelial en las relajaciones dependientes del endotelio producidas por BMS191095, se determinó en presencia y en ausencia del inhibidor selectivo de la NOS L-NOARG (100 μM). La implicación de la vía PI3K/Akt fue determinada con LY-294002 (3 μM).

Se utilizaron los agentes bloqueantes de canales mitoK_{ATP} 5-HD (1 μM), de canales de K_{ATP} del plasmalema glibenclamida (0.1 μM) y de canales BK_{Ca} iberotoxina (30Nm) para confirmar la participación de dichos canales en la función vascular de BMS191095 y del donante de NO exógeno (SNAP) en CCR con dosis logarítmicas en el caso de BMS191095 (10^{-7} M –

10^{-5} M) y dosis semilogarítmicas en el caso de SNAP (10^{-8} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M). Así como, se estudió la acción del NO exógeno sobre los canales mitoK_{ATP} del MLV en arterias las cuales fue retirado mecánicamente el endotelio y en presencia/ausencia del bloqueante de mitoK_{ATP} 5-HD (1 μ M).

Se estudió la función vascular de BMS191095 en arterias peneanas de ratas OZR vs LZR en CCR con dosis logarítmicas de BMS191095 (10^{-7} M- 10^{-5} M).

Con el objeto de evaluar la función endotelial y las relajaciones por isoprenalina en el modelo de obesidad inducida por dieta, así como el papel de los ROS y los mtROS en dichas relajaciones arteriales se realizaron CCR de ACh (10^{-8} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M) y de isoprenalina (10^{-8} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M) en arterias peneanas HFD y STD. Tras ello, se incubaron durante 30 minutos con el antioxidante mitocondrial mitoTempo (0.03 μ M) y el inhibidor de la Nox apocinina (10 μ M) y se repitieron las CCR de ACh (10^{-8} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M).

Se estudió también la función vascular de BMS191095 en arterias peneanas de ratas HFD con dosis semilogarítmicas (10^{-8} M – 10^{-5} M).

Se evaluó la respuesta contráctil en el modelo de estrés del RE mediante CCR de Phe (10^{-8} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M), así como la función endotelial, las relajaciones por isoprenalina y la acción de los mtROS y ROS mediante CCR de ACh (10^{-8} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M) e isoprenalina (10^{-8} M – $3 \cdot 10^{-5}$ M) y posterior incubación durante 30 minutos con mitoTempo (0.03 μ M) o el inhibidor de la Nox apocinina (10 μ M).

3.6. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

3.6.1.1. MitoSOX

Se determinaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS – Reactive Oxygen Species) producidos por las mitocondrias en arterias y en cuerpos cavernosos (CC) de ratas Wistar preincubadas con BMS-191095 y en arterias y cuerpo cavernosos de ratas HFD comparados con sus respectivos controles.

Para ello se disecaron arterias peneanas dorsales y se dividieron en segmentos homogéneos, y de igual forma con cada uno de los dos cuerpos cavernosos de la rata. Las muestras fueron incubadas en los pocillos de una placa de multipocillos negra en PSS (80 μ L) y el indicador de superóxido mitocondrial MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator 5 μ M (20 μ L). Se dejó una primera columna de blanco y se colocaron las muestras a partir de la siguiente (ver imagen abajo). En el caso de las

arterias preincubadas con BMS-191095 (100 μM) se añadió 1 μL para obtener una concentración de 1 μM en cada pocillo tratado 15 minutos antes de llevar a cabo las medidas y a 37°C.

Una vez dentro de la mitocondria el MitoSOXTM Red es rápidamente oxidado por los radicales superóxido y exhibiendo una fluorescencia roja que es captada por el fluorímetro. El MitoSOXTM Red mitocondrial superoxide indicator tiene una longitud de onda de excitación/ emisión máxima de aproximadamente 510/580 nm. Las placas con las muestras se introducen para las medidas en el lector de fluorescencia BMG Fluostar Optima.

3.6.1.2. Amplex Red

Se determinaron los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en arterias peneanas y cuerpo cavernoso de ratas Wistar preincubadas con BMS-191095, en arterias y cuerpo cavernoso de ratas HFD y sus respectivos controles, así como en ratas tratadas con tunicamicina y sus controles. Para ello se utilizó un kit de Amplex Red assay (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies SA, Madrid, Spain). El reactivo Amplex Red es un sustrato fluorogénico para la peroxidasa, es decir, es una sonda altamente sensible y estable para el H_2O_2 . En presencia de peroxidasa de rábano (HRP), el reactivo Amplex Red reacciona en una estequiometría 1:1 con H_2O_2 para producir resorufina un compuesto altamente fluorescente.

Las muestras de tejido fueron equilibradas en solución salina PSS durante 30 minutos a temperatura ambiente y más tarde incubadas en ausencia (basal) y presencia del activador de canales mitoK_{ATP} BMS-191095 15 minutos antes de realizar las medidas. Tras ello, las muestras fueron transferidas a una placa multipocillo negra con Amplex Red (10 mM) y HRP (10 U·mL⁻¹), y algunas de ellas fueron estimuladas con NADPH (100 μM) justo antes de la determinación del H_2O_2 . La fluorescencia fue medida usando un fluorímetro (BMG Fluostar Optima), con un filtro de excitación de 544 nm y un filtro de emisión de 590 nm. La fluorescencia de fondo fue sustraída de los valores medidos a través de diferentes condiciones experimentales y la producción de H_2O_2 fue normalizada con el peso del tejido seco.

3.7. MEDIDAS DE LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS

Se realizaron medidas de la bioenergética mitocondrial en muestras de arterias peneanas dorsales aisladas, utilizando un analizador XF HS (Seahorse, Agilent) que permite determinar y analizar el consumo de O_2 (OCR) y la acidificación extracelular

(ECAR).

Se valoró el efecto del activador de los canales mitoK_{ATP}, del donante de NO SNAP y del bloqueo de la síntesis de NO endógeno con L-NOARG sobre la respiración mitocondrial. Asimismo, se determinaron las características de la bioenergética mitocondrial de las arterias peneanas de rata HFD y de ratas con estrés del RE comparadas con sus controles.

El día antes del experimento se dejaron las placas de calibración hidratándose con agua destilada a 37 °C. El día del experimento se retira el agua destilada de los pocillos de la placa de calibración y se añaden las siguientes cantidades de los moduladores de la respiración mitocondrial 20 µL de oligomicina, 22 µL de FCCP y 25 µL de rotenona/antimicina en los inyectores, para dar concentraciones finales de 50 µM, 50 µM y 10 µM respectivamente en el orden en que serán inyectados durante el análisis. La oligomicina actúa inhibiendo la síntesis de ATP (complejo V de la cadena de electrones), y es inyectada en primer lugar durante el ensayo. Su actuación resulta en una reducción del flujo de electrones a través de la ETC y ello conlleva una reducción en la respiración mitocondrial. El carbonil cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) es un agente desacoplante que colapsa el gradiente de protones y que altera el potencial de membrana mitocondrial. Se inyecta en segundo lugar tras la oligomicina. Como resultado el gradiente de electrones a través de ETC es desinhibido y el consumo de oxígeno a través del complejo 4 alcanza su máximo. Esta medida del OCR puede ser usada para calcular la capacidad respiratoria de reserva a través de la diferencia entre la respiración máxima y la respiración basal. La capacidad respiratoria de reserva es una medida de la capacidad de la célula de responder a un incremento a la demanda de energía o bajo condiciones de estrés. La tercera y última inyección es una mezcla de rotenona (un inhibidor del complejo I, y antimicina, un inhibidor del complejo III mitocondrial). La combinación de ambos agentes suprime la respiración mitocondrial y permite el cálculo de la respiración no-mitocondrial que tiene lugar fuera de la mitocondria.

Una vez extraídos, los segmentos arteriales fueron colocados inmediatamente en los pocillos de la placa de análisis y estabilizados con medio de Seahorse (mantenido a 37°C durante 20 minutos) en aquellas muestras basales y 160 µL del medio y 20 µL de BMS (100 µL).

Los datos del OCR fueron normalizados por área de arteria (según longitud y diámetro).

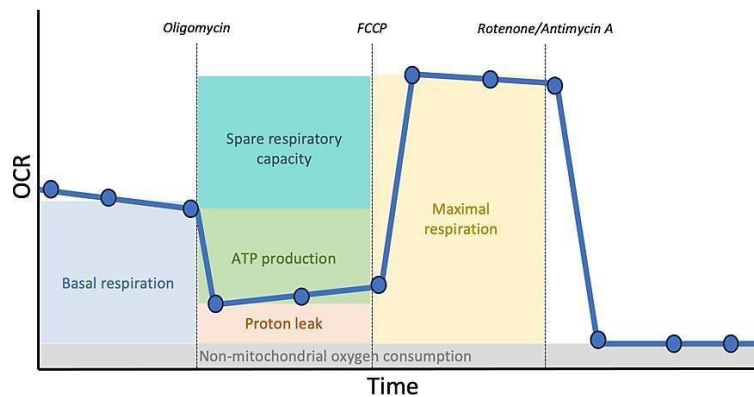


Figura 4. Representación esquemática de Mito Stress Test. El analizador Agilent Seahorse XFe24 mide los valores de OCR en estado basal y tras la inyección de oligomicina, FCCP y antimicina A/rotenona, con tres ciclos de medida en cada uno, tanto en el estado basal como en la inyección de cada uno de los compuestos. Los parámetros clave de la función mitocondrial tales como respiración basal, producción de ATP, fuga de protones, la capacidad respiratoria de reserva y la respiración no mitocondrial pueden ser interpretadas tal y como se muestra en la figura

3.8. ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

3.8.1.1. Preparación de geles

La separación de proteínas se llevó a cabo mediante el uso de geles de electroforesis de Tris/glicina SDS-Poliacrilamida, con distintas concentraciones de acrilamida. Antes de comenzar, es esencial verificar que las carcasas que sostienen los geles no presenten pérdidas de tampón de electroforesis. Posteriormente, se procede a la preparación de los geles separadores. Una vez incorporados a los moldes donde se permitirá la polimerización, se añade isopropanol al 60% para asegurar que los geles se ubiquen completamente rectos en la porción superior. Después de la gelificación, se elimina el isopropanol mediante lavado con agua destilada, se preparan los geles concentradores y se aplican sobre los separadores. Antes de que los geles concentradores polimericen, se colocan los peines para formar los pozos donde posteriormente se cargará la muestra. Los peines se retirarán previo a la carga de la muestra.

Gel separador de electroforesis de 6,5%

H ₂ O destilada	2,45 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30)%	2,18 ml
Tampon A	5,06 ml
APS 10%	56,2 µl
TEMED	28,1 µl

Gel separador de electroforesis

	Gel 8%	Gel 10%	Gel 12%
H₂O destilada	4,6 ml	4,0 ml	3,2 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida (30%)	2,7 ml	3,3 ml	4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS 10%	0,1 l	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	6 µl	4 µl	4 µl

Gel concentrador de electroforesis

Preparación de Tampón A y Tampón B

Tampón A		Tampón B	
Tris-HCL	90,1 g	Tris-HCL	30,2 g
SDS	2 g	SDS	2 g
Ajustar pH a 8,8 y H ₂ O destilada hasta 1 l		Ajustar pH a 6,8 y H ₂ O destilada hasta 1 l	

3.8.1.2. Preparación de muestras para electroforesis

Una vez determinada la concentración de proteínas mediante el espectrofotómetro, se realizan los cálculos necesarios para asegurar que en cada pocillo se agregue la misma cantidad de proteína en microgramos (μg), tampón de carga (1X) y tampón de lisis con inhibidor de proteasas. Se carga cada pocillo del gel concentrador. Para cada tipo de tejido, se ajusta la cantidad de proteína según lo necesario para llevar a cabo el análisis.

Tampón de carga	
SDS	2g
Trizma-base	8ml
β -mercaptoetanol	1ml
Azul de bromofenol	4mg
Glicerol	10ml
Ajustar pH a 6,8 y H ₂ O miliQ hasta 1l	

3.8.1.3. Electroforesis

En el proceso de separación de proteínas en los geles, previo a la carga, se introducen en las cámaras de electroforesis y se agregan 500 ml de tampón de electroforesis 1X (compuesto por 100 ml de tampón de electroforesis 5X diluido en 400

ml de agua destilada), asegurándose de que los geles estén completamente sumergidos en el tampón. Las muestras se incuban a 95°C durante 5 minutos y se llenan los pocillos con 16 µl de muestra, reservando el primer pocillo para cargar 5 µl de un marcador de pesos estándar para gel (Precision Plus Protein, cat 161-0374 Bio-Rad). Se coloca la tapa en la carcasa, la cual contiene los electrodos conectados directamente a una fuente de alimentación con un voltaje constante de 130V. Cuando el frente de migración de las proteínas casi alcanza el extremo del gel, se detiene la electroforesis para evitar que la muestra se escape por la parte inferior de los cristales.

Composición del tampón de electroforesis 5X

Tampón de electroforesis 5X	
Glicina	72 g
Tris-HCL	15 g
SDS	5 g
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 l	

3.8.1.4. *Transferencia del gel de electroforesis a una membrana*

Después de haber separado las proteínas según su peso molecular, es necesario transferirlas a un medio más manejable que un gel. En este caso, se emplearon membranas de PVDF (Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane, Millipore, Burlington, MA, EE. UU.). Este proceso se conoce como transferencia. Para llevar a cabo esta etapa, se prepara un gel absorbente (Extra thick Blot Paper, Bio-Rad, EE. UU.) que se sumerge en tampón de transferencia 1X y se mantiene idealmente en frío hasta su uso. Las membranas de PVDF se cortan a la medida deseada, ligeramente más grandes que el gel (9 x 6,5 cm), y se activan sumergiéndolas en metanol, agua y tampón de transferencia 1X, durante 5 minutos en cada uno de los líquidos y en ese orden. Después de este proceso, se coloca el papel absorbente en el sistema de transferencia, seguido de la membrana de PVDF, el gel y otra hoja de papel absorbente. En cada paso, es necesario presionar ligeramente cada componente con un rodillo para evitar la formación de burbujas de aire que puedan obstruir el paso de las proteínas hacia la membrana. Se cierra el equipo de transferencia (Trans-blot) y se conecta a una fuente de alimentación con un amperaje constante de 0,25 V durante 1,40 horas.

Composición tampón de transferencia 5X

Tampón de transferencia 5X	
Glicina	36,5 g
Tris-HCL	72,5 g
SDS	4,5 g
Ajustar H ₂ O destilada hasta 500 ml	

Composición tampón de transferencia 1X

Tampón de transferencia 1X	
Tampón transferencia 5X	40 ml
Metanol	200 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 l	

3.8.1.5. Inmunodetección

Después de completar la transferencia, se retiran las membranas y se descarta el sobrante. Las membranas se bloquean con BSA al 3% (3 g de BSA en 100 ml de TBS-TWEEN) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se procede a cortar las membranas, aislando las proteínas de interés y evitando cortarlas utilizando una guía de peso molecular. Cada fragmento de membrana se incuba con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. El anticuerpo se diluye en BSA-TWEEN al 1%, y la incubación se lleva a cabo durante una hora con agitación a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Al concluir la incubación con el anticuerpo primario, se retira y se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-TWEEN al 1% para eliminar el exceso de anticuerpo. Luego, se incuba la membrana con un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizan nuevamente tres lavados con TBS-TWEEN al 1%, cada uno con una duración de 5 minutos.

Composición TBS 10X

Tampón TBS 10X	
Tris-HCl	24,2 g
NaCl	80 g
Ajustar pH 7,6 y H ₂ O destilada hasta 1 l	

Preparación TBS-TWEEN

TBS-TWEEN 20	
TBS 10X	100 ml
TWEEN-20	1 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 l	

Relación de anticuerpos utilizados y sus diluciones

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
Rabbit Anti-Phospho-IRE1A α (Ser724)	1:1000	Abcam	Ab48187; RRID:AB_873899
Rabbit Anti-IRE1A α	1:1000	Cell Signaling Technology	3294S; RRID: AB_823545
Rabbit Anti-Phospho-PERK (Thr981)	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Sc-32577; RRID: AB_2293243
Rabbit monoclonal Anti-PERK (C33E10)	1:1000	Cell Signaling Technology	3192S; RRID: AB_2095847
Rabbit polyclonal to ATF6	1:1000	Abcam	Ab26085; RRID: AB_448977
Rabbit Anti-Phospho-e IF2 α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-101670; AB_631364
Rabbit Anti-ATF6 α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-22799; AB_2242950

3.8.1.6. Revelado

Una vez que las membranas han concluido el proceso de incubación, se procede al revelado. Para ello, se prepara el sustrato de revelado (Pierce ECL Western Blotting substrate, Thermo Scientific) en una dilución 1:1. Las membranas se incuban en 1 ml de ECL durante 4 minutos en la oscuridad debido a la fotosensibilidad del sustrato. Posteriormente, los fragmentos de membrana se colocan en un casete (Hypercassette, Amersham biociences GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido), situándolos entre papel de acetato transparente. Es crucial evitar la formación de burbujas entre la membrana y el acetato, ya que podrían interferir en la exposición.

El revelado se lleva a cabo en una cámara con luz roja, dado que las películas de revelado son sensibles a la luz (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm Corporation, Tokio, Japón). Las películas se colocan sobre el papel de acetato y se exponen cerrando la tapa del casete. El tiempo de exposición varía para cada proteína, generalmente oscilando entre 30 segundos y varias horas. Una vez que se considera que la exposición ha finalizado, se sumerge la película en una solución reveladora (dilución 1:10) (Developer G150, AGFA Healthcare NV) y luego en una solución fijadora (dilución 1:5) (Manual fixing bath, AGFA Healthcare NV).

Finalmente, se eliminan los residuos de las soluciones de revelado con agua y se permite que las películas se sequen, evitando tocar las áreas donde se encuentran las proteínas. Antes de almacenar los trozos de membrana del casete, se copian los marcadores de peso de las membranas en las películas secas para registrar la posición de las proteínas reveladas en relación con el peso indicado. Las membranas se conservan entre papel Whatman (3MM Chromatography paper, GE Healthcare 3030-931) para posibles incubaciones futuras con otros anticuerpos.

3.8.1.7. Cuantificación

La cuantificación de las proteínas se realiza midiendo la densidad óptica de la señal de cada muestra, escaneando las películas secas y marcadas con el marcador y los grupos de control (resolución 400 ppp, CanonScan 9900F, Canon, Tokio, Japón), utilizando el software ImageJ (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, NIH, EEUU). Una vez obtenido el escaneo de cada proteína, se define un rectángulo en ImageJ que contenga cada una de las bandas del mismo gel, ya que la densidad óptica de cada muestra debe analizarse a partir de la misma área. Se mide cada pocillo del gel y se toma una medida

de una zona limpia de la película para conocer la densidad óptica del fondo, corrigiendo así cada pocillo analizado restando este valor. La intensidad de señal de cada banda del gel, que representa cada una de las muestras, se compara con la señal obtenida para un control de carga, que suele ser α -tubulina o β -actina dependiendo del tejido.

3.9. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Muestras de tejido de pene que contienen arterias dorsales de ratas HFD y STD fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato de sodio (PBS) 0.1 M. Secciones de pene de rata HFD y STD embebidas en parafina (4 μ m) fueron desparafinadas y bloqueadas durante 10 minutos con peróxido de hidrógeno al 0.3% a temperatura ambiente. Después de la recuperación del antígeno y el bloqueo, las secciones se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios biotinilados anti-MnSOD (1/200) y anti-Nox4 (1/100). La tinción inmunoquímica se realizó usando peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con estreptavidina-biotina (EMD Millipore Corp., Darmstadt, Alemania) y se visualizó mediante incubación con 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich, Madrid, España). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris, deshidratadas y montadas. La colocación de Nox4 con eNOS en la pared de las arterias renales se obtuvo en secciones transversales de criostato de 5 μ m de grosor preincubadas en suero normal de cabra al 10% en PB que contenía Triton-X-100 al 0.3% durante 2-3 horas. La expresión de Nox4 se determinó mediante inmunofluorescencia incubando secciones peneanas de HFD y STD con un anticuerpo primario policlonal anti-Nox4 (1/100) (Santa Cruz Biotechnology, Quimigen, Madrid, España) y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-eNOS (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido a 1:400 durante 48 horas, lavados y permitiendo que reaccionaran con un suero secundario de cabra (Chemicon International Inc) (anticonejo para el Nox4) diluido 1:200 durante 3 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa Fluor 594 (rojo) y Alexa Fluor 488 (verde). Las diapositivas fueron cubiertas con un medio específico que contenía DAPI, que tiñe todos los núcleos celulares. Las observaciones se realizaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51). No se pudo detectar inmunorreactividad en secciones incubadas en ausencia de antiseros primarios. La preadsorción con proteínas Nox no mostró reactividad cruzada con los anticuerpos.

3.10. CÁLCULO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Las respuestas mecánicas de los vasos se expresan en términos de tensión activa, es decir, el incremento de la fuerza registrada (ΔF , en mN) dividido por dos veces la longitud del segmento arterial (a , en m):

$$\Delta T = \Delta F / 2a$$

La sensibilidad de los agonistas relajantes y contráctiles en las arterias se expresa como la concentración eficaz 50 (CE_{50}), que es la concentración del agonista que provoca el 50% del efecto máximo (E_{max}). El pD_2 es el valor negativo del logaritmo de la CE_{50} : $pD_2 = -\log [CE_{50}]$.

La concentración máxima de los agonistas se expresa en valores absolutos (Nm-1) o relativos, como porcentaje de la respuesta contráctil máxima inducida por un agonista en cada arteria o porcentaje de la respuesta al KPSS.

La CE_{50} se estimó determinando el ajuste ("fitting") de la respuesta del vaso según la ecuación de Hill:

$$R = \frac{R_{max} \cdot A(M)^n}{A(M)^n + CE_{50}(M)^n}$$

Donde R es la respuesta máxima del vaso para la concentración A (M) del agonista, R_{max} es la respuesta máxima del vaso para el agonista, y n es un parámetro de ajuste de la curva o "*Coeficiente de Hill*". El ajuste a la ecuación se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8.0. Las diferencias de estimar la CE_{50} por interpolación frente al ajuste de una curva son insignificantes, pero la ventaja de usar el ajuste no lineal es la posibilidad de estimar el Coeficiente de Hill, que puede proporcionar información sobre el carácter de la respuesta del vaso.

Todos los resultados obtenidos se expresan como media \pm error estándar de la media (E.S.M.). La evaluación estadística de las diferencias entre medias se realizó utilizando el test t de Student para observaciones pareadas y no pareadas. Se consideró significativo un nivel de probabilidad inferior al 5% ($P < 0.05$).

IV. RESULTADOS

4.1. CANALES MITOK_{ATP} EN LAS ARTERIAS PENEANAS

4.1.1. La activación farmacológica de los canales mitoK_{ATP} induce vasodilatación de las arterias peneanas pequeñas

El diámetro normalizado interno de la luz vascular, I_1 , de las ramas de segundo orden de la arteria dorsal peneana, fue de 163 ± 10 mm (n=38), y las respuestas contráctiles máximas provocadas por el KPSS y las relajaciones dependientes del endotelio evocadas por la ACh alcanzaron una media de 1.00 ± 0.13 Nm⁻¹ (n=38) y $57 \pm 7\%$ (n= 38) de la contracción provocadas por la Phe (1 μM), respectivamente. Los activadores selectivos de los canales mitoK_{ATP} BMS191095 y diazóxido indujeron relajaciones dependientes de la concentración de las arterias peneanas (**Figura 1**), siendo el BMS aproximadamente un orden de magnitud más potente que el diazóxido (valores de $pD_{26.08} \pm 0.17$, n=15 y 5.22 ± 0.16 , n=14, $p < 0.001$, prueba t de Student no pareada).

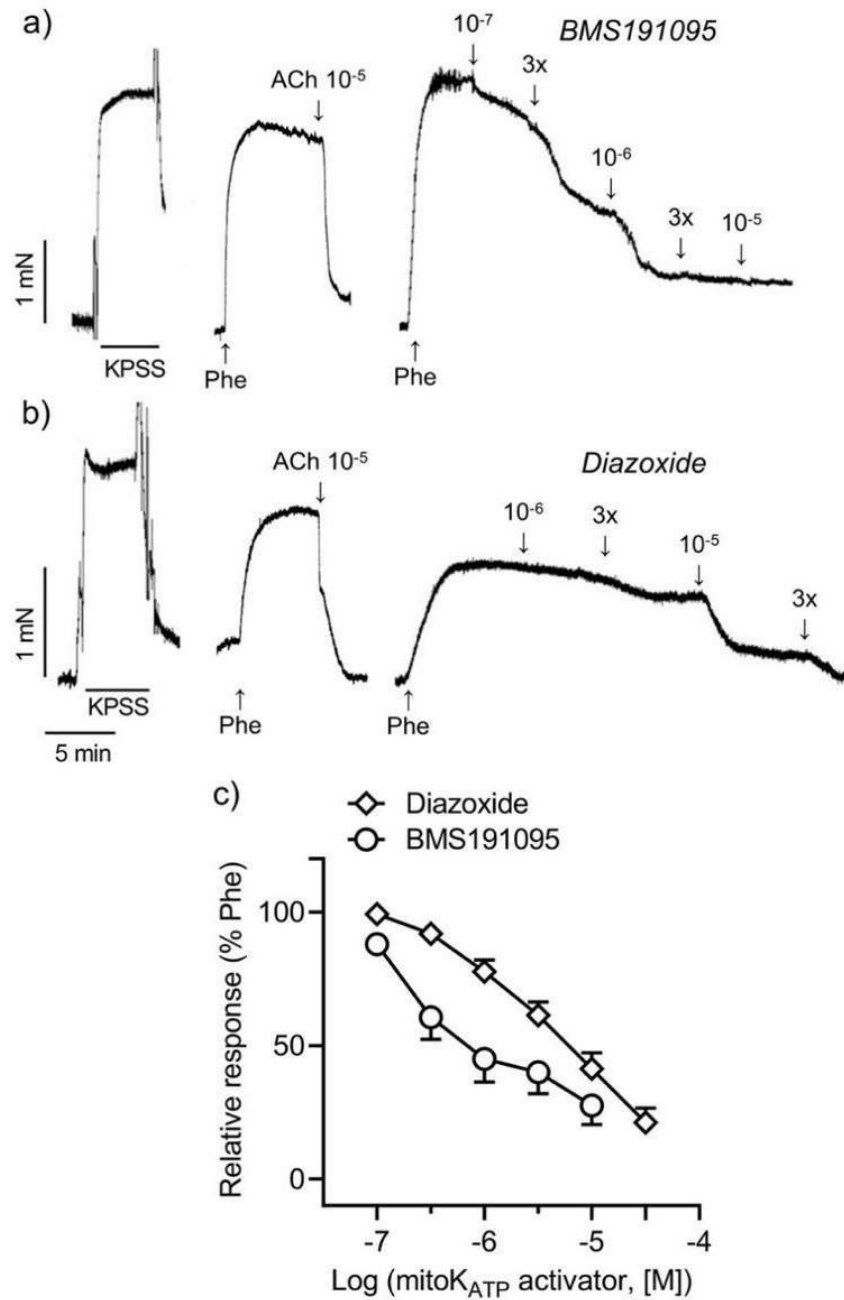


Figura 1. Los abridores de canales mitoK_{ATP} inducen relajación en arterias peneanas con endotelio intacto. (a,b) Los registros originales muestran relajaciones dosis dependientes de (a) BMS191095 y (b) diazóxido en segmentos de arterias peneanas dorsales de rata, y las relajaciones inducidas por el agonista endotelial ACh. (c) Media de los efectos vasodilatadores de BMS191095 y diazóxido. Los resultados se expresan como el porcentaje de incrementos en la tensión producidos por la Phe (1 μ M). Los datos se muestran como la media \pm ESM de 16 arterias (n=8 ratas) para BMS191095 y 22 arterias (n=12) para diazóxido.

4.1.2. El abridor de canales mitoK_{ATP} BMS191095 activa la vía endotelial PI3K/eNOS/NO en las arterias peneanas

Para evaluar la implicación del endotelio en la vasodilatación inducida por los abridores de canales mitoK_{ATP} en las arterias peneanas, se examinaron los efectos de la eliminación del endotelio y de los inhibidores de las enzimas NOS y PI3K en la vasodilatación provocada por BMS191095. La eliminación mecánica de las células endoteliales abolió las relajaciones para la ACh y redujo considerablemente las relajaciones del BMS191095 (**Figura 2a**, Tabla 1). Del mismo modo, la inhibición de la NOS con L-NOARG (**Figura 2b**, tabla 1) o el bloqueo de PI3K con LY294002 (**Figura 2c**) redujeron notablemente las relajaciones inducidas por BMS191095 en las arterias peneanas, lo que indica la participación de la vía endotelial Akt/eNOS/NO. El componente dependiente de NO de la relajación inducida por BMS191095 estuvo alterado en arterias peneanas de ratas genéticamente obesas (RZO) (**Figura 2d**).

BMS191095				
	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (% Phe)	<i>I</i> ₁	<i>n</i>
Control	6.16 ± 0.37	79 ± 7	154 ± 15	6
- Endotelio	4.64 ± 0.21**	44 ± 15*	171 ± 14	8
Control	5.57 ± 0.27	67 ± 13	184 ± 43	5
+ L-NOARG	4.68 ± 0.15*	31 ± 6*	163 ± 10	5
Control	5.76 ± 0.22	72 ± 6	174 ± 12	6
+ LY294002	5.06 ± 0.17**	43 ± 10*	195 ± 12	5

Tabla 1. Efecto de la retirada de endotelio y de los inhibidores de NOS L-NOARG (100 µM) y de PI3K LY-294002 (3 µM) sobre la sensibilidad y las respuestas máximas del abridor de canales mitoK_{ATP} BMS191095 en arterias peneanas. Los datos son representados como las medias ± SEM; n es el número de arterias (1-2 por animal). Los resultados son expresados como valores relativos, como porcentajes de la respuesta contráctil a la fenilefrina (Phe). *pD*₂ es -log (EC₅₀), siendo EC₅₀ la concentración de agonista dado el 50% de la respuesta máxima (*E*_{max}). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante prueba t-Student no pareado. *P < 0.05; **P < 0.01 vs. control.

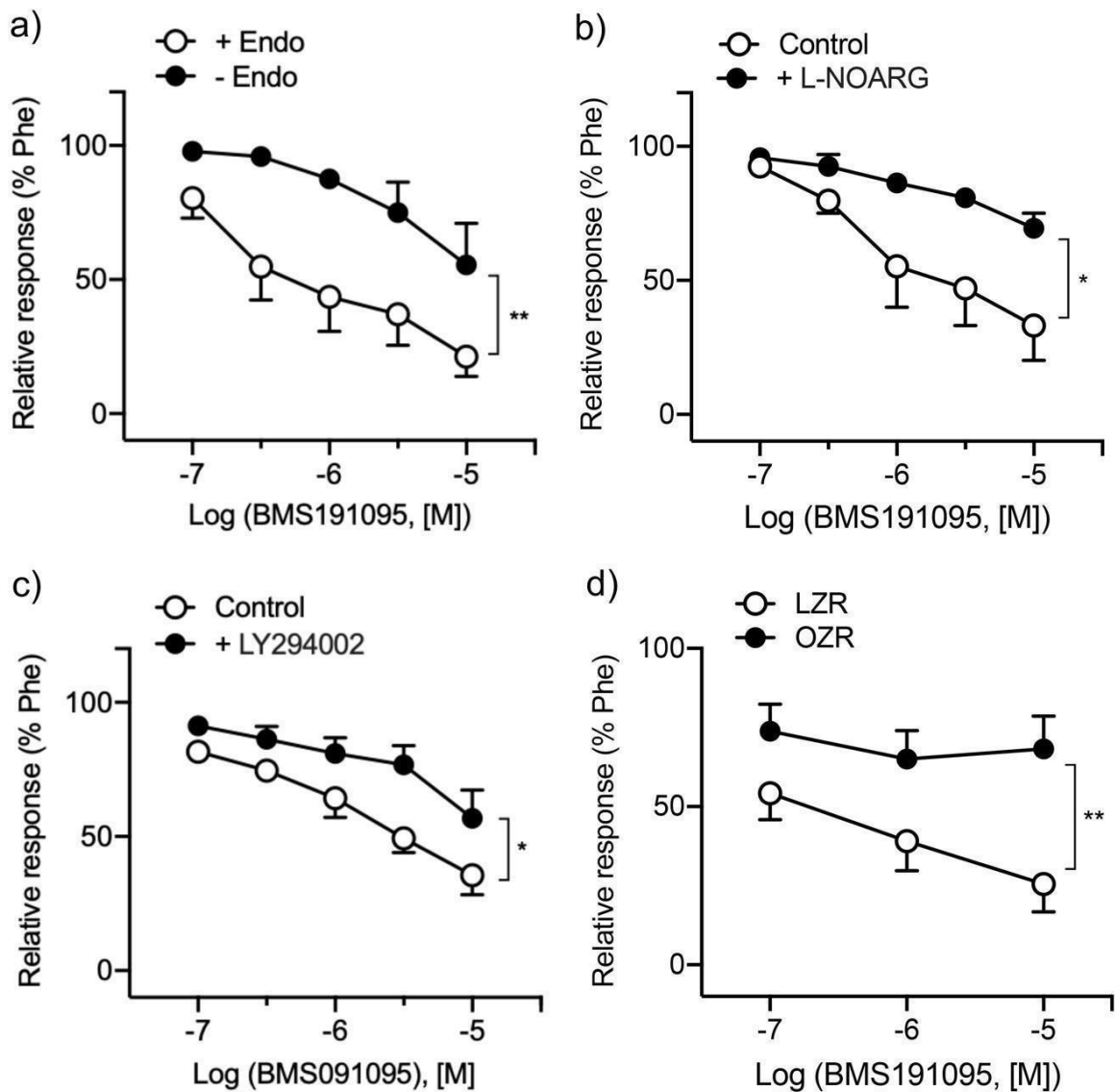


Figura 2. La vía endotelial PI3K/eNOS/NO participa en la respuesta vasodilatadora inducida por la activación del canal mitoK_{ATP} en las arterias del pene. Relajaciones medias de BMS191095 y efectos de la eliminación mecánica del endotelio (a), el bloqueo de la NOS tras el tratamiento con L-NOARG (100 μ M) (b), y el bloqueo de PI3K con LY-294002 (3 μ M) (c). Relajaciones medias con BMS191095 en arterias peneanas de ratas Zucker obesas resistentes a la insulina (OZR) comparadas con las de arterias de controles delgados (LZR). En b, c y d se confirmó la existencia de endotelio funcional mediante las relajaciones inducidas por 10 μ M de ACh que se suprimieron en a. Los resultados se expresan como porcentaje de los aumentos de tensión inducidos por Phe (1 μ M). Los datos se muestran como los valores medios \pm ESM de (a) 6 arterias control y 8 arterias denudadas de endotelio de n = 5 ratas. de n = 5 ratas, (b) 5 arterias control y 5 tratadas con L-NOARG de n = 5 ratas, (c) 6 arterias control y 5 tratadas con PI3K de n = 5 ratas y (d) 8 arterias control y 9 arterias de 4 LZR y 5 OZR. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, significativamente diferente de las arterias de control, prueba t de Student para observaciones no pareadas.

4.1.3. Efecto de los bloqueantes de los canales K_{ATP} y BK_{Ca} sobre las relajaciones del BMS191095 y del NO exógeno

El bloqueo de los canales mito K_{ATP} con 5-HD (1 μ M) inhibió la respuesta vasodilatadora inducida por el BMS191095 en arterias peneanas con endotelio intacto (**Figura 3a**), mientras que el pretratamiento con el bloqueante de los canales K_{ATP} de la membrana plasmática, la sulfonilurea glibenclamida (0.3 μ M), también inhibió en gran medida las respuestas relajantes al BMS191095 (**Figura 3b**). Dado que la activación de los canales mito K_{ATP} libera NO endotelial en las arterias peneanas, evaluamos además si el NO está implicado en las relajaciones del abridor de los canales mito K_{ATP} BMS191095. El pretratamiento con 5-HD o glibenclamida inhibió la vasodilatación provocada por el donante de NO SNAP (**Figuras 3 c, d**, Tabla 2), y el bloqueante del mito K_{ATP} 5-HD también tuvo un gran efecto inhibitorio sobre las relajaciones SNAP en arterias sin endotelio (**Figura 3E**; Tabla 2), lo que indica que el NO activa los canales mito K_{ATP} del MLV para inducir la relajación.

Tabla 2. Efecto del bloqueante de canales de mito K_{ATP} 5-HD (1 μ M) sobre arterias con y sin endotelio, del bloqueante de canales sarc K_{ATP} glibenclamida (0.3 μ M) y del bloqueante de canales BK_{Ca} iberitoxina (30 nm) sobre la sensibilidad y respuesta máxima del donante de NO exógeno SNAP en arterias peneanas.

	SNAP			
	pEC_{50}	E_{max} (% Phe)	I_1	n
Control	6.67 \pm 0.22	96 \pm 4	188 \pm 9	6
+ 5-HD	5.73 \pm 0.28*	69 \pm 13*	165 \pm 5	5
Control (-E)	6.84 \pm 0.18	93 \pm 3	165 \pm 3	5
+ 5-HD (-E)	5.98 \pm 0.16*	69 \pm 9*	165 \pm 3	5
Control	6.41 \pm 0.19	95 \pm 4	135 \pm 13	7
+ Glibenclamida	5.90 \pm 0.18**	87 \pm 5	135 \pm 13	7
Control	6.22 \pm 0.13	99 \pm 1	151 \pm 14	8
+ Iberitoxin	5.31 \pm 0.17*	80 \pm 7*	151 \pm 14	8

Los datos representan la media \pm SEM de n que es el número de arterias (1-2 por animal). Los resultados se expresan como porcentajes de la respuesta contráctil a la fenilefrina (Phe). pD_2 es $-\log(EC_{50})$, siendo EC_{50} la concentración de agonista dado el 50% de la respuesta máxima (E_{max}). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante prueba t-Student no pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. control.

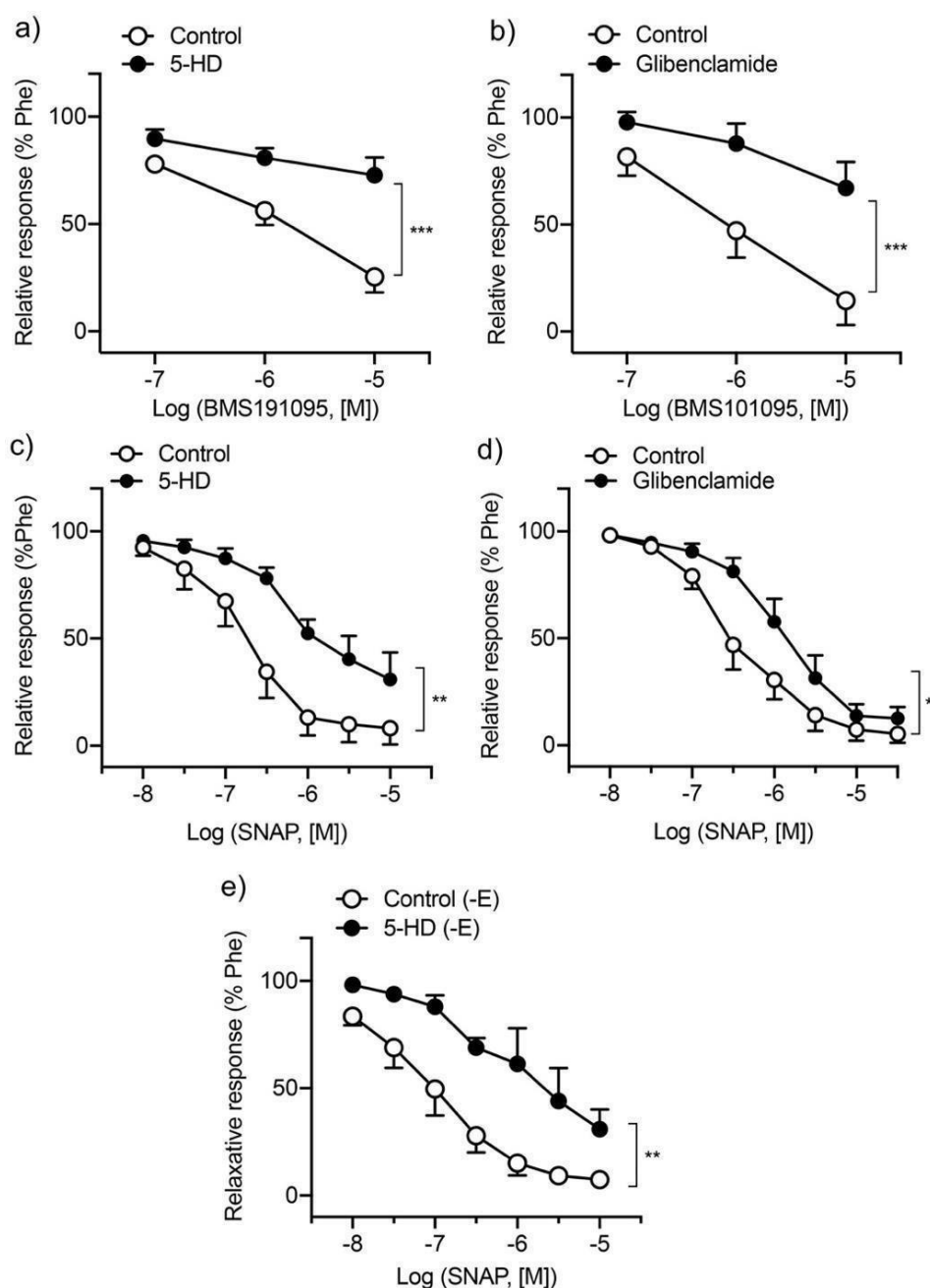


Figura 3. Efectos de los bloqueantes de los canales K_{ATP} sobre la respuesta vasodilatadora inducida por la activación de los canales mito K_{ATP} y por el donante de NO SNAP. Relaxaciones del BMS191095 en arterias control y arterias tratadas con los bloqueantes de los canales K_{ATP} 5-HD (1 μ M) (a) y glibenclamida (0,1 μ M) (b). Relaxaciones del donante de NO SNAP en arterias peneanas con endotelio intacto (c,d) y endotelio denudado (e), en ausencia y en presencia de (c,e) 5-HD (1 μ M) y (d) glibenclamida (0,1 μ M). Los resultados se expresan como porcentaje de la precontracción inducida por Phe (1 μ M). Los datos se muestran como la media \pm ESM de (a) 5 arterias control y 5 arterias tratadas con 5-HD de n = 5 ratas; (b) 6 arterias de control y 7 arterias tratadas con glibenclamida de n = 5 ratas; (c) 5 arterias de n = 5 ratas; (d) 7 arterias de n = 5 ratas; (e) 5 arterias de n = 5 ratas. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, significativamente diferentes de las arterias de control, prueba t de Student para observaciones no apareadas (a,b) o apareadas (c-e).

Los canales BK_{Ca} presentes en el MLV están implicados en las relajaciones mediadas por NO del MLV de las arterias peneanas (Prieto et al., 2006a). Por lo tanto, a continuación, examinamos los efectos del bloqueo selectivo de los canales BK_{Ca} sobre la vasodilatación inducida por la activación de los canales mito K_{ATP} y el NO exógeno. El pretratamiento con iberiotoxina (30 nM) inhibió las relajaciones provocadas por el BMS191095 en las arterias peneanas (**Figura 4a**, Tabla 2). El pD_2 y la E_{max} fueron de 6.38 ± 0.15 y $83 \pm 8\%$, $n=6$, en las arterias control, y de 5.58 ± 0.26 , $n=6$, $p < 0.05$ frente al control, y $56 \pm 10\%$, $n=6$, $p < 0.05$ frente al control, en las arterias tratadas con iberiotoxina. La iberiotoxina también inhibió significativamente las relajaciones provocadas por el donante de NO SNAP en las arterias peneanas pequeñas (**Figura 4b**, Tabla 2).

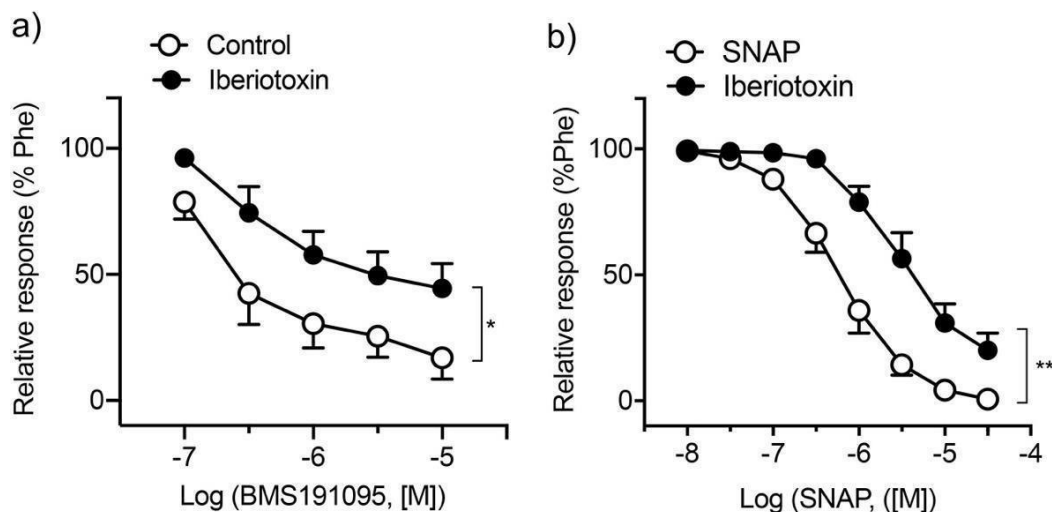


Figura.4. El bloqueo de los canales BK_{Ca} inhibe las relajaciones inducidas por la activación de los canales mito K_{ATP} y por el NO exógeno. Relajaciones medias del BMS191095 (a) y del donante de NO SNAP (b) en ausencia y en presencia del bloqueante del BK_{Ca} iberiotoxina (30 nM). Los resultados se expresan como porcentaje del aumento de la tensión inducido por Phe (1 μ M). Los datos se muestran como los valores medios \pm SEM de (a) 6 arterias control y 6 tratadas con iberotoxina de $n = 5$ ratas; (b) 8 arterias de 5 ratas. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significativamente diferente de las arterias de control, prueba t de Student para observaciones no apareadas (a) o apareadas (b).

4.1.4. Efectos de la activación de los canales mitoK_{ATP} sobre la bioenergética mitocondrial de las arterias peneanas

Los efectos de la activación del canal mitoK_{ATP} sobre la tasa de consumo de O₂ (OCR), como indicador de la respiración mitocondrial, y la tasa de acidificación extracelular (ECAR), que da información sobre la glucólisis, se midieron en microarterias peneanas aisladas mediante la "*Prueba de estrés mitocondrial*" y el analizador de flujo extracelular Seahorse (Sure et al., 2018). El tratamiento con BMS191095 (1 μM), disminuyó el perfil bioenergético de las arterias peneanas (**Figura 5a**), y redujo significativamente la respiración basal (**Figura 5b**) y la producción de ATP (**Figura 5c**) sin afectar de forma significativa la respiración máxima (**Figura 5d**) ni la reserva respiratoria (**Figura 5e**). La medición simultánea de ECAR, demostró una disminución paralela en ECAR junto con la disminución de OCR en las arterias peneanas después del tratamiento con BMS191095 (**Figura 5f**).

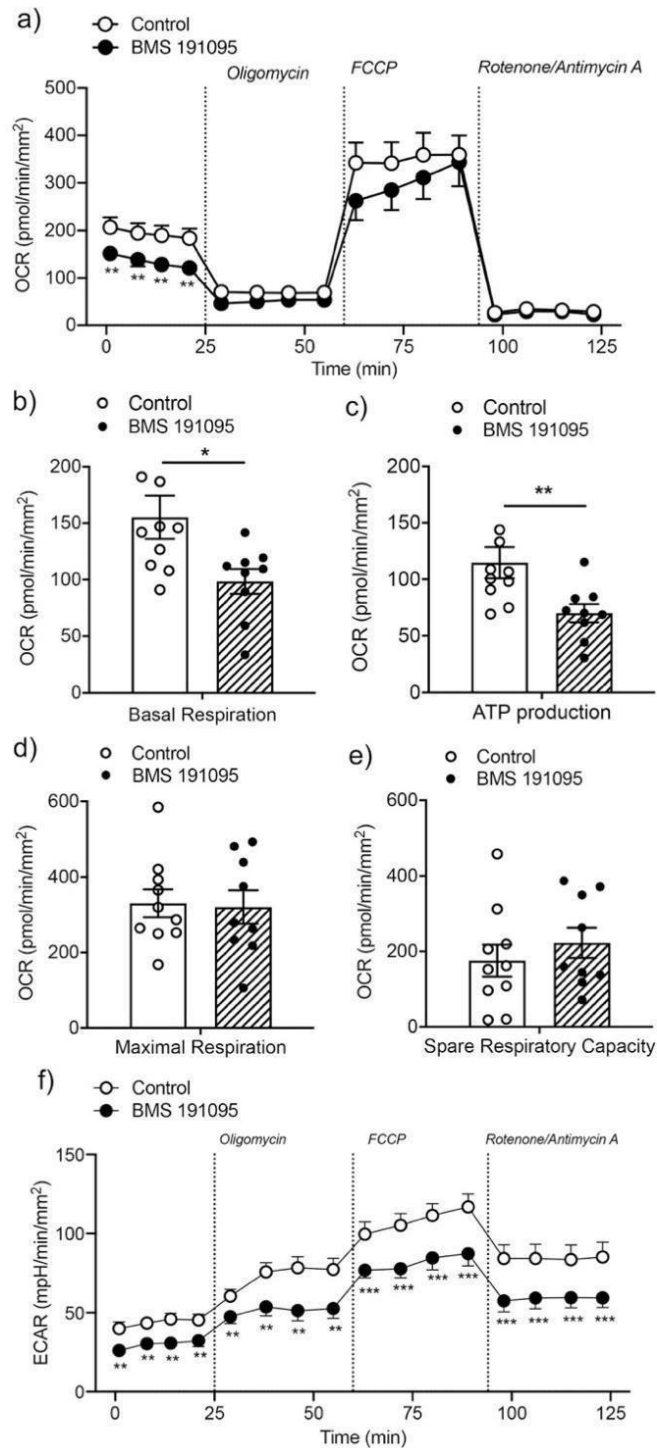


Figura 5. La activación del canal mitoK_{ATP} reduce el perfil bioenergético mitocondrial de las arterias peneanas. Se realizó la “Prueba de estrés mitocondrial” en segmentos aislados de la arteria dorsal del pene de rata para medir la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (a-e) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) (f) de arterias peneanas control y tratadas con BMS191095 (0.3 μM), tras la inyección secuencial de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A. Los parámetros bioenergéticos mitocondriales se muestran como respiración basal (b) oxígeno consumido para la producción de ATP (c), respiración máxima (d), reserva respiratoria (e) y ECAR (f), indicador de la actividad glucolítica. Los resultados se expresan como valores de pmol O₂/min (OCR) o milipH/min (ECAR) y referidos a la superficie del segmento arterial en mm². Los datos se muestran como medias ± ESM de 9 arterias de control y 9 tratadas con BMS191095 de n = 5 ratas. **P < 0.01, ***P < 0.001, significativamente diferente de las arterias de control, test t de Student para observaciones no apareadas.

Dado que la activación de los canales mitoK_{ATP} libera NO del endotelio de las arterias peneanas, se evaluaron los efectos del bloqueo NO endógeno sobre el efecto de activación de los canales mitoK_{ATP} en la bioenergética mitocondrial. El bloqueo de la NOS con L-NOARG (100 μM) no afectó ni el OCR ni el ECAR en las arterias peneanas (**Figura 6 a,b**).

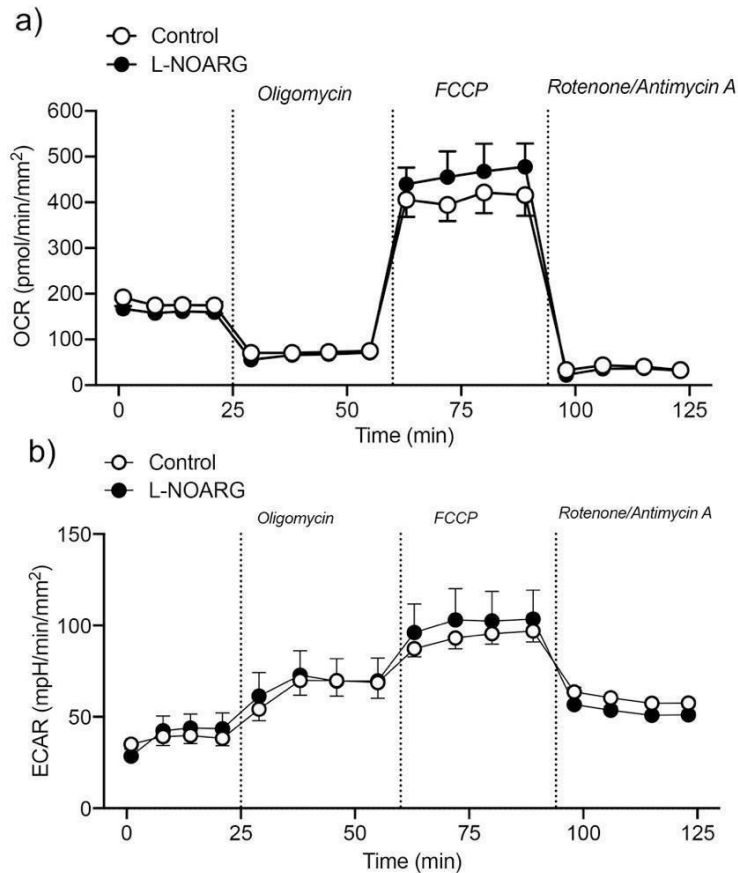


Figura 6. Efecto del bloqueo de la NOS en la bioenergética de las arterias peneanas. La “Prueba de estrés mitocondrial” se realizó en segmentos recién aislados de la arteria dorsal peneana de rata para medir la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (a) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) (b) de arterias de control y arterias tratadas con BMS191095 (0.3 μM) en condiciones de bloqueo de la NOS tras la inyección secuencial de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A.

En condiciones de bloqueo de la NOS, sin embargo, el BMS191095 no redujo ni la respiración basal (**Figura 7 a, b**) ni el consumo de oxígeno para la síntesis de ATP (**Figura 7 a,c**) pero la ausencia de NO endógeno desenmascaró un efecto inhibitor del BMS191095 independiente de NO sobre la respiración máxima y sobre la reserva respiratoria (**Figura 7 d, e**).

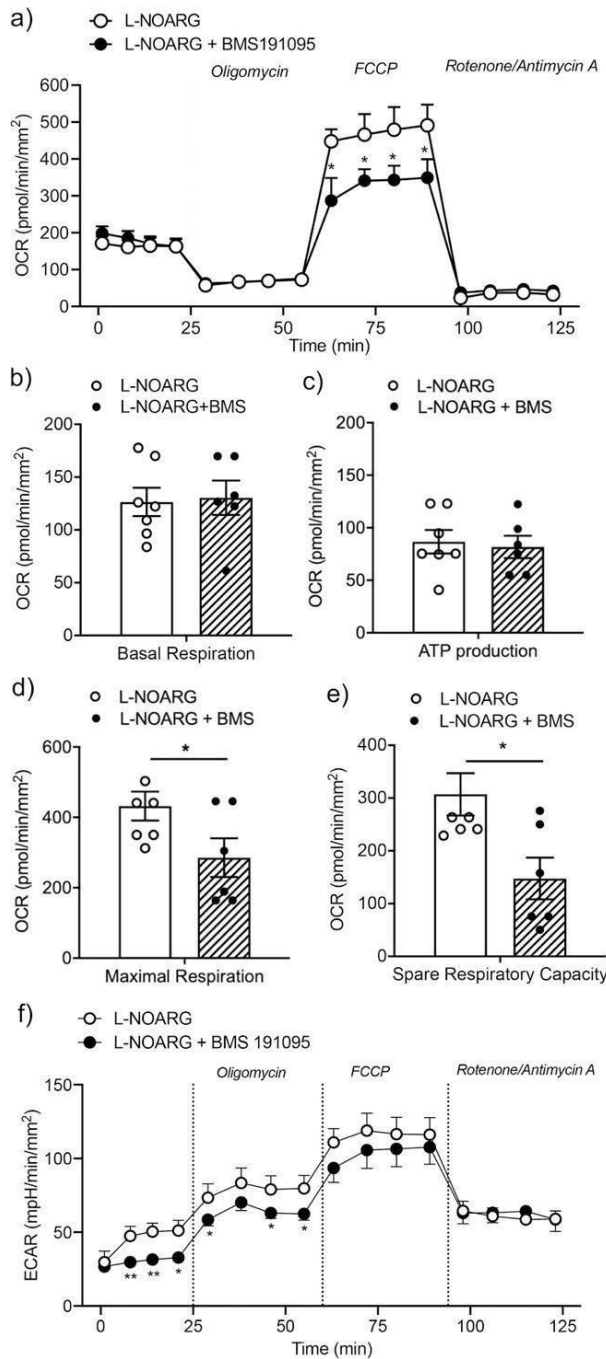


Figura 7. El bloqueo de la activación de la NOS redujo parcialmente los efectos inhibitorios de la activación del canal mitoK_{ATP} sobre la respiración mitocondrial de las arterias peneanas. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) (a-e) y tasa de acidificación extracelular (ECAR) (f) de arterias peneanas tratadas con BMS191095 (0.3 μ M) y sin tratar en condiciones de bloqueo de la NOS tras la inyección secuencial de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A. Los parámetros bioenergéticos mitocondriales son mostrados como respiración basal (b) oxígeno consumido para la producción de ATP (c), respiración máxima (d), capacidad respiratoria de reserva (e) y ECAR (f) indicador de la actividad glucolítica. Los resultados se expresan como valores de pmol O₂/min (OCR) o milipH/min (ECAR) y se refieren a la superficie del segmento arterial en mm². La enzima NOS se inhibió mediante tratamiento con 100 μ M de L-NOARG tanto en las arterias control como en las tratadas con BMS. Los datos son mostrados como las medias \pm ESM de 6 arterias control y 6 tratadas con BMS191095 de n = 4 ratas.
*P < 0.05, significativamente diferente de las arterias no tratadas con BMS191095, prueba t de Student para observaciones no apareadas.

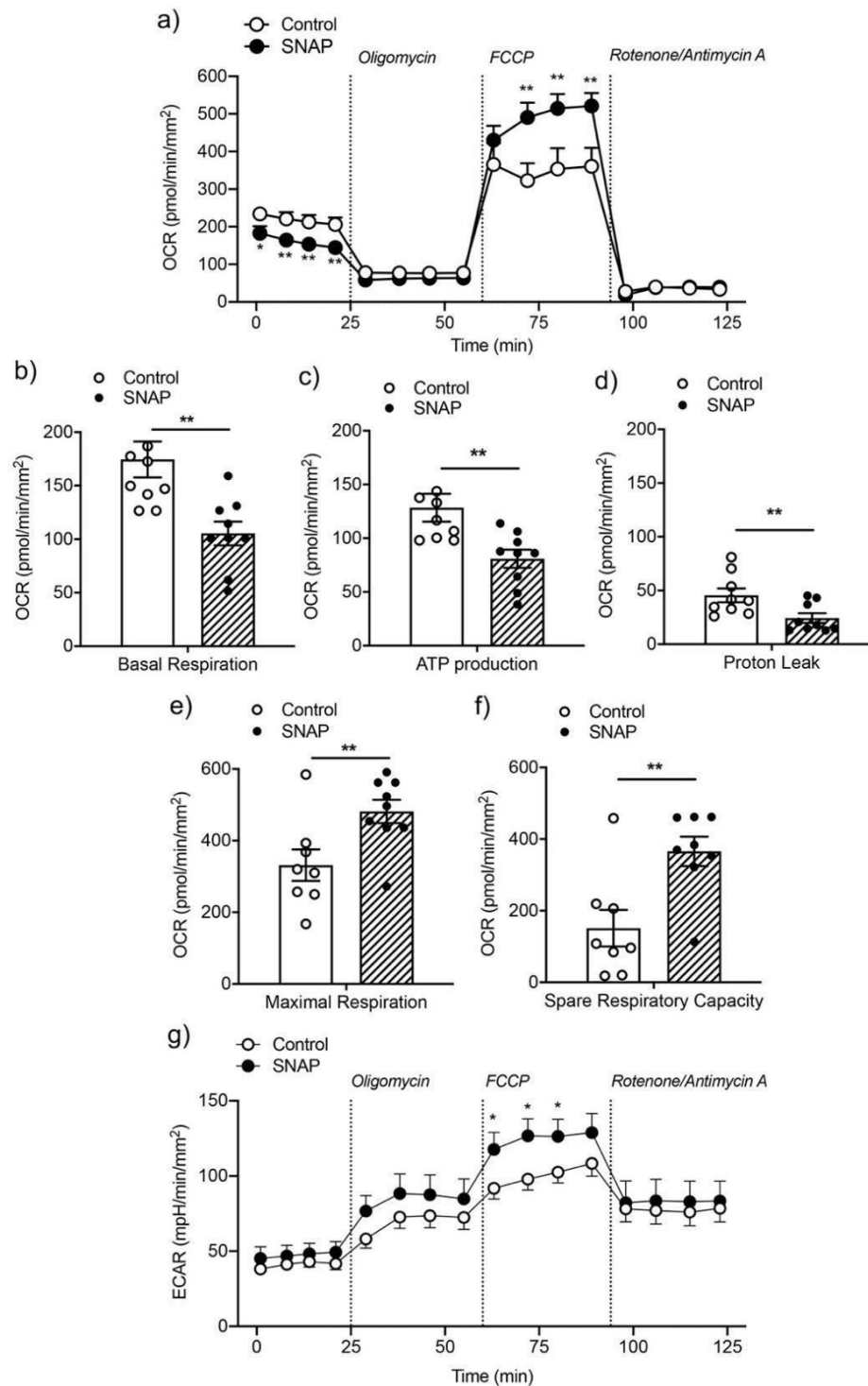


Figura 8. El donante de NO SNAP tuvo efectos duales sobre el perfil de respiración mitocondrial de las arterias peneanas. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) de arterias peneanas control y tratadas con SNAP (30 μ M), tras la inyección secuencial de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A (a). Los parámetros bioenergéticos mitocondriales son mostrados como respiración basal (b), oxígeno consumido para la producción de ATP (c) fuga de protones (d), respiración máxima (e), capacidad respiratoria de reserva (f) y ECAR (g) indicador de la actividad glucolítica. Los resultados se expresan como valores de pmol O₂/min y referidos a la superficie del segmento arterial en mm². Los datos se expresan como medias \pm ESM de 10 arterias control y 10 tratadas con SNAP de n = 8 y n = 5 ratas, respectivamente.

P < 0.01, *P < 0.001, significativamente diferente de las arterias de control, test t de Student para observaciones no apareadas.

Los efectos del NO exógeno fueron valorados sobre la bioenergética mitocondrial. En presencia del donante de NO SNAP (10 μ M), el perfil bioenergético de las arterias peneanas se redujo significativamente (**Figura 8a**), y el análisis de las mediciones de OCR durante la “Prueba de estrés mitocondrial” mostró valores significativamente reducidos en comparación con los controles para la respiración basal (**Figura 8b**), el consumo de oxígeno para la producción de ATP (**Figura 8c**) y la fuga de protones (**Figura 8d**), mientras la respiración máxima (**Figura 8e**) y la capacidad respiratoria de reserva (**Figura 8f**) y la ECAR (**Figura 8g**) estuvieron significativamente aumentadas en las arterias peneanas.

4.1.5. La activación del canal mitoK_{ATP} reduce la producción de ROS mitocondriales en arterias peneanas

La determinación de la producción mitocondrial de ROS mediante fluorescencia mitoSOX mostró una atenuación significativa de la fluorescencia en segmentos de pequeñas arterias peneanas tras el tratamiento con BMS191095 (1 μ M) en comparación con los controles (**Figura 9a**), lo que indica una reducción de los niveles de ROS en el tejido eréctil tras la activación de los canales mitoK_{ATP}. El efecto inhibitor del activador de canales mitoK_{ATP} BMS191095 sobre la generación de ROS mitocondriales persistió en condiciones de bloqueo de la NOS (**Figura 9b**).

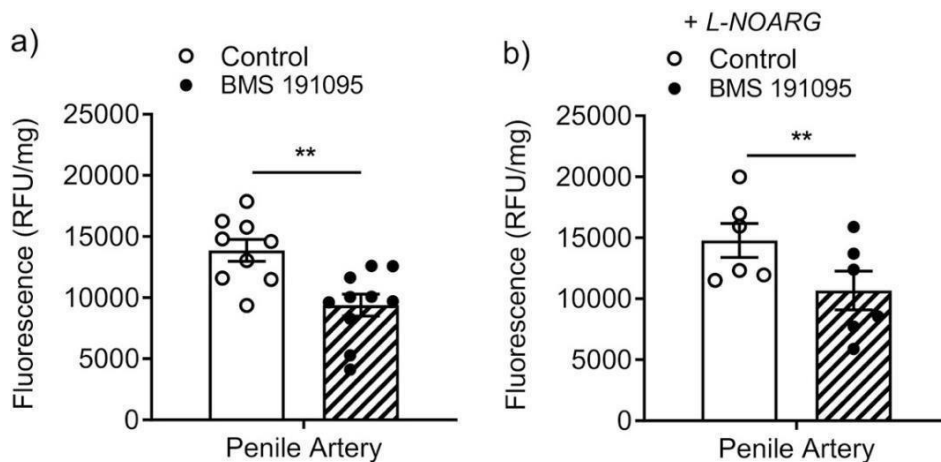


Figura 9. La activación del canal mitoK_{ATP} reduce los niveles de ROS mitocondriales en arterias peneanas. La producción de superóxido mitocondrial se reduce significativamente en segmentos de arterias peneanas tratados con BMS191095 respecto a sus controles (a). Así como en presencia del inhibidor de la NOS L-NOARG (100 μ M) y tratadas con BMS191095 (b). Los datos se expresan como media \pm ESM, n = 5-6 arterias.

4.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL, ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL PENEANA EN LA OBESIDAD

4.2.1. Parámetros bioquímicos

Después de 18 semanas alimentadas con una dieta alta en grasa (HFD, 60%), las ratas HFD exhibieron un aumento de peso, hiperglucemia y niveles plasmáticos elevados de lactato y triglicéridos en plasma en comparación con las ratas control STD (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros bioquímicos de ratas HFD y STD.

	STD	n	HFD	n
Peso corporal (g)	382.5 ± 13.6	7	515.0 ± 4.5***	7
Edad (Semanas)	18		18	
Glucosa_{sangre} (mg/dl)	116.1 ± 7.5	7	184.4 ± 19*	7
Lactato_{sangre} (mg/dl)	1.3 ± 0.2	5	2.0 ± 0.2	6
Triglicéridos_{sangre} (mg/dl)	129.2 ± 12	6	275.6 ± 37*	7

Los datos representan valores de peso, edad, y parámetros bioquímicos en ratas STD y HFD. Siendo en el caso de las ratas HFD el peso significativamente mayor respecto a las ratas STD. La edad de las ratas fue de 18 semanas para ambos grupos. Los parámetros bioquímicos se expresan como mg/dl de glucosa, lactato y triglicéridos en sangre. Los niveles de glucosa en sangre reflejan una hiperglucemia en el caso de las ratas HFD. Así como un incremento notable de los niveles de lactato y triglicéridos en ratas HFD respecto a las ratas STD. Los datos se expresan como medias ± ESM del peso de 7 ratas STD y 7 ratas HFD, así como 7 ratas HFD y 7 STD para las mediciones de glucosa, 5 ratas STD y 6 HFD para las mediciones de lactato y 6 ratas STD y 7 ratas HFD para las mediciones de triglicéridos en sangre. *P < 0.05, ***P < 0.001, significativamente diferente de las ratas STD, prueba t de Student para observaciones apareadas y no apareadas

4.2.2. Disfunción endotelial peneana en la obesidad inducida por dieta

Para explorar la vasodilatación dependiente del endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta para la ACh (0,01 – 30 μ M) en arterias precontraídas con 1 μ M Phe. Las respuestas relajantes de arterias peneanas de ratas HFD estuvieron significativamente inhibidas con respecto a sus controles (**Figura 10**, Tabla 4). Estos resultados demuestran que existe disfunción endotelial peneana asociada a la obesidad inducida por dieta.

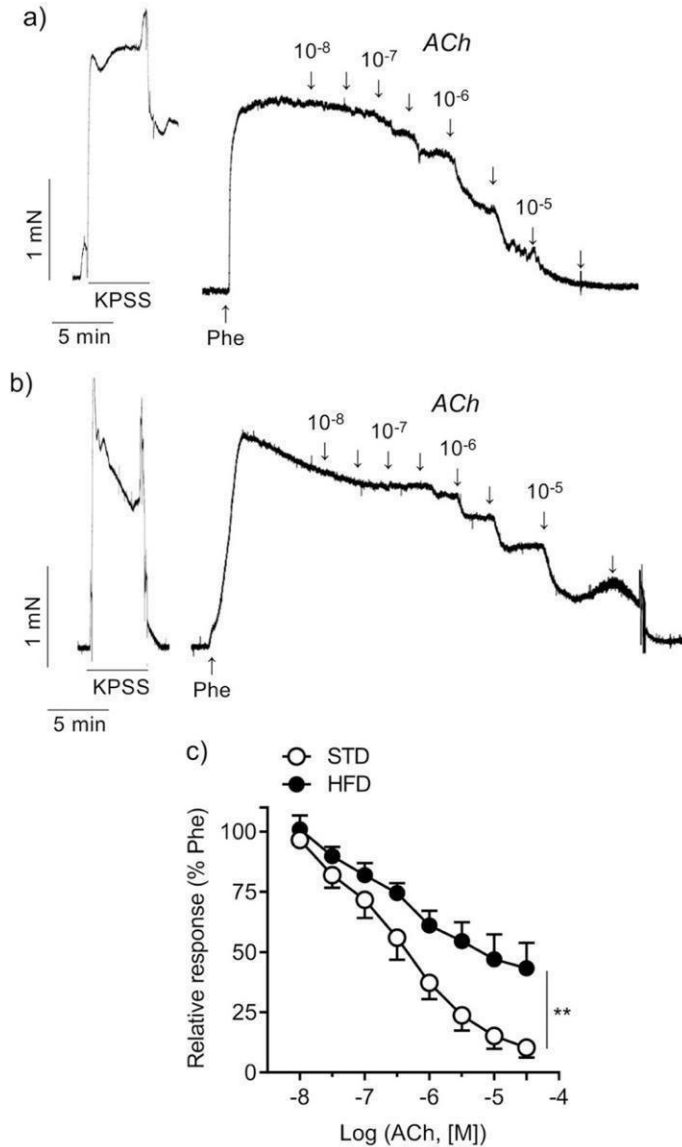


Figura 10. Disfunción endotelial en arterias peneanas de ratas HFD. Los registros isométricos muestran las relajaciones al agonista endotelial ACh de arterias peneanas de ratas STD (a) respecto a arterias peneanas de ratas HFD (b). Relajaciones medias a la ACh de arterias STD y HFD (c). Los resultados se expresan como porcentaje del aumento de la tensión inducido por Phe (1 μ M). Los datos se muestran como la media \pm la ESM de 9 a 11 arterias. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ significativamente diferente de las arterias STD, prueba t de Student para observaciones no apareadas.

4.2.3. Los niveles de ROS mitocondriales están aumentados en arterias peneanas en la obesidad

La determinación de la producción mitocondrial de ROS mediante mitoSOX mostró un incremento significativo en segmentos de arterias peneanas HFD respecto a los controles (**Figura 11a**), pero no hubo diferencia en muestras del cuerpo cavernoso (**Figura 11b**). Los niveles de H_2O_2 medidos con Amplex Red también estuvieron significativamente incrementados en las arterias peneanas HFD con respecto a sus controles (**Figura 11c**), mientras que fueron menores en muestras de CC (**Figura 11d**).

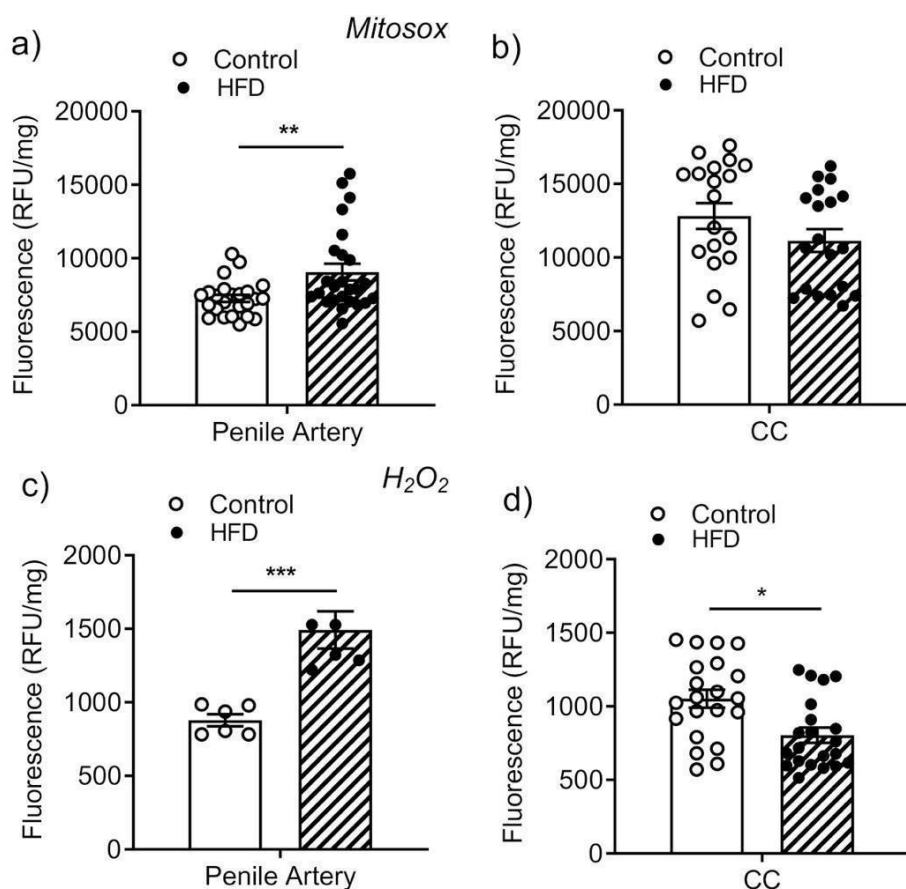


Figura 11. La producción mitocondrial de ROS está aumentada en arterias peneanas HFD respecto a sus controles STD. Niveles de producción de $O_2^{\cdot-}$ en arterias peneanas HFD y STD (a) y en muestras de CC de ratas HFD y STD (b). Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ se encuentran incrementados significativamente en arterias peneanas HFD respecto a sus controles STD mientras que en las muestras de CC apenas hubo diferencia. Niveles de producción de H_2O_2 en arterias STD vs HFD (c) y en muestras de cuerpo cavernoso STD vs HFD (d). Los niveles H_2O_2 son significativamente mayores en las arterias HFD respecto a sus controles STD mientras que en las muestras de CC se aprecia una disminución de los niveles de H_2O_2 en las muestras de HFD respecto a las de STD. Los resultados son expresados como las medias \pm ESM de los valores de $n=24-25$ arterias STD y HFD respectivamente y $n=18-19$ muestras de CC de STD y HFD.

4.2.4. Efecto del antioxidante mitocondrial mitoTempo y de la inhibición de la Nox en las relajaciones endoteliales de arterias peneanas de ratas HFD

El pretratamiento con el antioxidante mitocondrial mitoTempo ($0.03 \mu\text{M}$) inhibió las relajaciones provocadas por ACh en arterias peneanas de ratas control y en mayor medida, las relajaciones de arterias peneanas de ratas HFD (**Figura 12 a, b**, Tabla 4). Lo que sugiere un papel vasodilatador de los ROS mitocondriales en las arterias peneanas que está aumentado en la obesidad. Sin embargo, el inhibidor de la Nox apocinina no produjo ningún efecto significativo ni en arterias control ni en arterias de ratas HFD (**Figura 12 c, d**, Tabla 4).

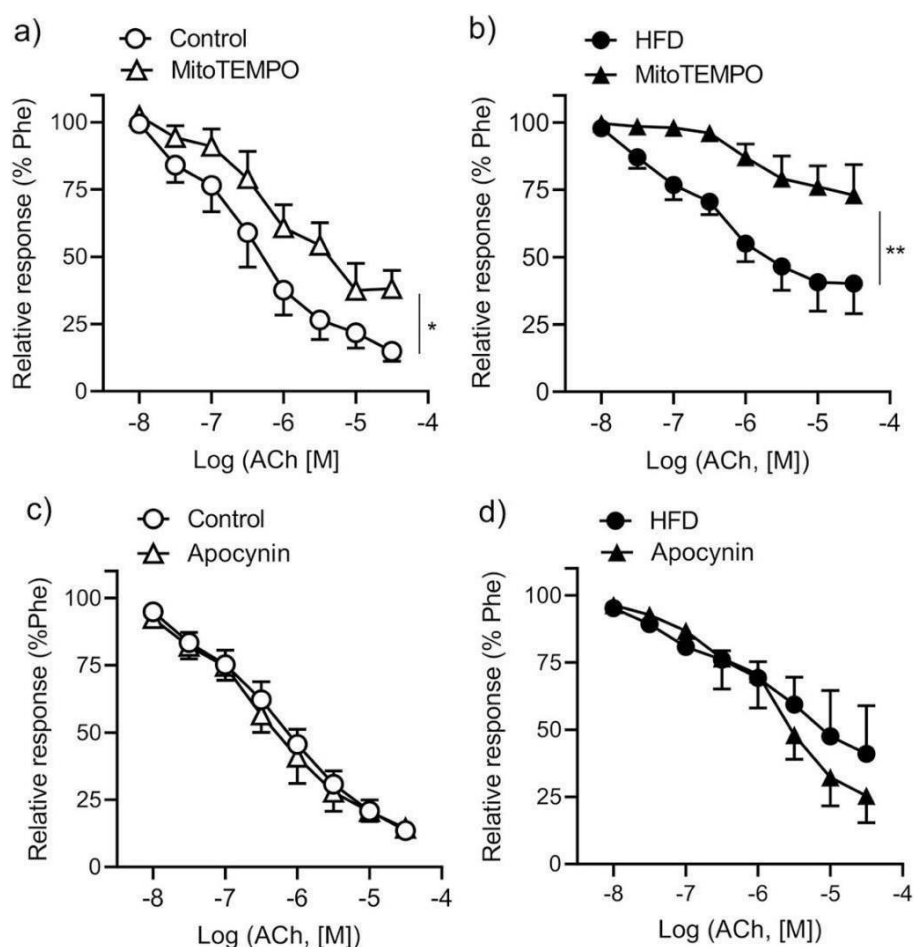


Figura 12. Efecto del antioxidante mitocondrial mitoTempo y el inhibidor de la NOX apocinina en la función endotelial de arterias peneanas de ratas HFD. Relajaciones medias a la ACh de arterias peneanas control STD (a,c) y arterias HFD (b,d) tras el tratamiento con antioxidante mitocondrial mitoTempo (a,b), y con el inhibidor de la Nox apocinina (c,d). Los resultados se expresan como el porcentaje de la precontracción inducida por Phe ($1 \mu\text{M}$). Los datos se muestran como la media \pm ESM de 11 arterias control y 7 arterias control tratadas con mitoTempo de $n=7$ ratas (a); 9 arterias HFD y 5 arterias HFD tratadas con mitoTempo para $n=7$ ratas (b), 7 arterias peneanas control y 5 arterias control tratadas con apocinina para $n=7$ ratas (c) y 7 arterias peneanas HFD y 7 arterias peneanas HFD tratadas con mitoTempo para $n=7$ ratas * $P<0.05$, ** $P<0.01$ de las arterias sin tratar a aquellas tratadas con mitoTempo, prueba t de Student para observaciones no pareadas.

Tabla 4. Efectos del antioxidante mitocondrial mitoTempo y del inhibidor de la Nox apocinina en la función endotelial de arterias peneanas de ratas HFD.

	Ach			
	pEC_{50}	$E_{max}(\% Phe)$	I_1	n
Control	6.35 ± 0.22	85 ± 3	126 ± 6	11
+ mitoTempo	5.51 ± 0.32*	65 ± 6*	138 ± 6	7
HFD	5.20 ± 0.29	57 ± 10	132 ± 5	9
+ mitoTempo	4.49 ± 0.36	39 ± 13*	138 ± 9	5
Control	6.05 ± 0.26	83 ± 4	168 ± 12	7
+apocinina	6.21 ± 0.16	86 ± 12	182 ± 9	5
HFD	4.96 ± 0.24	52 ± 7	150 ± 2	7
+apocinina	5.23 ± 0.21	64 ± 9	150 ± 2	7

Los datos se representan como las medias ± ESM; n es el número de arterias (1-2 por animal). Los resultados son expresados como valores relativos, como porcentajes de la respuesta contráctil a la fenilefrina (Phe). pD_2 es $-\log(EC_{50})$, siendo EC_{50} la concentración de agonista dado el 50% de la respuesta máxima (E_{max}). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante prueba t-Student no pareado. * $P < 0.05$; vs. control.

4.2.5. Regulación al alza de Nox4 en el endotelio arterial peneano en la obesidad

La enzima Nox4 es una NADPH oxidasa productora de ROS que se localiza en la mitocondria, mientras que la MnSOD es la isoforma mitocondrial que transforma los radicales superóxido en H₂O₂. El análisis de Western blot demuestra un incremento de la expresión de la Nox4 (**Figura 13a**), y una tendencia al descenso de los niveles de MnSOD (**Figura 13b**) en muestras de CC de ratas HFD comparadas con sus controles. El estudio inmunohistoquímico demuestra que la Nox4 se expresa en el endotelio de las arterias peneanas donde coexiste con la eNOS (**Figura 13c, d**).

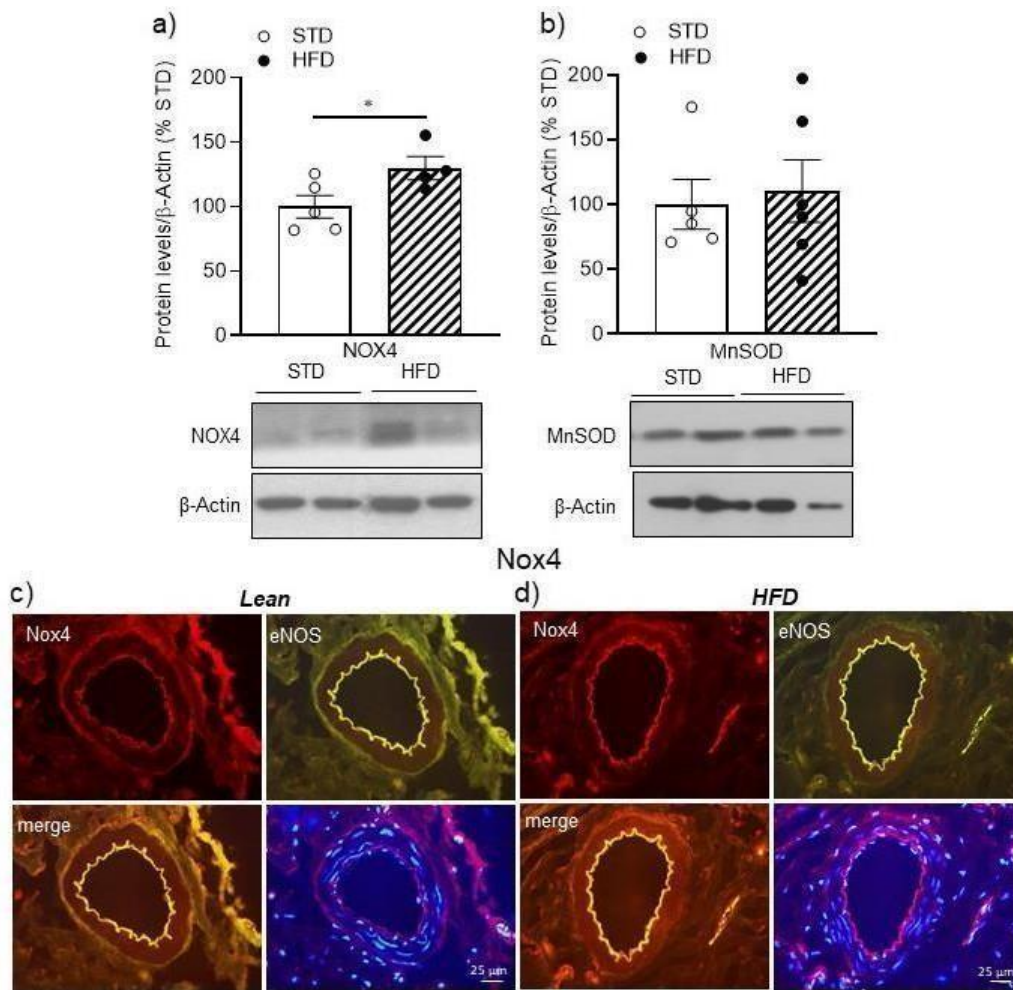


Figura 13. La Nox4 está regulada al alza en tejido eréctil de ratas HFD. Análisis Western blot de la expresión de Nox4 y MnSOD en muestras de CC de ratas control STD y HFD (a,b). Los resultados se cuantificaron por densitometría y se presentaron como cociente de la densidad de las bandas de Nox4 y MnSOD frente a las de β-actina de la muestra. Demostración inmunohistoquímica de Nox4 y la eNOS en arterias peneanas control y HFD (c,d). Las secciones son representativas de n=3 animales (c,d). Los resultados son expresados como la media ± ESM de n=5 muestras de cuerpo cavernoso STD y HFD, *P<0.05.

4.2.6. Impacto de la obesidad en el perfil bioenergético mitocondrial de las arterias peneanas

Con el fin de evaluar el efecto de la obesidad sobre la respiración mitocondrial en el tejido eréctil peneano se procedió a la *Prueba de estrés mitocondrial* en el Seahorse con arterias peneanas de ratas HFD y de ratas control. Dicho procedimiento demostró una reducción significativa de la respiración basal (**Figura 14a, b**), del consumo de oxígeno para la síntesis de ATP (**Figura 14a, c**), de la fuga de protones (**Figura 14a, d**), y la respiración no mitocondrial (**Figura (14a, e)**) en arterias peneanas de ratas HFD, indicando que la disfunción mitocondrial subyace a la disfunción vascularpeneana en la obesidad. La actividad glucolítica, medida por la tasa de acidificación extracelular (ECAR) no estuvo alterada (**Figura 14f**).

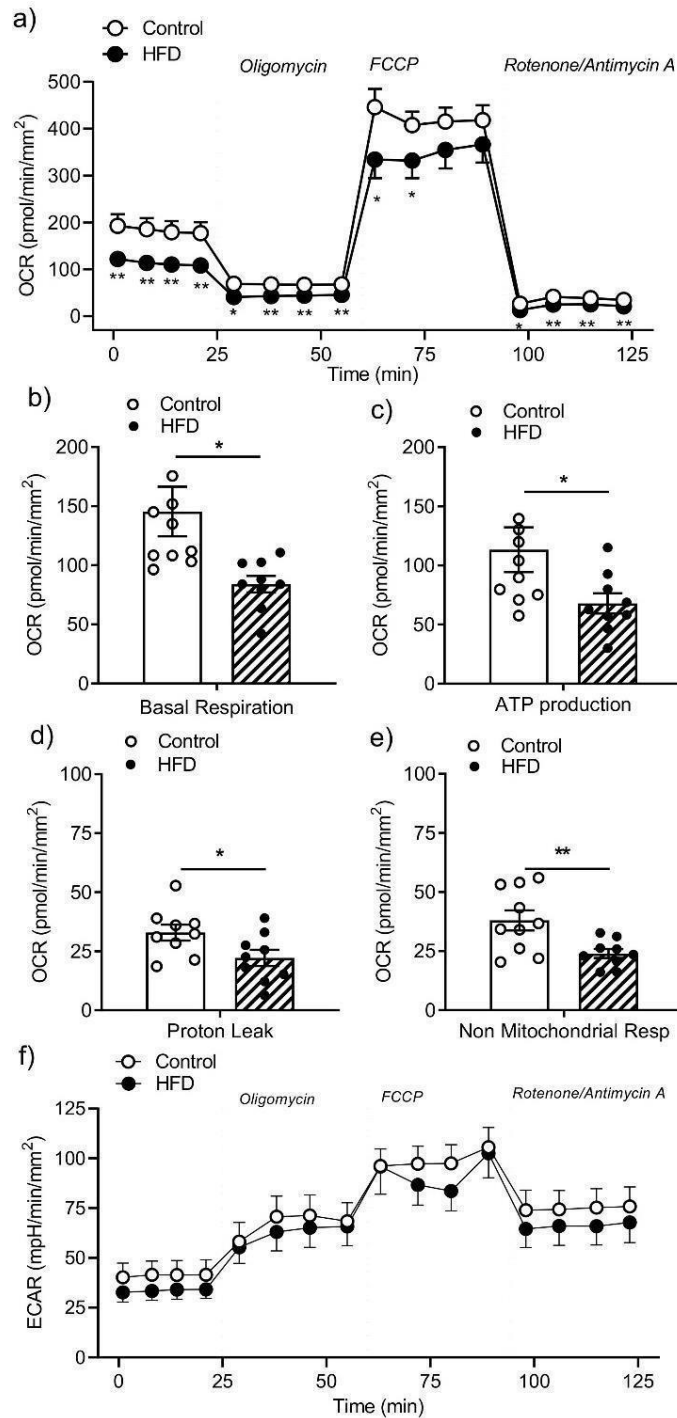


Figura 14. La obesidad reduce el consumo de oxígeno en arterias penenas de ratas HFD. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) de arterias control y HFD (a). Los parámetros bioenergéticos mitocondriales son mostrados como respiración basal (b), oxígeno consumido para la producción de ATP (c) fuga de protones (d), respiración no mitocondrial (e), y ECAR (f) indicador de la actividad glucolítica. Los resultados se expresan como valores de pmol O₂/min y referidos a la superficie del segmento arterial en mm². Los datos se expresan como medias ± ESM de 10 arterias control y 9 HFD de n=7 ratas, respectivamente. *P<0.05; **P < 0.01, significativamente diferente de las arterias de control, prueba t-Student para observaciones no pareadas.

4.2.7. La vasodilatación peneana inducida por activación de canales mitoK_{ATP} está alterada en la obesidad

Ya que la biodisponibilidad del NO en arterias peneanas está comprometida en la obesidad, y con el fin de valorar si la respuesta relajante que producen los abridores de canales mitoK_{ATP} está afectada, se realizaron curvas dosis respuesta para el BMS191095 en arterias de HFD y sus controles, observándose una reducción significativa de la respuesta relajante en arterias de animales obesos (**Figura 15**).

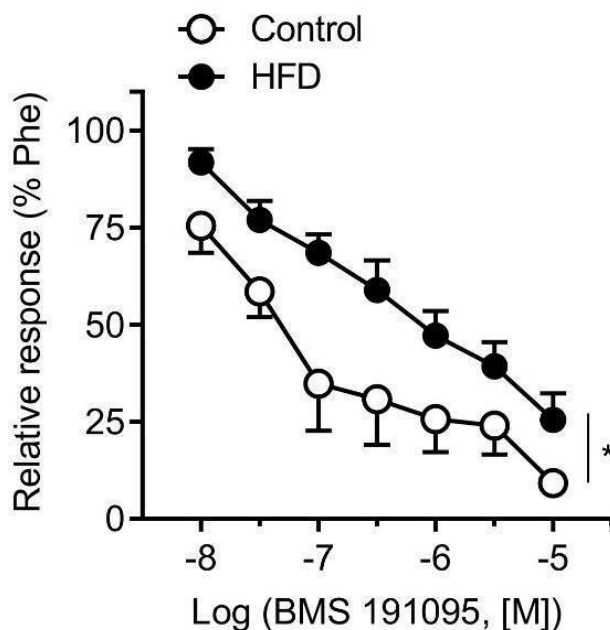


Figura 15. La relajación a los activadores de canales mitoK_{ATP} en arterias peneanas está alterada en la obesidad. Relajaciones medias de arterias peneanas control y HFD mediante el activador de canales mitoK_{ATP} BMS191095. La relajación se ve inhibida en el caso de las arterias peneanas HFD con respecto a las arterias peneanas control. Los resultados se expresan como porcentaje de la precontracción inducida por Phe (1 μ M). Los datos se muestran como las medias \pm ESM de 6 arterias control y 7 arterias HFD de n=7 ratas. *P<0.05 significativamente diferente de las arterias control, prueba t-Student para observaciones no apareadas.

4.2.8. Expresión de los marcadores del estrés del RE en tejido eréctil de ratas obesas

La respuesta de estrés del RE se activa en estados de resistencia a la insulina como la diabetes y la obesidad, lo que contribuye a la disfunción endotelial y a la enfermedad cardiovascular (Maamoun et al., 2019a). Con el fin de valorar la participación del estrés del RE en la disfunción endotelial peneana en la obesidad inducida por dieta alta en grasa se analizó la expresión de los marcadores del estrés del RE en muestras de CC de ratas HFD. La expresión de la forma fosforilada del eIF2 α y del ATF6 α estuvo aumentada, mientras que los niveles de pIRE1 α no mostraron una variación significativa (**Figura 16**).

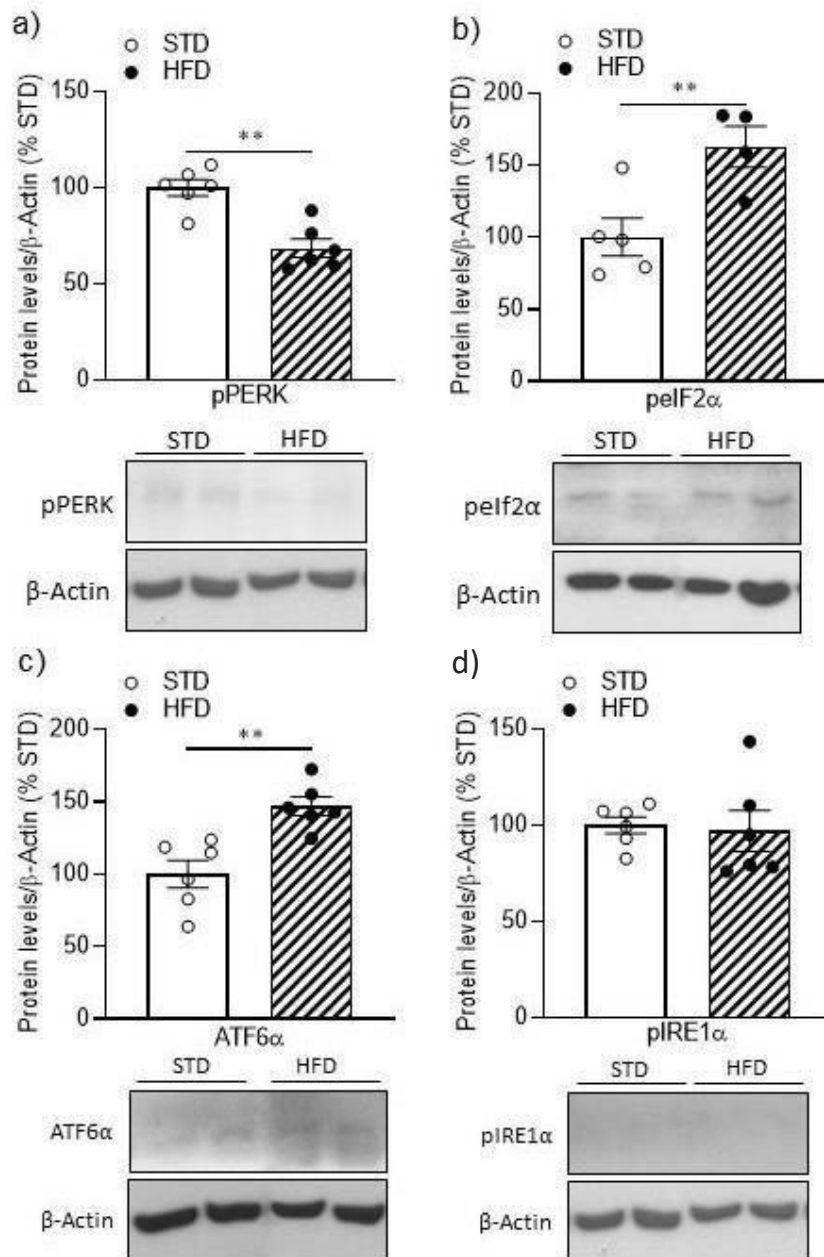


Figura 16. Niveles de expresión de los marcadores de estrés oxidativo en cuerpo cavernoso de ratas con obesidad inducida por dieta. Análisis Western blot de la expresión de pPERK (a), eIF2 α (b), ATF6 α (c), pIRE1 α (d) en muestras de CC de ratas control STD y HFD. Los niveles de eIF2 α y ATF6 α están incrementados en muestras de CC de ratas HFD respecto a sus controles. Sin embargo, pPERK se encuentra disminuido en las muestras de CC de HFD respecto a sus controles. Los resultados se cuantificaron por densitometría y se presentaron como cociente de la densidad de las bandas de pPERK , eIF2 α , ATF6 α y pIRE1 α frente a las de β -actina de la muestra. Los resultados son expresados como la media \pm ESM de n=6 muestras de cuerpo cavernoso de n=7 ratas STD y HFD, **P<0.01 significativamente diferente de las arterias control, prueba t-Student para observaciones pareadas y no pareadas.

4.3. EL ESTRÉS DEL RE INDUCE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL, ALTERACIÓN DEL METABOLISMO REDOX Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL PENEANA

4.3.1. Modelo de estrés del RE inducido in vivo por tunicamicina

Las ratas tratadas con tunicamicina no mostraron variaciones significativas en el peso ni en los niveles plasmáticos de triglicéridos, pero si niveles plasmáticos de lactato elevados y una tendencia a la elevación de la glucosa sanguínea (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros metabólicos en ratas tratadas con tunicamicina

	Vehículo	n	Tunicamicina	n
Peso corporal (g)	339.2 ± 21	6	315.3 ± 46	5
Edad (Semanas)	18	16	18	16
Glucosa_{sangre} (mg/dl)	151.4 ± 7.0	19	186.8 ± 19	17
Lactato_{sangre} (mg/dl)	2.88 ± 0.19	17	3.99 ± 0.65*	12
Triglicéridos_{sangre} (mg/dl)	134.6 ± 10	18	139.1 ± 8.4	15

Valores de peso, edad, y parámetros bioquímicos en ratas control y ratas con ERS inducidas por tunicamicina. Los datos se expresan como medias ± ESM del peso de 6 ratas control y 5 ratas ERS, así como 17 ratas ERS y 19 control para las mediciones de glucosa, 12 ratas control y 17 ERS para las mediciones de lactato y 15 ratas ERS y 18 ratas control para las mediciones de triglicéridos en sangre.

4.3.2. Expresión de los marcadores de estrés del RE en tejido eréctil de ratas tratadas con tunicamicina

La inducción del estrés del RE *in vivo* en tejido eréctil peneano fue determinada por la expresión de los marcadores del estrés del RE en muestras de CC. El tratamiento con tunicamicina indujo un incremento en la expresión de la forma fosforilada de las proteínas PERK, ATF6 α y pIRE1 α , y un descenso en los niveles de BiP en muestras de CC (Figura 17).

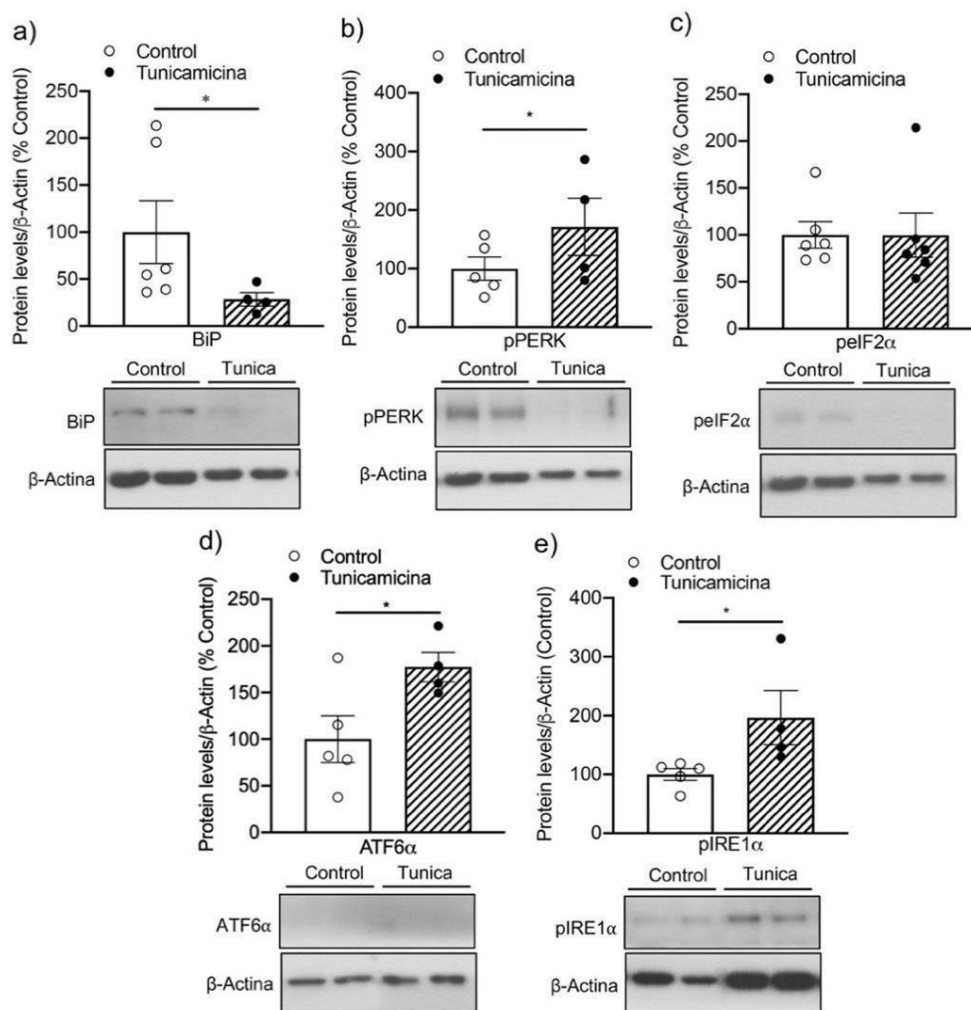


Figura 17. Marcadores de estrés del RE en cuerpo cavernoso de ratas con estrés del RE inducida por tunicamicina. Análisis Western blot de la expresión de BiP (a) pPERK (b), eIF2 α (c), ATF6 α (d), pIRE1 α (e) en muestras de CC de ratas control y tratadas con tunicamicina. Los niveles de pPERK, ATF6 α y pIRE1 α están incrementados en muestras de CC de ratas ERS respecto a sus controles. Sin embargo, BiP se encuentra disminuido significativamente en las muestras de CC de tunicamicina respecto a sus controles. Los resultados se cuantificaron por densitometría y se presentaron como cociente de la densidad de las bandas de BiP, pPERK, eIF2 α , ATF6 α y pIRE1 α frente a las de β -actina de la muestra. Los resultados son expresados como la media \pm ESM de $n=6$ muestras de cuerpo cavernoso de $n=7$ ratas control y tunicamicina. * $P < 0.05$ significativamente diferente de las arterias control, prueba t-Student para observaciones pareadas y no pareadas.

4.3.3. El estrés del RE reduce la vasoconstricción α_1 -adrenérgica en arterias peneanas

Para evaluar el efecto del estrés del RE en la respuesta contráctil de las arterias peneanas se realizaron curvas concentración respuesta para la Phe, observándose una reducción significativa de la respuesta contráctil máxima (**Figura 18**) y de la sensibilidad al agonista α -adrenérgico (valores de pD_2 6.12 ± 0.30 , $n=7$ en controles y -5.39 ± 0.21 en arterias de animales tratados con tunicamicina, $*P < 0.05$). Los datos reflejaron un deterioro de la vasoconstricción adrenérgica en el modelo de estrés del RE, si bien la respuesta contráctil inducida por la despolarización con KPSS no estuvo alterada, siendo 0.60 ± 0.08 , $n=22$, en arterias de ratas control, y 0.67 ± 0.09 , $n=22$, en arterias de ratas con estrés del RE.

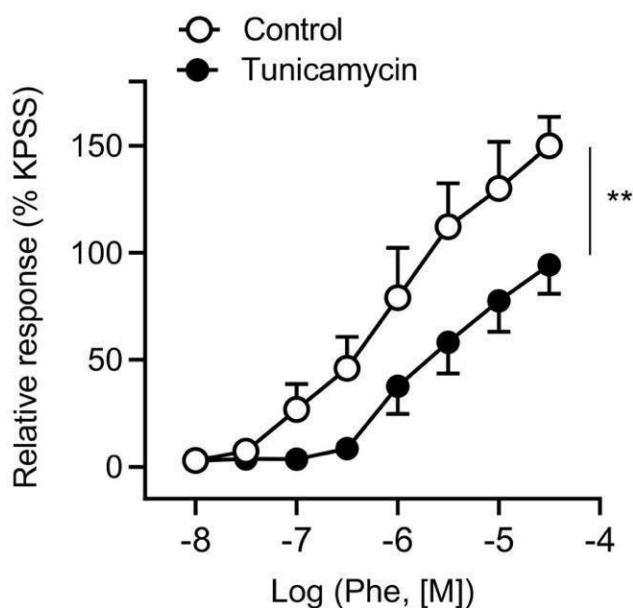


Figura 18. Efecto del inductor de estrés del RE tunicamicina en la respuesta contráctil α_1 -adrenérgica. Contracciones medias inducidas por el agonista α_1 -adrenérgico de arterias peneanas control y con tunicamicina. Los resultados se expresan como porcentaje de la contracción de KPSS. Los datos se muestran como las medias \pm ESM de 7 arterias control y 11 arterias tunicamicina. $**P < 0.01$ significativamente diferente de las arterias control, prueba t-Student para observaciones no apareadas.

4.3.4. El estrés del RE induce disfunción endotelial en arterias peneanas

Con el fin de determinar la relación entre respuesta de estrés del RE, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial peneana, se examinó en primer lugar la vasodilatación dependiente del endotelio. En las arterias con estrés del RE, las relajaciones dependientes del endotelio a la ACh estuvieron reducidas en comparación con sus controles, (**Figura 19a, b**), siendo los valores de pD_2 6.45 ± 0.20 $n=15$ en controles y 5.49 ± 0.23 , $n= 15$ en arterias de ratas con estrés del RE, $p<0.05$, prueba t- Student no pareada). Las respuestas relajantes al agonista α -adrenérgico, que tienen un componente endotelial, estuvieron también reducidas en arterias del modelo de estrés del RE (**Figura 19 b**, tabla 6). Por lo que se confirma la disfunción endotelial asociada a estrés del retículo.

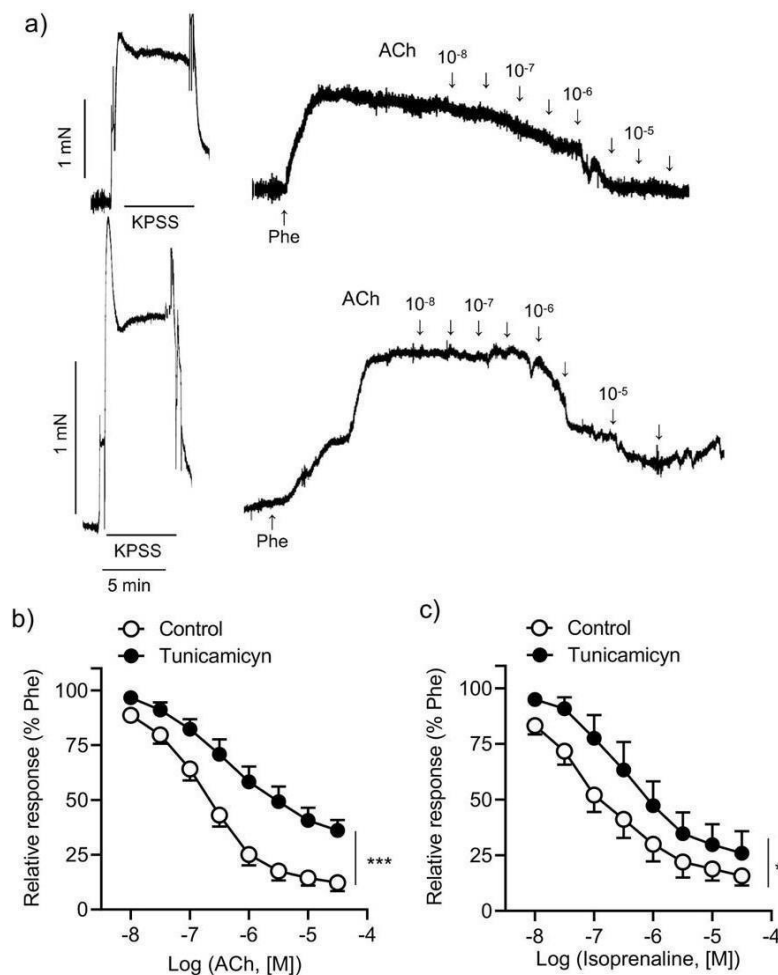


Figura 19: Efecto del estrés de RE en las respuestas vasodilatadoras de las arterias peneanas. Los registros isométricos muestran las relajaciones al agonista endotelial ACh de arterias peneanas de rata control (a, panel superior) y de rata tratada con tunicamicina (a, panel inferior). Relajaciones medias de arterias peneanas control y ERS a la ACh (b) y a la isoprenalina (c). Los resultados se expresan como porcentaje de la precontracción inducida por Phe (1 μ M). Los datos se muestran como medias \pm ESM de 6-8 arterias (1-2 arterias/animal). * $P<0.05$, $P<0.01$ frente al control.

4.3.5. Las ROS derivadas de la Nox y ROS mitocondriales contribuyen a la disfunción endotelial peneana en ratas con estrés del RE inducido por tunicamicina

El papel de las ROS derivadas de la Nox se valoró mediante el tratamiento de las arterias con el inhibidor no selectivo apocinina, que mejoró de forma significativa las respuestas relajantes dependientes del endotelio de las arterias peneanas de ratas con estrés del RE inducido por tunicamicina (**Figura 20b**, Tabla 6). La apocinina no tuvo un efecto significativo en la respuesta vasodilatadora a la ACh de arterias de ratas control (**Figura 20a**, Tabla 6).

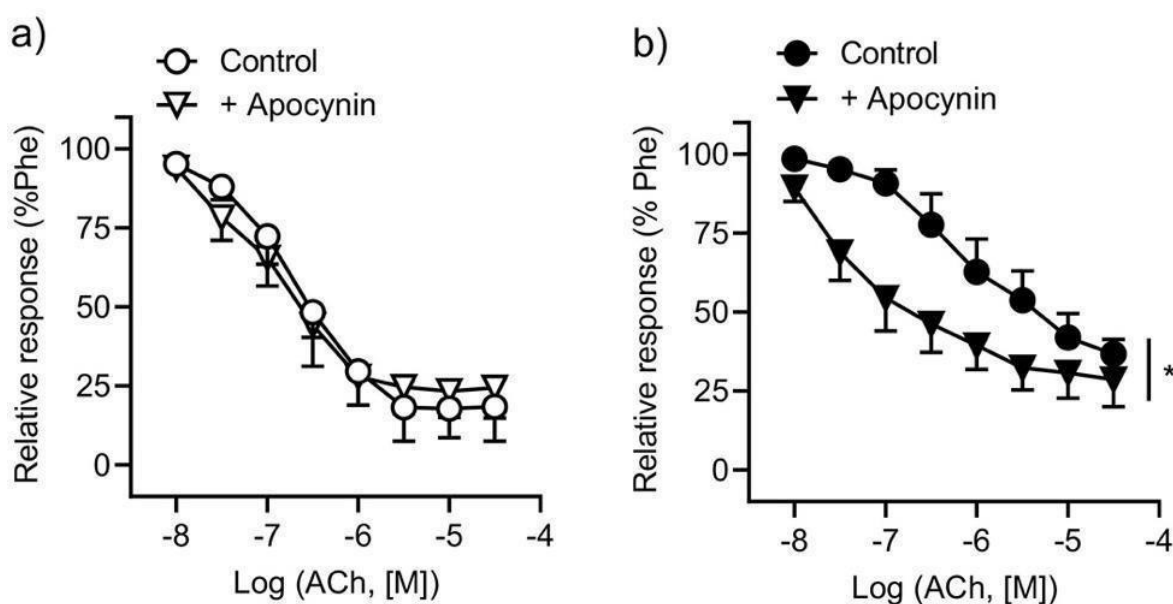


Figura 21. ROS derivadas de la Nox contribuyen a la disfunción endotelial peneana en ratas con estrés del RE inducido por tunicamicina. Relaciones medias de arterias control y arterias peneanas tratadas con tunicamicina en presencia del inhibidor no selectivo de la Nox apocinina (10 μ M). Los resultados se expresan como porcentaje de la precontracción inducida por Phe (1 μ M). Los datos se presentan como la media \pm ESM de 6 arterias control y 8 arterias tratadas con tunicamicina de n=6 ratas. *P < 0.05, significativamente diferente de las arterias tratadas con tunicamicina respecto a aquellas tratadas con tunicamicina y en presencia de apocinina, prueba t-Student para observaciones pareadas.

Dadas las interacciones de la mitocondria con el RE, se evaluó en primer lugar el papel de la producción mitocondrial de ROS en la disfunción endotelial de arterias peneanas con inducción química de estrés del RE. El antioxidante mitocondrial mitoTempo redujo las respuestas relajantes a la ACh (**Figura 21a**; Tabla 6) y a la isoprenalina (**Figura 21c**, valores de pD_2 6.69 ± 0.26 , n=7 arterias control y 4.83 ± 0.16 en arterias control tratadas con mitoTempo, P<0.001) en arterias de animales control, lo

que sugiere la participación de H_2O_2 vasodilatador en las relajaciones dependientes del endotelio. Sin embargo, el mitoTempo mejoró las relajaciones dependientes del endotelio a la ACh en arterias de animales con estrés del RE (**Figura 20b**; Tabla 6), indicando que ROS contráctiles de origen mitocondrial inhiben dichas relajaciones en ratas con estrés del RE.

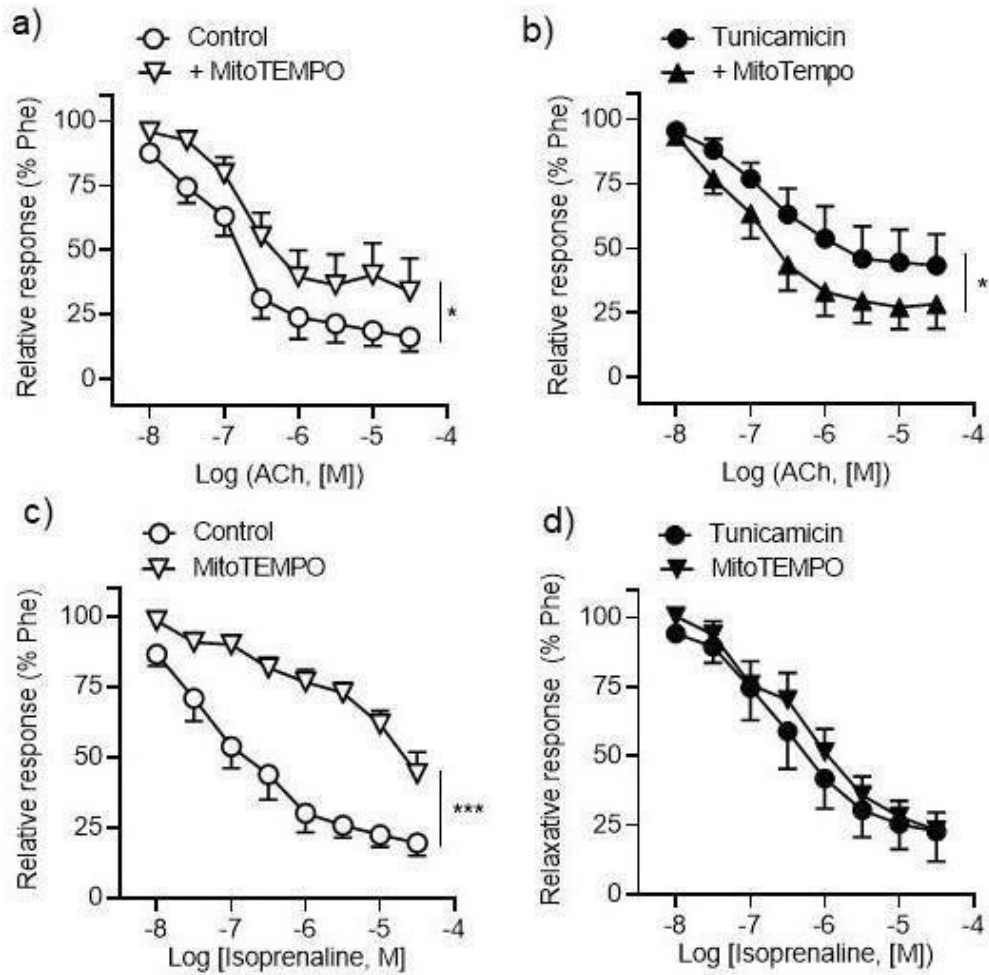


Figura 21: Efecto del antioxidante mitocondrial mitoTempo en la disfunción endotelial peneana inducida por el estrés del RE. Relajaciones medias de arterias peneanas control (a,c) y tratadas con tunicamicina (b) al agonista endotelial ACh (a,b) y al agonista β -adrenérgico (c,d) en ausencia y presencia del antioxidante mitocondrial mitoTempo ($0.3 \mu M$). Los resultados se expresan como porcentaje de la precontracción inducida por Phe ($1 \mu M$). Los datos se muestran como la media \pm ESM de 8 (a) y 9 (b), 6 (c) y 6 (d) arterias (1-2 por animal). Las diferencias estadísticas se calcularon mediante la prueba t de Student para observación pareadas. * $P < 0.05$ frente a ratas tratadas con tunicamicina.

Tabla 6. Efecto del antioxidante mitocondrial mitoTempo y del inhibidor de la Nox apocinina sobre las relajaciones endoteliales peneanas en ratas con estrés del RE

Ach				
	pEC_{50}	E_{max} (% Phe)	I_1	n
Control	6.81 ± 0.30	84 ± 5	163 ± 11	8
+ mitotempo	5.77 ± 0.46*	66 ± 13	163 ± 11	8
ERS	5.61 ± 0.50	57 ± 11	138 ± 7	9
+ mitoTempo	6.62 ± 0.40*	68 ± 9	138 ± 7	9
Control	6.30 ± 0.54	82 ± 11	131 ± 7	6
+apocynin	6.40 ± 0.46	75 ± 10	131 ± 7	6
ERS	5.61 ± 0.52	63 ± 5	137 ± 9	8
+ apocynin	6.55 ± 0,67*	71 ± 8	137 ± 9	8

Los datos se expresan como las medias ± ESM; n es el número de arterias (1-2 por animal) de 6 animales para los experimentos con mitoTempo y 6 animales para los experimentos con apocinina. Los resultados son expresados como valores relativos, como porcentajes de la respuesta contráctil a la fenilefrina (Phe). pD_2 es $-\log(EC_{50})$, siendo EC_{50} la concentración de agonista dado el 50% de la respuesta máxima (E_{max}). Las diferencias significativas fueron analizadas mediante prueba t-Student pareado. * $P < 0.05$ vs. control.

4.3.6. Niveles de ROS en tejido eréctil de ratas con estrés del RE

Los niveles de ROS derivados de la mitocondria, superóxido y H_2O_2 , fueron determinados mediante las técnicas del mitoSOX y Amplex Red, respectivamente. Las ratas tratadas con tunicamicina presentaron niveles significativamente más bajos de superóxido mitocondrial tanto en muestras de CC (**Figura 22a**), como en arterias peneanas (**Figura 22b**). Además, los niveles basales de H_2O_2 fueron también menores en CC del modelo de estrés del RE (**Figura 22c**), mientras que los niveles totales de H_2O_2 derivados de la Nox no estuvieron alterados (**Figura 22d**). Por otro lado, si bien la expresión de la enzima Nox4 de localización mitocondrial estuvo regulada al alza, la expresión de la MnSOD estuvo reducida en CC de animal con estrés del RE (**Figura 22e, f**).

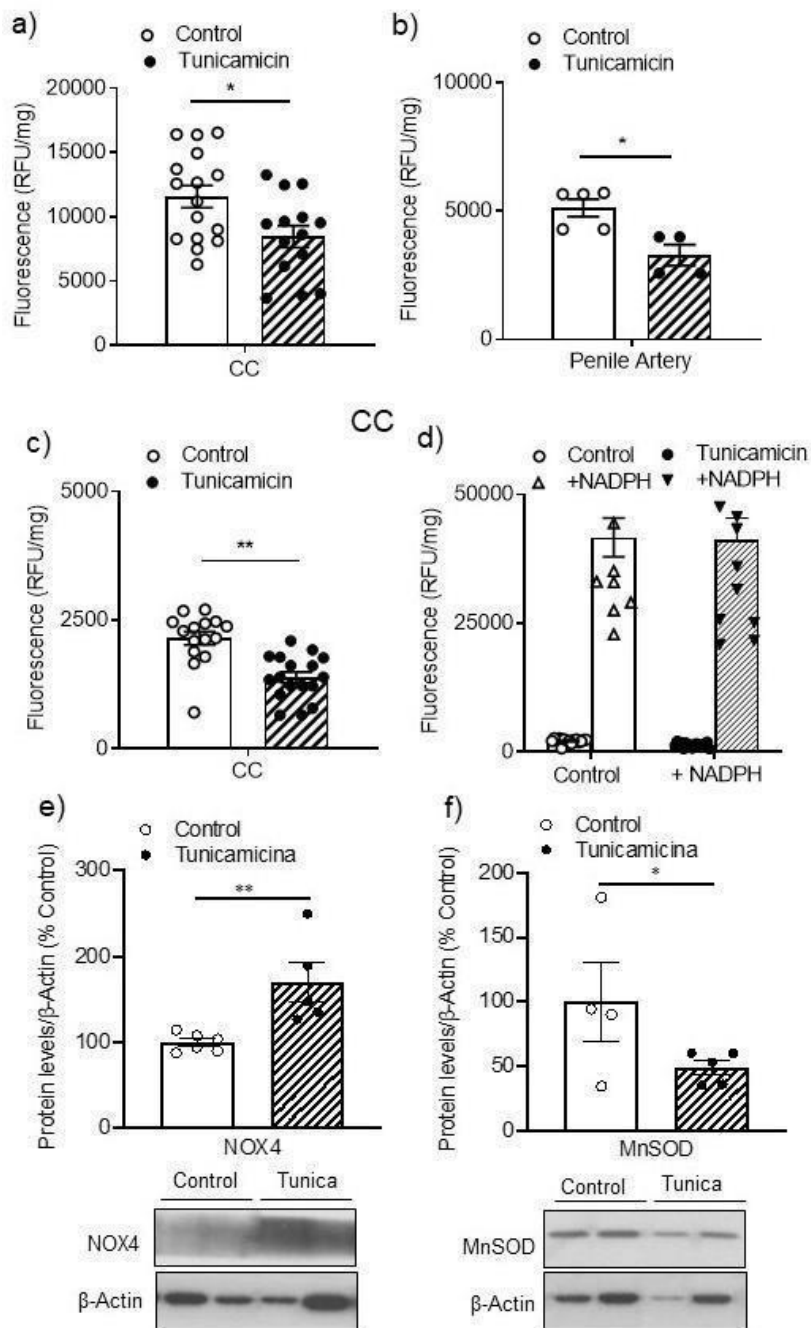


Figura 22. Niveles de producción de ROS derivados de la mitocondria y expresión de las enzimas mitocondriales del metabolismo de ROS en tejido eréctil de ratas con estrés del RE. (a-d) Niveles de producción de O_2 mitocondrial medidos con mitoSOX en muestras de CC (a) y arterias (b) de ratas control y tratadas con tunicamicina. Niveles basales (c) y estimulados por NADPH (d) de H_2O_2 medidos con Amplex Red en CC de ratas control y ratas con estrés del RE. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia relativa (RFU) por mg de tejido. (e,d) Análisis Western blot de la expresión de Nox4 y MnSOD en muestras de CC de ratas control y tratadas con tunicamicina (e,f). Los resultados se cuantificaron por densitometría y se presentaron como cociente de la densidad de las bandas de Nox4 y MnSOD frente a las de β -actina de la muestra. Los resultados se expresan como las medias \pm ESM de 16 muestras de CC control y 14 de muestras de CC tratadas con tunicamicina de $n=8$ ratas (a), de $n=5$ tanto en arterias control como tratadas con tunicamicina (b), de 15 muestras de CC control y 18 de tunicamicina de $n=9$ ratas (c), de 12 muestras control y 11 de tunicamicina de $n=6$ ratas (d). Para el análisis de Western blot se utilizaron 6 muestras de CC control y 6 de tunicamicina de $n=6$ ratas. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ significativamente diferentes de las muestras control, prueba t-Student para observaciones no pareadas.

4.3.7. Efecto del estrés del RE sobre la bioenergética mitocondrial peneana

Con el fin de evaluar el impacto del estrés del RE sobre la bioenergética mitocondrial del tejido eréctil, se realizó la *Prueba del estrés mitocondrial* con la tecnología del SeaHorse. Dicho procedimiento demostró un incremento significativo de la respiración basal (**Figura 23 a,b**), del consumo de oxígeno para la síntesis de ATP (**Figura 23 a,c**), la fuga de protones (**Figura 23 a,d**), así como de la actividad glucolítica (**Figura 23 e**), en arterias peneanas de ratas con estrés del RE inducido químicamente.

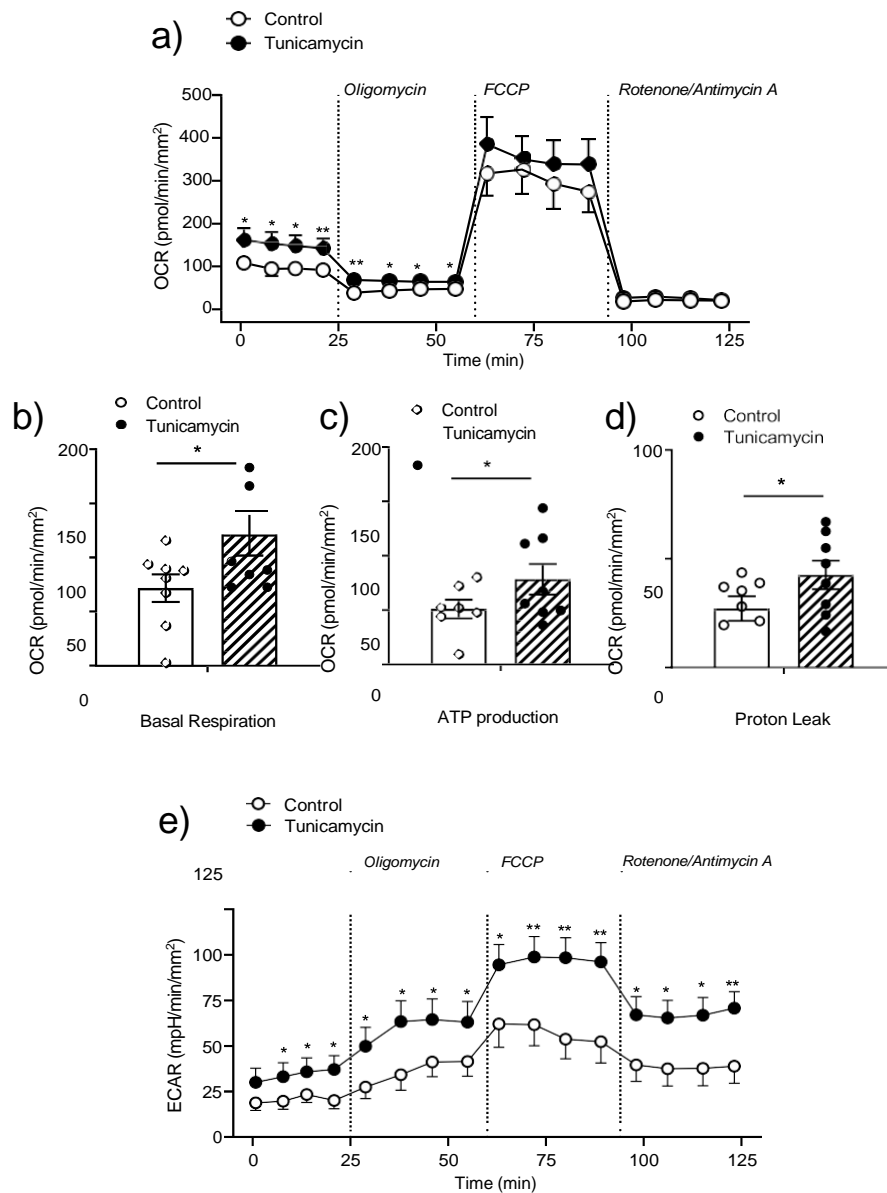


Figura 23. Perfil respiratorio mitocondrial de arterias peneanas de ratas con estrés del RE. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) de arterias peneanas aisladas de ratas control y ratas con estrés del RE (a). Los parámetros bioenergéticos mitocondriales son mostrados como respiración basal (b), oxígeno consumido para la producción de ATP (c) fuga de protones (d), y ECAR (e) indicador de la actividad glucolítica. Los resultados se expresan como valores de pmol O₂/min y referidos a la superficie del segmento arterial en mm². Los datos se expresan como medias ± ESM de 8 arterias control y 8 arterias tratadas con tunicamicina

de n=8 ratas. *P<0.05, **P < 0.01, significativamente diferente de las arterias de control, prueba t-Student para observaciones no pareadas.

V. DISCUSIÓN

La DE es una manifestación temprana de enfermedad cardiovascular y un síntoma centinela de enfermedad arterial coronaria (Gandaglia et al., 2014; Montorsi et al., 2006; Vlachopoulos et al., 2013b), habiéndose demostrado que la disfunción endotelial es el vínculo entre la DE y la enfermedad cardiovascular (Kirby et al., 2005). Las enfermedades metabólicas como la resistencia a la insulina, la diabetes, las dislipidemias y obesidad representan también factores de riesgo implicados en la patogénesis de enfermedad cardiovascular y de la DE (Corona et al., 2023; Esposito & Giugliano, 2005). Investigaciones recientes demuestran que la disfunción mitocondrial y el estrés del RE juegan un papel clave en la patogénesis tanto de los desórdenes cardiovasculares como de la enfermedad metabólica (Agouni et al., 2014; Galán et al., 2014; Kirkman et al., 2021; Özcan et al., 2004) si bien su papel en la patogénesis de la DE asociada a la enfermedad metabólica y vascular no ha sido establecido.

Los resultados de la presente tesis doctoral demuestran por primera vez que tanto el estrés del RE como la disfunción mitocondrial contribuyen a la disfunción endotelial del tejido eréctil peneano en la obesidad, y producen alteraciones importantes en el metabolismo REDOX y en la bioenergética mitocondrial de las arterias peneanas que probablemente contribuyen a la DE asociada a obesidad y estados de resistencia a la insulina.

5.1. CANALES MITOK_{ATP} EN LAS ARTERIAS PENEANAS

Se ha comprobado que la apertura de estos canales juega un papel importante en el flujo de iones potasio a la mitocondria y la despolarización de la misma lo que evita la sobrecarga de calcio y con ello la toxicidad celular y apoptosis (Korge et al., 2002; Sato et al., 1998; Uchiyama et al., 2003; Zhang et al., 2001).

Por tanto, el papel de los canales mitoK_{ATP} en el *pre-acondicionamiento* cardiaco y neuronal, así como los mecanismos de protección celular contra el estrés metabólico y el control del rendimiento oxidativo están bien establecidos (O'Rourke, 2004; O-Uchi et al., 2014; Queliconi et al., 2011). En el presente trabajo, demostramos que la activación selectiva de los canales mitoK_{ATP} causa vasodilatación peneana al liberar NO endotelial que provoca la relajación las células musculares lisas adyacentes al activar los canales BK_{Ca} del plasmalema e incrementar a su vez la activación de los canales mitoK_{ATP} en el VSM. La activación de los canales mitoK_{ATP} inhibe la respiración mitocondrial y reduce el consumo de oxígeno y la actividad glucolítica, asociados a una disminución en la generación de ROS mitocondriales. El NO endógeno contribuye en

parte al efecto inhibitorio de la activación de los canales mitoK_{ATP} en la bioenergética mitocondrial de las arterias peneanas, a pesar de la participación de acciones inhibitorias independientes del NO en tanto la dinámica mitocondrial como la producción de ROS inducidas por los activadores de los canales mitoK_{ATP}. Los mecanismos subyacentes a la activación de los canales mitoK_{ATP} en las arterias peneanas podrían acoplar el flujo sanguíneo al metabolismo al inducir vasodilatación y reducir la respiración mitocondrial en las VSM, preservando así el ATP en el tejido arterial relajado.

Estos datos muestran que los activadores de los canales mitoK_{ATP}, diazóxido y BMS191095, relajan de manera dependiente de la concentración las arterias peneanas, y el bloqueo tanto de la NOS como de la PI3K atenúa estas relajaciones, lo que sugiere la participación del NO. El NO liberado tanto por nervios como por endotelio inicia y mantiene la erección peneana evocada por estímulos sexuales mediante la relajación de las arterias peneanas (Prieto, 2008a; Simonsen et al., 1997a). Dado que la eliminación mecánica del endotelio redujo considerablemente las relajaciones inducidas por BMS191095, los resultados demuestran que la activación de los canales mitoK_{ATP} induce vasodilatación peneana en parte al liberar NO endotelial. La activación de la vía de señalización PI3K-Akt-NOS por la despolarización mitocondrial inducida por BMS191095 se demostró por primera vez en neuronas, siendo este mecanismo parte de la neuroprotección inducida por la activación del canal mitoK_{ATP} (Gáspár et al., 2008b). Los datos presentes son consistentes con hallazgos reportados anteriormente en microarterias cerebrales que muestran que los activadores de mitoK_{ATP} despolarizan las mitocondrias en las células endoteliales, aumentan el calcio intracelular endotelial y activan la fosforilación de PI3K-Akt liberando así NO (Katakam et al., 2013). Sin embargo, considerando que las arterias peneanas poseen una densa inervación nitrérgica (Simonsen et al., 1997a), y que los activadores de mitoK_{ATP} aumentan la producción de NO en neuronas de cultivo y nervios perivasculares (Katakam et al., 2016), no se puede descartar la participación del NO derivado de los nervios en la relajación inducida por BMS191095 en las arterias del pene.

La vasodilatación mediada tanto por NO neural como endotelial se encuentra comprometida en las arterias peneanas en condiciones de síndrome metabólico como la resistencia a la insulina debido al estrés oxidativo y los altos niveles de ROS que se encargan de desacoplar la NOS (Prieto et al., 2010; Sánchez et al., 2012b; Villalba et al., 2009). Los resultados del presente trabajo demuestran que las relajaciones al abrir de mitoK_{ATP} BMS191095 que implican al NO son inhibidas en las arterias peneanas de ratas obesas con resistencia a la insulina, en concordancia con lo demostrado también

en las arterias cerebrales (Katakam et al., 2009). Estos resultados sugieren que los mecanismos de protección vascular que implican la activación del canal mitoK_{ATP} ante insultos isquémicos pueden verse obstaculizados en la enfermedad metabólica, como se ha demostrado en la vasodilatación hipóxica mediada por NO endotelial en arterias peneanas de ratas obesas inducidas por dieta (Prieto et al., 2010).

Las relajaciones provocadas por el BMS191095 fueron abolidas y en gran medida atenuadas por el bloqueador específico del canal mitoK_{ATP} 5-HD y por el bloqueante clásico de canales K_{ATP} de sarcolema, la sulfonilurea glibenclamida, respectivamente, lo que estaría de acuerdo con la similitud de la estructura molecular de estos canales que comparten un complejo proteico con un canal Kir como región de poro, y una subunidad receptora de ATP de sulfonilurea (Foster et al., 2012; Leanza et al., 2019; O-Uchi et al., 2014; Paggio et al., 2019; Szabo & Zoratti, 2014). Además, los bloqueantes del canal mitoK_{ATP} no solo inhibieron la vasodilatación inducida por el abridor de canal mitoK_{ATP} BMS191095, sino también las relajaciones provocadas por el donante de NO SNAP en arterias peneanas con endotelio intacto. Dado que el fuerte efecto inhibitorio del bloqueante del canal mitoK_{ATP} 5-HD persistió en arterias sin endotelio, nuestros hallazgos sugieren que el NO liberado por la activación del canal mitoK_{ATP} desde las células endoteliales activa los canales mitoK_{ATP} en células de MLV adyacentes para inducir relajación, en concordancia con estudios anteriores en miocitos cardíacos aislados que muestran que el NO activa los mitoK_{ATP} y que los donadores de NO como SNAP potencian la activación de mitoK_{ATP} (Ockaili et al., 2002; Sasaki et al., 2000). La cascada de señalización cGMP/PKG media la estimulación del canal mitoK_{ATP} por NO (Salloum et al., 2007), y está involucrada en los efectos cardioprotectores reportados con inhibidores de la fosfodiesterasa 5 como el sildenafil (Lukowski et al., 2022; Salloum et al., 2007; Uchiyama et al., 2003). Se ha demostrado anteriormente que el efecto relajante del sildenafil en las arterias peneanas es mediado por la vía NO/cGMP/PKG (Prieto et al., 2006b). Los resultados actuales proporcionan evidencia por primera vez de que los canales mitoK_{ATP} del MLV son una diana para el NO liberado del endotelio en el tejido arterial del pene. Además, no podemos descartar la posibilidad de un bucle de retroalimentación positiva mediante el cual el NO liberado de las células endoteliales al activar el canal mitoK_{ATP}, a su vez, activa los canales mitoK_{ATP} endoteliales para liberar más NO, amplificando así la señal. Sin embargo, se requieren más estudios para aclarar esta cuestión.

La despolarización mitocondrial que tiene lugar tras la acción de los abridores de canales mitoK_{ATP} induce vasodilatación en las arterias cerebrales al liberar Ca²⁺ de

las mitocondrias, abriendo así canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina en el retículo sarcoplásmico, lo que a su vez libera Ca^{2+} al citosol, activa BK_{Ca} en el sarcolema y genera corrientes transitorias de K^+ hacia el espacio extracelular en las células MSV arteriales (Katakam et al., 2014, 2013; Xi et al., 2005b). Demostramos aquí que las relajaciones inducidas por BMS191095 en las arterias peneanas fueron inhibidas por el bloqueador selectivo de BK_{Ca} , iberotoxina, confirmando así la participación de los canales BK_{Ca} en concordancia con lo reportado en las arterias cerebrales (Katakam et al., 2013; Xi et al., 2005b). Se ha propuesto el acoplamiento del retículo sarcoplásmico-mitocondria como facilitador de la activación inducida por abridores de canales mito K_{ATP} de los canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina, la liberación de corrientes *sparks* de Ca^{2+} y la estimulación de los canales BK_{Ca} del sarcolema MSV y por tanto la consecuente vasodilatación (Katakam et al., 2013). Además, el NO induce relajación de las arterias peneanas a través de la estimulación dependiente de PKG de los canales BK_{Ca} (Prieto et al., 2006b). Dado que el abridor de canales mito K_{ATP} BMS191095 libera NO del endotelio de las arterias peneanas, como muestran los resultados, y el bloqueante selectivo de BK_{Ca} , iberotoxina, no permea las membranas mitocondriales, el efecto inhibitorio de iberotoxina tanto en las relajaciones provocadas por BMS191095 como por SNAP en arterias peneanas indica que el NO liberado por la activación del canal mito K_{ATP} contribuye en parte a la relajación MVL a través de la activación de los canales BK_{Ca} del sarcolema.

La apertura de los canales mito K_{ATP} causa la despolarización del potencial de membrana mitocondrial y reduce la fuerza motriz para la entrada de Ca^{2+} , atenuando así la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y la producción excesiva de ROS, un mecanismo involucrado en la *pre- acondicionamiento* y protección cardíaca y neural (Busija et al., 2008; O'Rourke, 2004). Sin embargo, el papel de los canales mito K_{ATP} en la generación mitocondrial de ROS es controvertido, y se ha reportado tanto el aumento de la producción de ROS (diazóxido) como la ausencia de este efecto (BMS191095). En este sentido, BMS191095 es un abridor de canales mito K_{ATP} muy selectivo en comparación con el diazóxido, este último tiene efectos no relacionados con los canales mito K_{ATP} que aumentan la generación de ROS en células de MLV y neuronas tras la inhibición de la succinato deshidrogenasa en el complejo II de la ETC (Katakam et al., 2016, 2014; Xi et al., 2005a). Los datos obtenidos demuestran que el tratamiento agudo de las arterias peneanas con BMS191095 redujo en lugar de aumentar la producción mitocondrial de ROS, un efecto independiente de NO que persistió después del bloqueo de la NOS. Estos hallazgos están en acuerdo con los reportados anteriormente en mitocondrias aisladas de corazón, hígado y cerebro, donde la apertura de canales mito K_{ATP} redujo la

generación de ROS (Busija et al., 2008; Pereira & Kowaltowski, 2021b) y previno el estrés oxidativo en células cardíacas isquémicas (Facundo et al., 2005). La disociación entre la despolarización mitocondrial inducida por los abridores de canales mitoK_{ATP} y la producción aumentada de ROS también se ha demostrado en arterias cerebrales mediante la activación farmacológica de los canales mitoK_{ATP} con BMS191095 (Katakam et al., 2014, 2013). Por otra parte, la exposición a largo plazo a BMS191095 en neuronas corticales de rata en cultivo redujo tanto la generación basal como la aumentada de ROS mitocondrial en respuesta a lesiones isquémicas y tóxicas (Gáspár et al., 2008b).

Si bien existe un consenso sobre el papel protector de la activación de los canales mitoK_{ATP} contra el daño isquémico en el corazón y el cerebro (Facundo et al., 2006, 2005; Gáspár et al., 2008b), la relación funcional entre estos canales y la bioenergética mitocondrial es poco clara. Así, existe poca información, dentro de la cual apenas se ha visto ningún efecto de los abridores de canales mitoK_{ATP} en la respiración mitocondrial tanto en mitocondrias cardíacas (Kowaltowski et al., 2001) como en neuronas (Katakam et al., 2016), aunque el aumento del flujo de K⁺ inducido por estos compuestos causa un aumento tanto en el volumen de la matriz mitocondrial como en el espacio intermembranoso, lo que respalda el concepto de que la regulación del volumen de la matriz mitocondrial para preservar el transporte a través de la membrana mitocondrial es una de las principales funciones fisiológicas de los canales mitoK_{ATP} (Facundo et al., 2006; Kowaltowski et al., 2001; O-Uchi et al., 2014; Pereira & Kowaltowski, 2021b). Los resultados presentes muestran que el tratamiento agudo *ex vivo* de las arterias peneanas con el abridor de canales mitoK_{ATP} BMS191095 tuvo efectos inhibitorios significativos sobre la dinámica mitocondrial y atenuó la respiración basal, el consumo de oxígeno para la síntesis de ATP y la acidificación extracelular indicativa de actividad glucolítica. En estudios anteriores sobre mitocondrias cardíacas aisladas se ha observado la inhibición de la respiración por abridores de canales mitoK_{ATP} como diazóxido y pinacidilo, que no se asoció a la apertura de canales mitoK_{ATP} debido a las altas concentraciones de los fármacos utilizados (Kowaltowski et al., 2001). Posteriormente, se propuso que los efectos de los abridores de canales mitoK_{ATP} en la respiración dependían del estado energético de las mitocondrias; la apertura de canales mitoK_{ATP} apenas tenía efecto en la respiración mitocondrial bajo condiciones fisiológicas, mientras que bajo condiciones energéticas menos favorables la apertura de canales mitoK_{ATP} podría evidenciarse por una aceleración de la respiración (Riess et al., 2008).

En el presente estudio, bajas concentraciones del potente y selectivo abridor del canal mitoK_{ATP} BMS191095 inhibieron consistentemente el consumo basal de oxígeno y la acidificación extracelular en mediciones en tiempo real realizadas en arterias recién aisladas, en asociación con niveles reducidos de ROS y vasodilatación arterial inducida por BMS191095 en tiempos similares también en arterias peneanas. Investigamos además si el NO vasodilatador liberado por BMS191095 del endotelio también podría desempeñar un papel en la respiración mitocondrial vascular mediante la activación de los canales mitoK_{ATP}. El bloqueo de la NOS y del NO endógeno con L-NOARG revirtió los efectos inhibitorios de la activación del canal mitoK_{ATP} sobre la respiración basal y el consumo de oxígeno para la síntesis de ATP, pero reveló una atenuación significativa de las capacidades respiratorias máximas y de reserva por parte de BMS191095. Estos resultados sugieren que la activación del canal mitoK_{ATP} desencadena efectos inhibitorios tanto dependientes como independientes de NO en la bioenergética mitocondrial de la pared vascular del pene.

El NO endógeno derivado de la eNOS endotelial juega un papel modulador en la respiración y el consumo de oxígeno tisular (Adler et al., 2001; Loke et al., 1999; Shen et al., 1995). Se ha demostrado que los agonistas endoteliales que liberan NO inhiben el consumo de oxígeno miocárdico en ratones, pero no en ratones deficientes en eNOS (Loke et al., 1999), y los inhibidores de NOS aumentaron el consumo de oxígeno en todo el cuerpo, corazón, riñón y músculo esquelético tanto in vivo como in vitro (Laycock et al., 1998; Shen et al., 1995, 1994). El NO es un gas difusible que permea las membranas mitocondriales e inhibe la respiración nitrosilando los centros de hierro- azufre de los complejos I y II de la ETC y a través de una alteración reversible de la citocromo c oxidasa; el efecto inhibitorio del NO en la citocromo c oxidasa es reversible en competencia con O₂ y ocurre a concentraciones fisiológicas de NO (Antunes et al., 2007; Ct & S, 2010). En las arterias peneanas, la activación de mitoK_{ATP} libera NO endotelial que inhibe la respiración mitocondrial basal y el consumo de oxígeno para la síntesis de ATP. Se demuestra en los resultados obtenidos que el NO exógeno administrado por el donador de NO SNAP tuvo efectos duales en la respiración y mimetizó los efectos inhibitorios de BMS191095 sobre la respiración basal y el oxígeno consumido para la síntesis de ATP, mientras que aumentó significativamente las capacidades respiratorias máximas y de reserva y la actividad glucolítica. Estos últimos hallazgos sugieren que bajo las condiciones experimentales del presente estudio y después de la inhibición de la ATP sintasa con oligomicina durante la “*Prueba de stressmitocondrial*”, el NO mejoró considerablemente la respiración.

La acción inhibitoria tanto del NO tanto endógeno como del exógeno liberado por donadores sobre la respiración mitocondrial está bien establecida, como se ha discutido anteriormente (Adler et al., 2001; Laycock et al., 1998; Loke et al., 1999; Palacios-Callender et al., 2004; Shen et al., 1995, 1994). Sin embargo, también se ha descrito que una regulación positiva de la respiración por parte del NO endógeno derivado de la NOS mitocondrial (Dyannik et al., 2020; Sakamuri et al., 2020). Aunque la identidad molecular de la NOS mitocondrial ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo (O-Uchi et al., 2014; Yin et al., 2014); los efectos estimulantes del NO sobre la respiración mitocondrial se han atribuido a la NOS mitocondrial en contraste con la acción inhibitoria derivada de la NOS extramitocondrial. Se ha visto que la inhibición de la isoforma neural de la NOS (nNOS) reduce la respiración basal y máxima en mitocondrias aisladas del cerebro y del corazón, donde se identificaron tanto la inmunorreactividad de nNOS como de eNOS (Sakamuri et al., 2020). Por otra parte, se ha demostrado que concentraciones bajas de L-arginina y del donante de NO SNAP estimulan la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata, y estos efectos son abrogados por inhibidores de la NOS, de la guanilato ciclasa y de la PKG, apoyando así un papel para el NO endógeno de la NOS mitocondrial en la activación de la respiración. Sin embargo, concentraciones más altas del donante de NO tienen efectos adversos al inhibir la respiración y promover la apertura de poros (Dyannik et al., 2020).

En el presente estudio, también se encontró un efecto estimulante sobre la respiración mitocondrial para el donante de NO SNAP en arterias peneanas a concentraciones similares a las reportadas para la estimulación *ex vivo* de mitocondrias hepáticas intactas, lo que sugiere que otras fuentes además de la NOS mitocondrial podrían contribuir a los efectos estimulantes del NO sobre la respiración. Además, observamos efectos duales (respiración basal y oxígeno consumido para la síntesis de ATP) y estimuladores (respiración máxima) a la misma concentración de SNAP en arterias peneanas aisladas. De hecho, estos efectos duales del NO exógeno serían consistentes con los efectos inhibitorios de BMS191095 sobre estos parámetros bioenergéticos en condiciones de bloqueo de la NOS endógena. El tratamiento con L-NOARG revirtió tanto la inhibición de la respiración basal como la inhibición de la respiración máxima inducida por BMS191095 en las arterias penianas, lo que sugiere que el hecho de que se mantenga la respiración máxima tras la activación de los canales mitoK_{ATP} puede atribuirse a la liberación simultánea de NO endógeno, cuyos efectos estimulantes sobre la respiración contrarrestarían un efecto inhibitorio de la activación de los canales mitoK_{ATP} sobre la respiración máxima. Por lo tanto, la

activación de los canales mitoK_{ATP} en las arterias peneanas que libera NO endotelial mimetizaría los efectos inhibidores y estimulantes duales del NO exógeno sobre la respiración. Además, el bloqueo del NO endógeno revela un efecto inhibitorio independiente del NO de la activación de los canales mitoK_{ATP} sobre la respiración mitocondrial. Se ha demostrado que las interacciones entre el NO y la citocromo c oxidasa de oxígeno en la cadena de transporte de electrones dependen de la concentración local de oxígeno, el estado redox de la citocromo c oxidasa y la actividad de la NOS, y estos factores pueden determinar la regulación por parte del NO de la bioenergética mitocondrial (Antunes et al., 2007; Ct & S, 2010). Se necesitan más estudios para dilucidar las acciones opuestas duales encontradas para el NO sobre la respiración mitocondrial de las arterias peneanas.

Por otro parte, la reducción mediada por NO de la respiración basal junto con una elevación de la respiración máxima desencadenada por el BMS191095 aumentó significativamente la capacidad respiratoria de las arterias peneanas, lo que sugiere que los canales mitoK_{ATP} podrían representar una nueva diana molecular para los casos de disfunción eréctil en los que el NO no está comprometido.

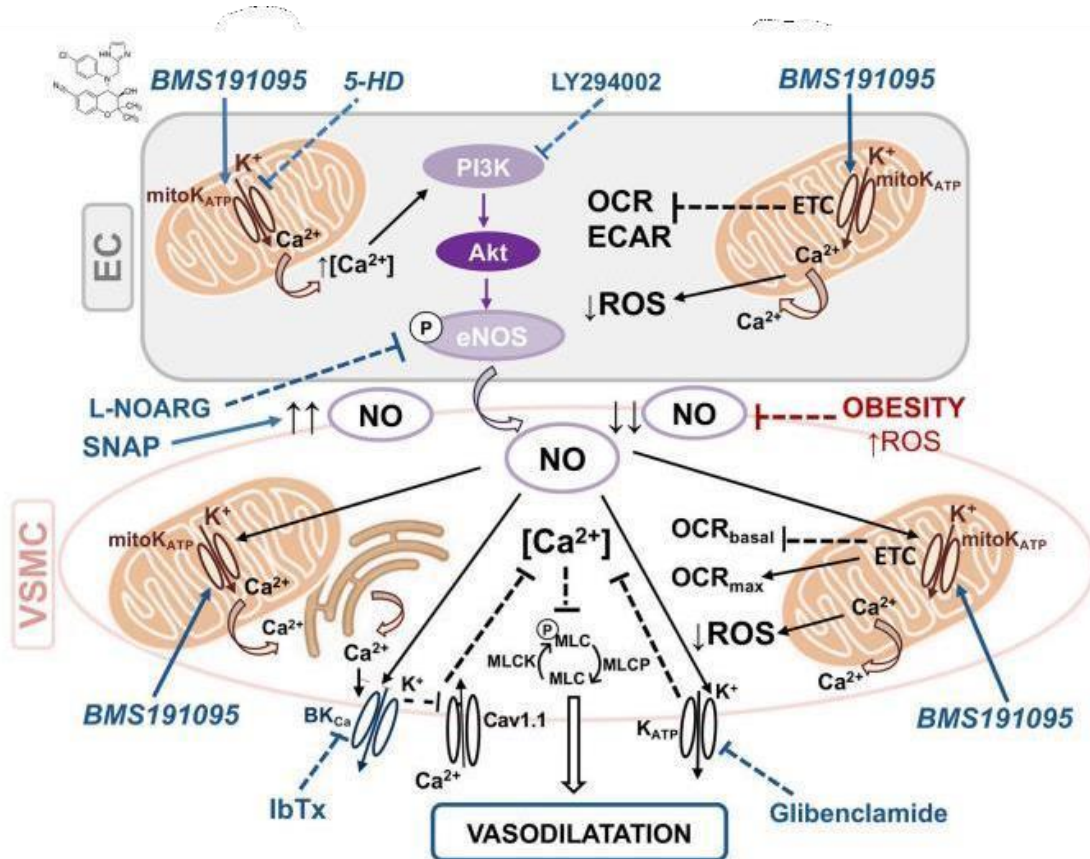


Figura 24. Vías de señalización que vinculan la activación de los canales mitocondriales KATP con la vasodilatación, la disminución de la producción de ROS y la reducción de la respiración mitocondrial en la pared arterial del pene. El activador selectivo de los canales mitocondriales KATP, BMS191095, estimula la vía PI3K/Akt/eNOS (inhibida por LY294002) en la célula endotelial (CE) que sintetiza y libera NO (inhibida por L-NOARG). El bloqueador de los canales mitocondriales KATP, 5-HD, redujo tanto la relajación mediada por BMS191095 como la mediada por NO exógeno. El NO difunde a las células del músculo liso vascular (VSMC) y activa los canales BKCa de la membrana plasmática (inhibidos por iberiotoxina -IbTx-) y los canales KATP (inhibidos por glibenclamide) para hiperpolarizar la membrana plasmática y reducir [Ca²⁺]_i, lo que conduce a la vasodilatación. La relajación inducida por BMS191095 mediada por NO se ve afectada en la obesidad. La activación de los canales mitocondriales KATP por BMS191095 también redujo el ROS mitocondrial e inhibió tanto la respiración basal como la máxima (OCR) y la actividad glucolítica (ECAR). El NO exógeno liberado del donante de NO SNAP relaja las arterias del pene, y tanto reduce la respiración basal como aumenta la respiración máxima y la capacidad respiratoria.

5.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL, ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL PENEANA EN LA OBESIDAD

La obesidad junto con la hiperlipidemia, la resistencia a la insulina y la hipertensión es uno de los factores que conforman el síndrome metabólico y que conducen a la diabetes tipo 2 incrementando la incidencia tanto de DE como de enfermedad arterial coronaria (Alexander et al., 2003; Corona et al., 2023; Fonseca & Jawa, 2005; Gazzaruso et al., 2004; Montorsi et al., 2006; Vlachopoulos et al., 2013a). Por otra parte, la diabetes tipo 2 y la obesidad se asocian con disfunción endotelial y resistencia vascular a la insulina, factores determinantes en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular así como de la DE (Contreras et al., 2010; Fonseca & Jawa, 2005; Prieto et al., 2014). Se acepta, por tanto, que la disfunción endotelial es el vínculo entre DE y enfermedad cardiovascular, y representa un factor patogénico inicial en el desarrollo de la DE vasculogénica (De Leonardis et al., 2022; Kirby et al., 2005).

En estudios llevados a cabo en la rata Zucker obesa, modelo de obesidad genética/resistencia a la insulina que presenta DE (Wingard et al., 2007), nuestro grupo de investigación han demostrado previamente la existencia de disfunción endotelial (Villalba et al., 2009) y neural (Sánchez et al., 2012b) en arterias peneanas debido fundamentalmente a alteraciones en la vía de señalización de la NOS/NO, mientras que en los mismos animales, el lecho vascular coronario se encuentra protegido de la disfunción endotelial y de la resistencia vascular a la insulina mediante una regulación al alza de la cascada de señalización intracelular de la Akt/eNOS/NO y una reducción de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Contreras et al., 2010; Prieto et al., 2014; Villalba et al., 2009), apoyando así la evidencia clínica que la disfunción endotelial peneana y la DE preceden a la disfunción endotelial y enfermedad arterial coronaria (Gazzaruso et al., 2004).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha evaluado el papel de la mitocondria y del estrés del RE en la patogénesis de la disfunción vascular peneana asociada a la obesidad, utilizando para ello un modelo de obesidad en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa durante cuatro meses (HFD), modelo de obesidad inducida por dieta representativo de los casos más prevalentes de obesidad en la sociedad occidental. Nuestros resultados confirman disfunción endotelial en arterias peneanas de ratas HFD, como se deduce de la reducción de las respuestas relajantes al agonista endotelial ACh en arterias de ratas obesas comparadas con sus controles. El estrés oxidativo es uno de los factores más importantes que subyacen a disfunción endotelial en la obesidad, ya que reduce la biodisponibilidad de NO y su acción protectora de los procesos que conducen a la arterosclerosis en la pared arterial (Muñoz et al., 2020;

Prieto et al., 2014). Se sabe que un aumento de la concentración de ROS está ligado a obesidad y otras patologías como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (McMurray et al., 2016). Diversas isoformas de la Nox, la xantina oxidasa y el desacoplamiento de la NOS participan en la producción incrementada de ROS en el tejido arterial peneano de ratas con obesidad genética y obesidad inducida por dieta (Contreras et al., 2010; Prieto et al., 2014; Sánchez-Gómez et al., 2015). Los resultados del presente estudio demuestran que la disfunción endotelial peneana se asocia con un notable incremento de las ROS mitocondriales en arterias peneanas, superóxido medido con el mitoSOX así como del H₂O₂ celular determinado mediante el Amplex Red.

Se ha descrito que el exceso de sustratos energéticos en la obesidad causa disfunción mitocondrial y alteraciones en la señalización de las ROS, factores que subyacen a la resistencia a la insulina (Houstis et al., 2006) La ingesta tanto aguda como crónica de una dieta rica en grasa (60%) produjo un marcado incremento del potencial generador de H₂O₂ mitocondrial, y un cambio hacia un entorno celular más oxidado cuya persistencia en el tiempo conduce a la resistencia a la insulina en las células musculares esqueléticas (Anderson et al., 2009). En miocitos cardíacos de ratones con obesidad inducida por dieta, los niveles elevados de H₂O₂ se asocian con disfunción mitocondrial y cardiopatía metabólica (Luptak et al., 2019; Sverdlov et al., 2016), mientras que en pacientes con diabetes tipo II, obesidad y dislipidemia, el estrés oxidativo mitocondrial en arteriolas de la grasa muscular y en células mononucleares de la sangre se asocia con disfunción endotelial tanto *in vivo* como *in vitro* (Kizhakekuttu et al., 2012). Estos últimos resultados estarían de acuerdo con los del presente estudio demostrando la producción incrementada de H₂O₂ mitocondrial se asocia con disfunción endotelial en arterias peneanas de ratas con obesidad inducida por dieta. Sin embargo, mientras que en el estudio de Kizhakekuttu y col. (Kizhakekuttu et al., 2012) el antioxidante mitocondrial mitoTempo mejoró notablemente las relajaciones endoteliales e incrementó la biodisponibilidad del NO, implicando a las ROS derivadas de la mitocondria en la disfunción endotelial, en nuestro estudio el tratamiento con mitoTempo inhibió las relajaciones dependientes del endotelio de arterias peneanas control, y en mayor medida las relajaciones de ratas HFD. Estas observaciones sugieren que el H₂O₂, vasodilatador mitocondrial derivado del endotelio participa en las relajaciones de las arterias peneanas, y existe una producción incrementada de H₂O₂ mitocondrial en ratas obesas que probablemente compensa la disfunción endotelial debida a la alteración de la vía del NO debida al estrés oxidativo (Sánchez-Gómez et al., 2015).

Si bien el incremento de ROS mitocondriales se ha ligado tradicionalmente al daño vascular en patologías metabólicas como la resistencia a la insulina, la diabetes y

la obesidad (McMurray et al., 2016; Shah & Brownlee, 2016), investigaciones recientes demuestran que las ROS derivadas de la mitocondria juegan un papel fisiológico regulador en mecanismos de señalización celular, y en particular en el endotelio vascular que no es tan dependiente de la mitocondria para cubrir sus demandas energéticas como el músculo liso (Erusalimsky & Moncada, 2007; Kadlec et al., 2016). El H_2O_2 , además de ser clave en la señalización de la respuesta al estrés oxidativo, es un vasodilatador fisiológico en diversos lechos vasculares como el coronario (Santiago et al., 2013; Zhang et al., 2012) y el renal (Muñoz et al., 2018) y también en las arterias peneanas (Prieto et al., 2010) y en el CC humano y de la rata (Angulo et al., 2019). EL H_2O_2 derivado de la mitocondria está implicado en la dilatación inducida por flujo de las arteriolas coronarias humanas (Liu et al., 2011, 2003; Miura et al., 2003) y en la relajación por hiperpolarización derivada del endotelio (EDH) en arterias preglomerulares del riñón (Muñoz et al., 2018, 2017). Su efecto relajante es el resultado de acciones tanto en el endotelio como en el músculo liso vascular. Aunque existen trabajos en los cuales se ha demostrado la producción endotelial de NO por activación de la eNOS en respuesta al H_2O_2 , que a su vez es liberado de la Nox4 endotelial en respuesta al *shear stress* (Bretón-Romero & Lamas, 2014; Sánchez-Gómez et al., 2015), en arterias coronarias se ha propuesto al H_2O_2 como factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) que actúa en el VSM activando los canales K_{Ca} mediante la estimulación de la PKG, lo que llevaría a una hiperpolarización de la célula y por tanto a la relajación consecuente (Liu et al., 2011; Vanhoutte et al., 2017; Zhang et al., 2012). En arteriolas preglomerulares del riñón, el H_2O_2 derivado de las enzimas endoteliales CYP2C epoxigenasa y Nox2 y Nox4 activa canales K_{Ca} endoteliales y participa así en la respuesta relajante tipo EDH (Muñoz et al., 2018, 2017).

Los resultados del presente trabajo demuestran que el H_2O_2 es liberado del endotelio de las arterias peneanas en condiciones fisiológicas y relaja el músculo liso probablemente vía activación de la eNOS y liberación de NO (Sánchez-Gómez et al., 2015), ya que las relajaciones endoteliales a la ACh son completamente inhibidas al bloquear la NOS en la arteria dorsal peneana (Prieto et al., 2010; Villalba et al., 2009). Por otra parte, en arterias peneanas de ratas obesas, en las que la disfunción endotelial está mediada por alteraciones en la biodisponibilidad de NO (Contreras et al., 2010; Villalba et al., 2009), la vasodilatación incrementada mediada por H_2O_2 mitocondrial tendría un papel compensador en la disfunción endotelial peneana. Estos resultados estarían de acuerdo con lo descrito para arteriolas de pacientes con enfermedad arterial coronaria, donde debido al estrés oxidativo, la disponibilidad del NO se ve reducida por su interacción con el $O_2^{\cdot-}$, y la dilatación microvascular se mantiene por la liberación

compensadora de H_2O_2 de la mitocondria (Beyer et al., 2016; Freed et al., 2014; Liu et al., 2003). El grupo de Gutterman y colaboradores ha demostrado que existe un descenso de los niveles cardiacos y vasculares del PGC-1 α (coactivador 1 α del receptor activado γ del proliferador de peroxisoma) en pacientes con enfermedad arterial coronaria, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e hipertensi3n, y la p3rdida de PGC-1 α en el endotelio de las arteriolas del tejido adiposo es responsable del cambio de dilataci3n mediada por NO a dilataci3n mediada por H_2O_2 (Kadlec et al., 2017, 2016). PGC-1 α es un regulador metab3lico miembro de la familia de co-activadores transcripcionales que regula la biog3nesis mitocondrial y la vincula a los sistemas antioxidantes de la mitocondria. En las c3lulas endoteliales, el PGC-1 α incrementa la expresi3n de los sistemas antioxidantes de la mitocondria -MnSOD, peroxirredoxinas 3 y 5, tioredoxina, UCP-2 y catalasa-, y previene la disfunci3n mitocondrial provocada por la hiperglucemia incrementando el potencial de membrana mitocondrial y reduciendo la apoptosis (Valle et al., 2005). El PGC-1 α sufre desregulaci3n en pacientes y animales obesos (Kadlec et al., 2017; P3rez et al., 2019), por lo que los niveles elevados de H_2O_2 en las arterias peneanas de ratas HFD en el presente estudio, podr3an estar relacionados con una desregulaci3n del PGC-1 α y cambios en la expresi3n y actividad de los sistemas antioxidantes mitocondriales, a pesar de que no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de MnSOD entre arterias de ratas obesas comparadas con sus controles.

Por otro lado, los efectos perjudiciales del H_2O_2 en la enfermedad cardiovascular han sido atribuidos a su origen y a sus concentraciones locales. As3, estudios recientes demuestran que el H_2O_2 derivado de la enzima Nox4 endotelial tiene un papel protector de la aterosclerosis (Craig et al., 2015; Gray et al., 2016) y es capaz de mejorar la vasodilataci3n sin efectos oxidativos perjudiciales en la pared vascular (Ray et al., 2011). En arterias preglomerulares del ri3n humano, el H_2O_2 derivado de la Nox4 endotelial contribuye a la vasodilataci3n dependiente del endotelio en condiciones fisiol3gicas (Mu3oz et al., 2018). Los resultados del presente estudio demuestran que los niveles incrementados de H_2O_2 mitocondrial en las arterias peneanas de ratas obesas se asocian con una regulaci3n al alza de la enzima mitocondrial Nox4 expresada en el endotelio arterial, lo que contribuir3a a la vasodilataci3n compensadora de la disfunci3n endotelial peneana debida al estr3s oxidativo y a la reducci3n de la biodisponibilidad de NO por su interacci3n con los aniones $O_2^{\cdot-}$ (Prieto et al., 2010; S3nchez-G3mez et al., 2015).

Se ha descrito que el estrés oxidativo mitocondrial y la disfunción endotelial tanto *in vivo* como *ex vivo* están asociados con disfunción mitocondrial reflejada en el descenso de la masa mitocondrial e hiperpolarización de la mitocondria de las células endoteliales, en arteriolas de pacientes diabéticos tipo 2 (Kizhakekuttu et al., 2012). Alteraciones en la dinámica mitocondrial, con incrementos de la fisión mitocondrial y de la producción mitocondrial de ROS se han asociado también con disfunción endotelial y daño vascular en la diabetes (Shenouda et al., 2011). El daño mitocondrial y el descenso de la densidad mitocondrial en cardiomiocitos de animales con obesidad inducida por dieta están estrechamente asociados con una regulación a la baja del PGC-1 α (Ventura-Clapier et al., 2008). En el presente estudio, el incremento de los ROS mitocondriales y la disfunción endotelial de las arterias peneanas de ratas con obesidad inducida por dieta se produjeron en paralelo con alteraciones marcadas del perfil bioenergético mitocondrial de las arterias con un descenso significativo de la respiración basal, el consumo de oxígeno para la síntesis de ATP, la respiración máxima, la fuga de protones y la respiración no mitocondrial. Estas observaciones estarían de acuerdo con investigaciones que demuestran que el estrés oxidativo mitocondrial produce disfunción en la bioenergética mitocondrial de miocitos cardiacos que precede a las lesiones estructurales y funcionales de la enfermedad cardiaca metabólica en obesidad y diabetes (Luptak et al., 2019; Sverdlov et al., 2016, 2015). En ratones con obesidad inducida por dieta, se produjo un incremento notable de la producción de H₂O₂ en las mitocondrias cardiacas junto con una reducción del consumo de oxígeno, la síntesis de ATP y la fuga de protones, alteraciones asociadas a hipertrofia ventricular izquierda, disminución de la contractilidad cardiaca y disfunción diastólica izquierda; la sobreexpresión de catalasa en la mitocondria en ratones transgénicos, mejora las alteraciones en la respiración mitocondrial y en la estructura y disfunción cardiacas (Luptak et al., 2019; Sverdlov et al., 2016, 2015). Estos estudios además demuestran que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en la enfermedad cardiaca metabólica en ratones con obesidad inducida por dieta se asocian con modificaciones post-translacionales oxidativas de residuos cisteína que alteran la función del complejo II de la ETC en los miocitos cardiacos contribuyendo así a la enfermedad cardiaca (Sverdlov et al., 2015). Se han descrito también alteraciones de la respiración mitocondrial con reducción del consumo máximo de oxígeno e incremento del estrés oxidativo mitocondrial asociados a daño en el ADN en cardiomiocitos de ratas con obesidad genética; en estos animales, los niveles elevados de H₂O₂ derivados de la mitocondria cardiaca alteraron la vasodilatación metabólica y el flujo sanguíneo coronario (Guarini et al., 2016).

Por otro lado, la disfunción mitocondrial con reducción del perfil bioenergético y el consumo de oxígeno hallada en el presente estudio en arterias peneanas de ratas con obesidad inducida por dieta estarían de acuerdo con lo descrito para las arterias cerebrales de ratas con obesidad genética/resistencia a la insulina en un estadio en el que han desarrollado ya diabetes tipo II (Merdzo et al., 2017). En las arterias de estos animales, se produce un descenso de la respiración basal y de la fuga de protones, asociados a un incremento marcado de la producción de superóxido, de acuerdo con lo encontrado en nuestro estudio. La fuga de protones indica el flujo de protones a través de membrana interna de la mitocondria que no son utilizados para la síntesis de ATP sino para la termogénesis, y que puede ser afectado por la generación de ROS (Rolfe & Brown, 1997) y por las proteínas desacoplantes, que participan en la fuga de protones inducida y tienen un papel protector en la célula frente al estrés oxidativo (Brand & Esteves, 2005; Busiello et al., 2015). La reducción de la fuga de protones de la mitocondria asociada al incremento de los ROS mitocondriales en arterias peneanas de ratas HFD, estaría de acuerdo con la reducción del desacoplamiento mitocondrial descrito en el músculo esquelético en obesidad y diabetes tipo 2, que se acompaña del descenso de la oxidación de los ácidos grasos y del acúmulo de los mismos y sus metabolitos, lo que conduce al incremento del estrés oxidativo, factor clave en la progresión de las patologías metabólicas (Patti & Corvera, 2010).

En condiciones fisiológicas la vía de la L-arginina/NO es el principal mecanismo que produce vasodilatación en arterias y cuerpo cavernoso. Cuando este sistema se encuentra alterado, entra en juego el otro sistema que utiliza las NADPH oxidasas endoteliales para producir H_2O_2 que actúa como un potente vasodilatador fisiológico (Meulemans, 2005), por lo que existe un cambio adaptativo a la capacidad de la eNOS para sintetizar NO como se ha discutido previamente. También se demuestra en el presente trabajo que existe una alteración de la vía de la eNOS al observar una disminución de la respuesta relajante del abridor de canales mitoK_{ATP} BMS191095. La vasodilatación peneana mediada por NO derivado tanto del endotelio como de los nervios está profundamente alterada (Prieto et al., 2010; Sánchez et al., 2012b; Villalba et al., 2009) y asociada a la DE en la obesidad (Wingard et al., 2007), debido al estrés oxidativo y a los niveles altos de ROS que inactivan el NO. Como hemos demostrado en esta Tesis Doctoral, la activación selectiva de los canales mitoK_{ATP} produce relajación mediada por NO endotelial en las arterias peneanas, y esta relajación está alterada en ratas HFD, de acuerdo con lo descrito previamente en arterias cerebrales de ratas con obesidad inducida por dieta (Katakam et al., 2009). En el lecho arterial cerebral, se ha demostrado que además de la alteración de la relajación mediada por NO, se produce

una reducción significativa de la despolarización y de las *sparks* de calcio activadas por los abridores de los canales mitoK_{ATP} en las células de músculo liso arterial, lo que conlleva una menor activación de los canales BK_{Ca} y de la vasodilatación inducida por BMS191095 (Katakam et al., 2014). Nuestros resultados indican que la alteración de los canales mitoK_{ATP} puede contribuir a la disfunción mitocondrial peneana y limitar los mecanismos arteriales de protección frente a la isquemia en la obesidad inducida por dieta.

Las complicaciones cardiovasculares asociadas a la diabetes y a la obesidad están estrechamente relacionadas con la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial (Prieto et al., 2014). Por otro lado, la obesidad y la diabetes son condiciones metabólicas en las cuales la elevada demanda en la síntesis de proteínas sobrepasa la capacidad del RE de plegamiento y de maduración post-translacional de proteínas, activando la UPR (Cybulsky, 2017; Guo et al., 2023). Esta respuesta reduce la carga de plegado del RE reduciendo la síntesis proteica y el transporte proteico al RE (Guo et al., 2023; Hetz & Papa, 2018). Si el estrés del RE se prolonga crónicamente y la UPR falla a la hora de restaurar la homeostasis del RE, sobreviene el estrés del RE asociado a la inflamación celular y la apoptosis (Maamoun et al., 2019b). La UPR opera a través de la activación de tres sensores unidos al RE: la cinasa PERK que atenúa la traducción del ARNm y reduce la carga del RE, el factor de transcripción ATF6 que induce la expresión de genes de respuesta al estrés de RE especialmente chaperonas como el BiP para ayudar en el proceso correcto de plegamiento de proteínas, y la enzima IRE1 α que estimula en última instancia la transcripción de genes que codifican chaperonas moleculares y proteínas de la maquinaria de degradación del RE de proteínas mal plegadas; cuando la UPR falla, es la IRE-1 α la enzima que activa las vías apoptóticas y la inflamación (Marciniak & Ron, 2006). Las chaperonas lumbales del RE, en particular BiP/GRP78 mantienen los tres sensores de estrés del RE inactivos, y cuando se acumulan las proteínas no plegadas BIP se aísla del dominio luminal de los sensores para su activación y mantener así la homeostasis (Tripathi & Pandey, 2012).

Se ha demostrado que existe un incremento en la expresión de marcadores del estrés del RE en hígado y tejido adiposo tanto en ratones con obesidad genética como en aquellos en los que se estableció un modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa, que incluyen un incremento en las formas fosforiladas PERK y eIF2 α (Özcan et al., 2004). Los resultados del presente estudio demuestran que la disfunción endotelial peneana de ratas HFD se asocia con un incremento significativo de la expresión de los marcadores de estrés del RE en el tejido eréctil, específicamente de la forma fosforilada de eIF2 α , factor activado por fosforilación por la cinasa PERK, lo que contribuye a

reducir la carga del RE, y del ATF6 que activa la síntesis de chaperonas y la cascada de señalización apoptótica. Aunque hay una disminución de forma fosforilada de la PERK se sabe que existen otras quinasas responsables de la fosforilación de eIF2 α (Rojas et al., 2010). El notable incremento de ATF6 α coincide con experimentos realizados por Sharma y colaboradores en los que se observó un incremento de la expresión de ATF6 α en muestras de hepatocitos y adipocitos de pacientes obesos (Sharma et al., 2008). La expresión de BiP no reflejó apenas cambios entre el modelo HFD y el control, en algunos artículos se menciona que la expresión de BiP se encuentra más marcada en modelos en los que se ha establecido el síndrome metabólico o en diabetes (Girona et al., 2019).

5.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL, ALTERACIÓN DEL METABOLISMO REDOX Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL PENEANA EN EL ESTRÉS DEL RE INDUCIDO POR TUNICAMICINA

Se ha sugerido que el estrés del RE es el vínculo entre resistencia a la insulina, estrés oxidativo y disfunción endotelial (Maamoun et al., 2019a). Con el fin de clarificar la participación del estrés del RE en la disfunción endotelial y las alteraciones vasculares asociadas a la obesidad inducida por dieta encontradas en el tejido eréctil de ratas HFD, se estableció un modelo en rata de estrés del RE inducido químicamente con tunicamicina. En cuanto a los valores de los marcadores de estrés del RE, la expresión de la forma fosforilada de PERK, del factor de transcripción ATF6 α y de la forma fosforilada de la enzima IRE1 α estuvo significativamente incrementada en tejido eréctil de ratas tratadas con tunicamicina, lo que indica la activación de las tres vías que operan en la respuesta UPR y confirma el estrés del RE en el modelo.

El estrés del RE provoca una disrupción en la homeostasis del Ca²⁺, regulador clave del tono vascular (Zavadskis et al., 2024). En experimentos realizados en miógrafo con arterias provenientes de biopsias del glúteo de pacientes con arteriopatía cerebral autosómica dominante e infartos subcorticales y leucoencefalopatía, en las cuales se observó la expresión de marcadores del estrés del RE, se vio reflejada una disminución de la vasoconstricción con Phe (Neves et al., 2019). Así como también se observó en dicho trabajo (Neves et al., 2019) un aumento de la actividad Rho-cinasa y una disminución en las corrientes transitorias de Ca²⁺, lo que según los resultados obtenidos refleja una disminución del Ca²⁺ citosólico. En muestras de tiras hepáticas de rata tratadas con tunicamicina se observó también una disminución de los niveles vasculares de Ca²⁺ (Zavadskis et al., 2024).

Los datos obtenidos en el presente estudio demuestran una inhibición en la vasoconstricción α -adrenérgica en las arterias peneanas del modelo de estrés del RE lo que concuerda con los resultados obtenidos en trabajos previos (Neves et al., 2019). Esto podría deberse a una disminución de los niveles Ca^{2+} intracelulares como se ha visto en experimentos realizados con tunicamicina (Zavadskis et al., 2024). Aun así, se requerirían más estudios para confirmar esta teoría.

Furmanik y colaboradores han demostrado que el estrés del RE es una respuesta al estrés celular que conduce a un cambio fenotípico en el VSM (Furmanik et al., 2021). La proteína homóloga de C/EBP (CHOP) es uno de los efectores de UPR inducida por ERE, la cual es capaz de promover la proliferación celular en VSM (Guo et al., 2023; Zhou et al., 2015). Cuando la expresión de PERK y CHOP es alta, se promueve la transformación de VSM de un fenotipo contráctil a un fenotipo sintético que conduce al aumento de la resistencia vascular y a procesos patológicos como la hiperplasia de la íntima y la aterosclerosis (Renna & Miatello, 2013; R. Zhang et al., 2020).

Los datos del presente estudio demuestran disfunción endotelial peneana en el modelo de estrés del RE inducido por tunicamicina, como se deduce de la reducción de la respuesta relajante a la acetilcolina en arterias peneanas de ratas tratadas con tunicamicina, y también de las relajaciones inducidas por el agonista β -adrenérgico isoprenalina, que induce vasodilatación en parte por activación de la vía endotelial PI3K/NOS/NO endotelial. La disfunción endotelial se caracteriza por una reducción en la síntesis y biodisponibilidad de NO, acompañada de incremento del estrés oxidativo y de la expresión de moléculas de adhesión y pro-inflamatorias (Prieto et al., 2014). En pacientes con diabetes, el estrés del RE se encuentra asociado a una disminución de la biodisponibilidad del NO (Ruan et al., 2021; Sheikh-Ali et al., 2010). Cuando se produce el estrés del RE, IRE1 α activa cJNK a través de la vía de señalización de la insulina, produciéndose una reducción en la producción de eNOS y NO (Andreozzi et al., 2007; Ruan et al., 2021). Cuando el ERE persiste, se expresan proteínas que favorecen la apoptosis como es el caso de CHOP. CHOP-10 es un regulador negativo de C/EBP, y este último ha sido identificado como un elemento de respuesta identificado en el gen promotor de eNOS (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999). La expresión de CHOP-10 se encuentra incrementada en el modelo de rata diabética con estreptozotocina, por tanto, inhibiendo la expresión de eNOS (Ruan et al., 2021). Además, en células en condiciones de ERE, TNF α induce la expresión de miR155 que reduce la expresión de eNOS uniéndose a 3'UTR, afectando a la vida media del RNA de eNOS y con ello a la subsecuente producción de NO (Lee et al., 2013; Ruan et al., 2021). En un estudio

realizado por Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2018) en el modelo diabético de rata inducido por estreptozotocina tratadas con danshen (salvia roja) se observó una reducción en la producción de los niveles de ROS, así como de los niveles de CHOP y Grp78, biomarcadores del estrés del RE. Esto se tradujo en una mejora de la función eréctil aumentando los tiempos de erección en las ratas tratadas frente a las ratas diabéticas no tratadas. Un estudio reciente realizado por Guo y colaboradores (2023) ha demostrado que el estrés del RE se encuentra involucrado en la disfunción eréctil causada por el daño en el cuerpo cavernoso que se produce en muchos pacientes tras una cirugía por cáncer de próstata.

A nivel vascular, se ha demostrado que el estrés del RE induce disfunción endotelial asociada a un descenso de la biodisponibilidad de NO en aorta y arterias mesentéricas de resistencia de ratones hipertensos (Kassan et al., 2012) y de un modelo de estrés del RE inducido por tunicamicina, y en ratones con obesidad inducida por dieta (Cheang et al., 2014) asociados a un descenso en la fosforilación de la eNOS, y de la producción endotelial de NO e incremento de la actividad del TFG- β 1. El inhibidor del estrés el retículo TUDCA (ácido tauroursodeoxicólico), redujo la inflamación y mejoró la neovascularización y el flujo sanguíneo en un modelo en ratón de diabetes tipo II (Amin et al., 2012).

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que la disfunción endotelial asociada al estrés del RE inducido químicamente en arterias peneanas es debida en parte a la reducción en la biodisponibilidad de NO como, demuestra la alteración de las relajaciones al agonista endotelial acetilcolina que dependen principalmente de la liberación NO endotelial (Villalba et al., 2009). Se ha descrito que el estrés oxidativo vascular en condiciones de estrés del RE, ya sea en modelos de hipertensión/diabetes o en el modelo de tunicamicina, procede de la producción de ROS por parte de las enzimas Nox (Nox2 y Nox4) (Galán et al., 2014; Kassan et al., 2012), lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados que demuestran que la apocinina, inhibidor no selectivo de la Nox pero con mayor afinidad por la Nox2, mejora notablemente la disfunción endotelial de las arterias peneanas. Además, existen varios trabajos que respaldan que los niveles de las Nox se ven incrementados en condiciones de estrés del RE (Chen et al., 2008; Li et al., 2010, 2010; Santos et al., 2009; Wu et al., 2010). En células endoteliales coronarias con inducción química del estrés del RE e incremento de la fosforilación de PERK y de la expresión de AT6 α , como en el CC de ratas tratadas con tunicamicina en nuestro estudio, el estrés oxidativo estuvo asociado a una marcada regulación al alza de las enzimas Nox2 y Nox4 junto con un descenso marcado de la actividad de la NOS (Galan et al., 2014). Por otra parte, la deficiencia de

la subunidad funcional de la Nox2 p47phx en ratones evitó la disfunción endotelial provocada por el estrés del RE (Galán et al., 2014). Además, tanto la Nox1 como la Nox4 estuvieron reguladas al alza en aorta y arterias mesentéricas tratadas con tunicamicina (Kassan et al., 2012).

En los desórdenes metabólicos, la interacción entre el RE y la mitocondria es una de las causas del estrés oxidativo mitocondrial y de la subsiguiente alteración de la función mitocondrial (Safiedeen et al., 2016). En el presente estudio, se evaluó la contribución del estrés oxidativo mitocondrial a la disfunción endotelial de las arterias peneanas de ratas con estrés del RE, observándose que la pérdida del componente H_2O_2 vasodilatador contribuía también a la disfunción endotelial, como se deduce de la falta de efecto inhibitor del antioxidante mitocondrial mitoTempo sobre las relajaciones inducidas tanto por la acetilcolina como por la isoprenalina, a diferencia de lo que ocurre en las arterias control. Además, la pérdida de la vasodilatación endotelial mediada por H_2O_2 se acompaña de una reducción de los niveles de superóxido y del H_2O_2 mitocondrial a pesar de que la expresión de la Nox4, enzima mitocondrial productora de H_2O_2 mitocondrial productora de H_2O_2 , está incrementada. Sin embargo, los niveles de la enzima MnSOD, que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y H_2O_2 están significativamente reducidos, lo que explicaría la reducción de los niveles de H_2O_2 en las arterias peneanas de ratas con estrés del RE.

Si bien los mecanismos de activación de la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR) que desencadena las vías apoptóticas en el estrés del RE están claramente establecidos, los eventos metabólicos que tienen lugar durante la fase adaptativa de estrés del RE son menos conocidos. En el presente trabajo demostramos que las arterias peneanas del modelo de estrés del RE inducido por tunicamicina presentan un incremento de la respiración mitocondrial basal, así como del consumo de oxígeno para la síntesis de ATP, y un marcado incremento de la actividad glucolítica como se deduce del aumento de la tasa de acidificación extracelular, coincidente con los niveles elevados de lactato en sangre. Asociados a estos resultados, hemos demostrado una reducción en los niveles de ROS mitocondriales que podría explicarse como consecuencia de esta respuesta adaptativa de la célula al estrés del RE que consiste en un aumento de la bioenergética mitocondrial con el fin de reducir la producción de ROS.

Así, de acuerdo con los trabajos realizados por Bravo y colaboradores (2011) Knupp y colaboradores (2019) la activación de la respiración mitocondrial formaría parte

de la respuesta adaptativa al estrés del RE, como se ha demostrado en levaduras y células de mamíferos con estrés del RE inducido por tunicamicina. Esta respuesta favorece un mayor consumo de O_2 que reduce la acumulación de ROS y promueve la supervivencia de la célula. Durante el estrés del RE, el Ca^{2+} es liberado del RE y entra en la mitocondria con el fin de incrementar la respiración y por tanto la producción de ATP ya que hay una mayor demanda de ATP por parte del RE dado que la actividad de las chaperonas se encuentra incrementada. Este movimiento de Ca^{2+} hacia la mitocondria regula la fosforilación oxidativa incrementando la actividad de la cadena respiratoria y el potencial de membrana mitocondrial, e inicialmente representa una respuesta adaptativa al estrés del RE (Alevriadou et al., 2021; Bravo et al., 2011; Knupp et al., 2019; Vannuvel et al., 2013). En los trabajos realizados por Knupp y colaboradores se ha visto que el marcador del estrés del RE IRE1 α y la calcineurina contribuyen a la respuesta mitocondrial frente al estrés del RE, ambas proteínas son necesarias para una respuesta adaptativa al exceso de Ca^{2+} que entra en la mitocondria, así como para regular la actividad del componente de la ETC mitocondrial citocromo c oxidasa que contribuye a la prevención de ROS (Knupp et al., 2019). Además, los marcadores del estrés del RE ATF6 y ATF4 controlan la expresión de PGC1 α el cual tiene un papel muy importante en la regulación de la biogénesis mitocondrial, ligando la UPR con la regulación de genes que participan en el metabolismo celular (Knupp et al., 2019; Senft & Ronai, 2015).

Por tanto, los resultados del presente estudio demostrando un incremento de la bioenergética mitocondrial en arterias peneanas de ratas tratadas con tunicamicina, representarían las bases metabólicas de la adaptación arterial ante la respuesta de estrés del RE, como se ha demostrado previamente en células aisladas.

VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se han evaluado los efectos de los abridores de canales mitoK_{ATP} en las arterias peneanas, así como el papel de la mitocondria y del estrés del RE en la disfunción vascular peneana asociada a la obesidad. De los resultados obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. La apertura de los canales mitoK_{ATP} regula el tono arterial peneano en condiciones fisiológicas a través de la participación del endotelio vascular, y la liberación de NO a través de la vía de la PI3K/Akt, que a su vez relaja el músculo liso vascular vía activación de canales mitoK_{ATP} y canales BK_{Ca}.
2. La activación de los canales mitoK_{ATP} conlleva una disminución de la respiración basal mitocondrial, del consumo de oxígeno para la síntesis de ATP y de la actividad glucolítica, efectos mediados en parte por la liberación de NO. En ausencia de NO endógeno, la apertura de canales mitoK_{ATP} produce una disminución de la capacidad respiratoria de reserva, así como de la respiración máxima.
3. El NO exógeno tiene un efecto dual sobre las arterias peneanas, por una parte, inhibiendo la respiración basal mitocondrial y el consumo de oxígeno destinado a la síntesis de ATP, y por otra parte aumentando la respiración máxima así como la capacidad respiratoria de reserva.
4. La apertura de los canales mitoK_{ATP} reduce la producción de ROS, independientemente de la producción de NO
5. La obesidad inducida por dieta produce disfunción endotelial en las arterias peneanas, así como una inhibición de la regulación del tono arterial peneano mediada por los canales mitoK_{ATP}.
6. Los niveles de ROS mitocondriales y la liberación de H₂O₂ vasodilatador están incrementados en las arterias peneanas de animales obesos, incremento asociado a la regulación al alza en el endotelio de la enzima mitocondrial Nox4, constituyendo un mecanismo compensador a la disfunción endotelial debida a la disminución de la biodisponibilidad del NO.

7. Los parámetros bioenergéticos, respiración basal, consumo de ATP, fuga de protones y respiración no mitocondrial, están disminuidos en arterias peneanas de ratas obesas, como se ha descrito para el músculo esquelético y cardíaco en el curso de alteraciones metabólicas con exceso de sustratos energéticos y asociadas al incremento de H_2O_2 .
8. La respuesta del estrés del RE se encuentra activada en el tejido eréctil de ratas obesas, como indica el incremento en la expresión de los marcadores p e lF2 α , AT6 α
9. En condiciones de estrés del RE inducido químicamente, la disfunción vascular peneana se manifiesta por una reducción de la vasoconstricción arterial y por una disfunción endotelial.
10. La disfunción endotelial inducida por estrés del RE se debe a un descenso de la vasodilatación mediada por NO asociado a ROS derivados de la Nox, y a una reducción del H_2O_2 vasodilatador.
11. El estrés del RE incrementa los parámetros bioenergéticos, consumo de oxígeno y actividad glucolítica, lo que probablemente representa una respuesta adaptativa que favorecería un mayor consumo de O_2 reduciendo la acumulación de ROS y promoviendo la supervivencia de la célula.

Conclusión final

De los resultados obtenidos podemos concluir que la activación de los canales mitoK_{ATP} acopla el flujo sanguíneo y el metabolismo mediante la vasodilatación dependiente de la vía eNOS/NO y la reducción del consumo de oxígeno en las arterias peneanas, lo que sugiere que dichos canales pueden proteger el tejido eréctil frente el daño isquémico, y se presentan como una posible diana terapéutica para la disfunción eréctil. La mitocondria y el estrés del RE juegan un papel clave en la patogénesis de la disfunción vascular asociada a la obesidad. La obesidad afecta la función relajante de los canales mitoK_{ATP}, reduce la bioenergética mitocondrial y promueve un mecanismo adaptativo como respuesta a la disminución de la relajación endotelial dependiente de NO mediante un incremento de H₂O₂ vasodilatador de origen mitocondrial. La obesidad activa la respuesta de estrés del RE, que conduce inicialmente a un incremento compensador de la respiración mitocondrial y la glucólisis, que contribuye a la disfunción endotelial por el estrés oxidativo dependiente de Nox y disminución de la biodisponibilidad del NO. Los inhibidores del estrés del RE representan una posible alternativa terapéutica en la disfunción eréctil asociada a la obesidad.

VII.BIBLIOGRAFÍA

- Aboseif, S.R., Lue, T.F., 1988. Fundamentals and hemodynamics of penile erection. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 11, 185–190. <https://doi.org/10.1007/BF02577002>
- Achard, C.S., Laybutt, D.R., 2012. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology* 153, 2164–2177. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1881>
- Adler, S., Huang, H., Loke, K.E., Xu, X., Tada, H., Laumas, A., Hintze, T.H., 2001. Endothelial nitric oxide synthase plays an essential role in regulation of renal oxygen consumption by NO. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280, F838–843. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.5.F838>
- Agouni, A., Tual-Chalot, S., Chalopin, M., Duluc, L., Mody, N., Martinez, M.C., Andriantsitohaina, R., Delibegović, M., 2014. Hepatic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) deficiency protects against obesity-induced endothelial dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* 92, 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.10.008>
- Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., 1999. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr. Rev.* 20, 101–135. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.2.0361>
- Ai, L., Rouhanizadeh, M., Wu, J.C., Takabe, W., Yu, H., Alavi, M., Chu, Y., Miller, J., Heistad, D.D., Hsiai, T.K., 2008. Shear Stress Influences Spatial Variations in Vascular Mn-SOD Expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C1576–C1585. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00518.2007>
- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith, S.C., International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, International Association for the Study of Obesity, 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. The Endoplasmic Reticulum, in: *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. Garland Science.
- Alcorn, J.F., Toepfer, J.R., Leipheimer, R.E., 1999. THE EFFECTS OF CASTRATION ON RELAXATION OF RAT CORPUS CAVERNOSUM SMOOTH MUSCLE IN VITRO. *J. Urol.* 161, 686–689. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)61995-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)61995-5)
- Alevriadou, B.R., Patel, A., Noble, M., Ghosh, S., Gohil, V.M., Stathopoulos, P.B., Madesh, M., 2021. Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 320, C465–C482. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00502.2020>
- Alexander, C.M., Landsman, P.B., Teutsch, S.M., Haffner, S.M., Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), National Cholesterol Education

- Program (NCEP), 2003. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 52, 1210–1214. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.5.1210>
- Ali, M.H., Mungai, P.T., Schumacker, P.T., 2006. Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L38-45. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00287.2004>
- Al-Mehdi, A.-B., Pastukh, V.M., Swiger, B.M., Reed, D.J., Patel, M.R., Bardwell, G.C., Pastukh, V.V., Alexeyev, M.F., Gillespie, M.N., 2012. Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Sci. Signal.* 5, ra47. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002712>
- Amin, A., Choi, S., Galan, M., Kassan, M., Partyka, M., Kadowitz, P., Henrion, D., Trebak, M., Belmadani, S., Matrougui, K., 2012. Chronic inhibition of endoplasmic reticulum stress and inflammation prevents ischaemia-induced vascular pathology in type II diabetic mice. *J. Pathol.* 227, 165–174. <https://doi.org/10.1002/path.3960>
- Anderson, E.J., Lustig, M.E., Boyle, K.E., Woodlief, T.L., Kane, D.A., Lin, C.-T., Price, J.W., Kang, L., Rabinovitch, P.S., Szeto, H.H., Houmard, J.A., Cortright, R.N., Wasserman, D.H., Neuffer, P.D., 2009. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 119, 573–581. <https://doi.org/10.1172/JCI37048>
- Andersson, K.E., 2001. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol. Rev.* 53, 417–450.
- Andersson, K.E., Wagner, G., 1995. Physiology of penile erection. *Physiol. Rev.* 75, 191–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.1.191>
- Andreozzi, F., Laratta, E., Procopio, C., Hribal, M.L., Sciacqua, A., Perticone, M., Miele, C., Perticone, F., Sesti, G., 2007. Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2372–2383. <https://doi.org/10.1128/MCB.01340-06>
- Angel, P., Szabowski, A., Schorpp-Kistner, M., 2001. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20, 2413–2423. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204380>
- Angulo, J., Cuevas, P., La Fuente, J.M., Pomerol, J.M., Ruiz-Castañé, E., Puigvert, A., Gabancho, S., Fernández, A., Ney, P., Sáenz De Tejada, I., 2002. Regulation of human penile smooth muscle tone by prostanoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 136, 23–30. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704675>
- Angulo, J., El Assar, M., Sevilleja-Ortiz, A., Fernández, A., Sánchez-Ferrer, A., Romero-Otero, J., Martínez-Salamanca, J.I., La Fuente, J.M., Rodríguez-Mañas, L., 2019. Short-term pharmacological activation of Nrf2 ameliorates vascular dysfunction in aged rats and in pathological human vasculature. A potential target for therapeutic intervention. *Redox Biol.* 26, 101271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101271>
- Angulo, J., González-Corrochano, R., Cuevas, P., Fernández, A., La Fuente, J.M., Rolo, F., Allona, A., Sáenz de Tejada, I., 2010. Diabetes exacerbates the functional

deficiency of NO/cGMP pathway associated with erectile dysfunction in human corpus cavernosum and penile arteries. *J. Sex. Med.* 7, 758–768. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01587.x>

Antunes, F., Boveris, A., Cadenas, E., 2007. On the biologic role of the reaction of NO with oxidized cytochrome c oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1569–1579. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1677>

Araña Rosaínz, M. de J., Ojeda, M.O., Acosta, J.R., Elías-Calles, L.C., González, N.O., Herrera, O.T., García Álvarez, C.T., Rodríguez, E.M., Báez, M.E., Seijas, E.Á., Valdés, R.F., 2011. Imbalanced low-grade inflammation and endothelial activation in patients with type 2 diabetes mellitus and erectile dysfunction. *J. Sex. Med.* 8, 2017–2030. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02277.x>

Araujo, A.B., Hall, S.A., Ganz, P., Chiu, G.R., Rosen, R.C., Kupelian, V., Travison, T.G., McKinlay, J.B., 2010. Does erectile dysfunction contribute to cardiovascular disease risk prediction beyond the Framingham risk score? *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.058>

Armstead, W.M., Mirro, R., Zuckerman, S., Busija, D.W., Leffler, C.W., 1992. The influence of opioids on local cerebral glucose utilization in the newborn pig. *Brain Res.* 571, 97–102. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90513-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90513-9)

Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakgöl, G., Güney, E., Inouye, K., Hotamisligil, G.S., 2014. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med.* 20, 1427–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.3735>

Ashfield, R., Gribble, F.M., Ashcroft, S.J., Ashcroft, F.M., 1999. Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. *Diabetes* 48, 1341–1347. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.6.1341>

Assaly, R., Giuliano, F., Clement, P., Laurin, M., Favier, M., Teo, P., Bernabe, J., Alexandre, L., Behr-Roussel, D., 2019. Extracorporeal Shock Waves Therapy Delivered by Aries Improves Erectile Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats Through Penile Tissue Remodeling and Neovascularization. *Sex. Med.* 7, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.esxm.2019.08.006>

Auchampach, J.A., Gross, G.J., 1993. Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am. J. Physiol.* 264, H1327-1336. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.5.H1327>

Auchampach, J.A., Grover, G.J., Gross, G.J., 1992. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc. Res.* 26, 1054–1062. <https://doi.org/10.1093/cvr/26.11.1054>

Aversa, A., Rossi, F., Francomano, D., Bruzziches, R., Bertone, C., Santemma, V., Spera, G., 2008. Early endothelial dysfunction as a marker of vasculogenic erectile dysfunction in young habitual cannabis users. *Int. J. Impot. Res.* 20, 566–573. <https://doi.org/10.1038/ijir.2008.43>

Ayajiki, K., Toda, N., Okamura, T., 2002. [Nitroxidergic (nitregeric) nerve and erectile dysfunction]. *Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol. Jpn.* 119, 21–28. <https://doi.org/10.1254/fpj.119.21>

- Ayta, I.A., McKinlay, J.B., Krane, R.J., 1999. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int.* 84, 50–56. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1999.00142.x>
- Azadzoi, K.M., Kim, N., Brown, M.L., Goldstein, I., Cohen, R.A., Saenz de Tejada, I., 1992. Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Urol.* 147, 220–225. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)37201-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)37201-4)
- Azadzoi, K.M., Saenz de Tejada, I., 1992. Diabetes mellitus impairs neurogenic and endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J. Urol.* 148, 1587–1591. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)36975-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)36975-6)
- Azadzoi, K.M., Saenz de Tejada, I., 1991. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J. Urol.* 146, 238–240. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)37759-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)37759-5)
- Bacon, C.G., Hu, F.B., Giovannucci, E., Glasser, D.B., Mittleman, M.A., Rimm, E.B., 2002. Association of type and duration of diabetes with erectile dysfunction in a large cohort of men. *Diabetes Care* 25, 1458–1463. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.8.1458>
- Bacon, C.G., Mittleman, M.A., Kawachi, I., Giovannucci, E., Glasser, D.B., Rimm, E.B., 2006. A prospective study of risk factors for erectile dysfunction. *J. Urol.* 176, 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(06\)00589-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(06)00589-1)
- Bagrodia, A., DiBlasio, C.J., Wake, R.W., Derweesh, I.H., 2009. Adverse effects of androgen deprivation therapy in prostate cancer: Current management issues. *Indian J. Urol. IJU J. Urol. Soc. India* 25, 169–176. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.52907>
- Bailey, D., Barreca, C., O'Hare, P., 2007. Trafficking of the bZIP transmembrane transcription factor CREB-H into alternate pathways of ERAD and stress-regulated intramembrane proteolysis. *Traffic Cph. Den.* 8, 1796–1814. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00654.x>
- Bailey, D., O'Hare, P., 2007. Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2305–2321. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1796>
- Bajgar, R., Seetharaman, S., Kowaltowski, A.J., Garlid, K.D., Paucek, P., 2001. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J. Biol. Chem.* 276, 33369–33374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103320200>
- Ballard, S.A., Gingell, C.J., Tang, K., Turner, L.A., Price, M.E., Naylor, A.M., 1998. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J. Urol.* 159, 2164–2171. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)63299-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)63299-3)
- Ballinger, S.W., Patterson, C., Knight-Lozano, C.A., Burow, D.L., Conklin, C.A., Hu, Z., Reuf, J., Horaist, C., Lebovitz, R., Hunter, G.C., McIntyre, K., Runge, M.S., 2002. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 106, 544–549. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000023921.93743.89>

- Baltazares Lipp, M., Rodríguez Crespo, H., Ortega Martínez, J., Sotres-Vega, A., Baltazares Lipp, M.E., 2005. Endothelin system. *Rev. Inst. Nac. Enfermedades Respir.* 18, 308–320.
- Banfi, C., Brioschi, M., Barbieri, S.S., Eligini, S., Barcella, S., Tremoli, E., Colli, S., Mussoni, L., 2009. Mitochondrial reactive oxygen species: a common pathway for PAR1- and PAR2-mediated tissue factor induction in human endothelial cells. *J. Thromb. Haemost. JTH* 7, 206–216. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03204.x>
- Bari, F., Louis, T.M., Busija, D.W., 1997. Calcium-activated K⁺ channels in cerebral arterioles in piglets are resistant to ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 1152–1156. <https://doi.org/10.1097/00004647-199711000-00003>
- Bari, F., Louis, T.M., Meng, W., Busija, D.W., 1996. Global ischemia impairs ATP-sensitive K⁺ channel function in cerebral arterioles in piglets. *Stroke* 27, 1874–1880; discussion 1880-1881. <https://doi.org/10.1161/01.str.27.10.1874>
- Barkin, J., 2011. Erectile dysfunction and hypogonadism (low testosterone). *Can. J. Urol.* 18 Suppl, 2–7.
- Barkin, J., 2010. Erectile dysfunction and low testosterone: cause or an effect? *Can. J. Urol.* 17 Suppl 1, 2–11.
- Basta, G., Lazzerini, G., Del Turco, S., Ratto, G.M., Schmidt, A.M., De Caterina, R., 2005. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1401–1407. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000167522.48370.5e>
- Battson, M.L., Lee, D.M., Gentile, C.L., 2017. Endoplasmic reticulum stress and the development of endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 312, H355–H367. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00437.2016>
- Baudry, N., Laemmel, E., Vicaut, E., 2008. In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H821-828. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00378.2007>
- Baumann, H., Gauldie, J., 1994. The acute phase response. *Immunol. Today* 15, 74–80. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6)
- Becker, A.J., Uckert, S., Stief, C.G., Truss, M.C., Machtens, S., Scheller, F., Knapp, W.H., Hartmann, U., Jonas, U., 2001. Possible role of bradykinin and angiotensinII in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology* 57, 193–198. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00881-5](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00881-5)
- Beckman, J.A., Goldfine, A.B., Gordon, M.B., Creager, M.A., 2001. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 103, 1618–1623. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.12.1618>
- Bednarczyk, P., Dołowy, K., Szewczyk, A., 2005. Matrix Mg²⁺ regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. *FEBS Lett.* 579, 1625–1632. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.077>

- Bellamy, T.C., Wood, J., Goodwin, D.A., Garthwaite, J., 2000. Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2928–2933. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2928>
- Bény, J.L., von der Weid, P.Y., 1991. Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 378–384. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)90935-z](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)90935-z)
- Beyer, A.M., Freed, J.K., Durand, M.J., Riedel, M., Ait-Aissa, K., Green, P., Hockenberry, J.C., Morgan, R.G., Donato, A.J., Peleg, R., Gasparri, M., Rokkas, C.K., Santos, J.H., Priel, E., Gutterman, D.D., 2016. Critical Role for Telomerase in the Mechanism of Flow-Mediated Dilatation in the Human Microcirculation. *Circ. Res.* 118, 856–866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307918>
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 1183–1192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bishara, N.B., Ding, H., 2010. Glucose enhances expression of TRPC1 and calcium entry in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H171–178. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00699.2009>
- Bocchio, M., Desideri, G., Scarpelli, P., Necozone, S., Properzi, G., Spartera, C., Francavilla, F., Ferri, C., Francavilla, S., 2004. ENDOTHELIAL CELL ACTIVATION IN MEN WITH ERECTILE DYSFUNCTION WITHOUT CARDIOVASCULAR RISK FACTORS AND OVERT VASCULAR DAMAGE. *J. Urol.* 171, 1601–1604. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000116325.06572.85>
- Bogardus, C., Lillioja, S., Howard, B.V., Reaven, G., Mott, D., 1984. Relationships between insulin secretion, insulin action, and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 74, 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI111533>
- Böhm, M., Baumhäkel, M., Teo, K., Sleight, P., Probstfield, J., Gao, P., Mann, J.F., Diaz, R., Dagenais, G.R., Jennings, G.L.R., Liu, L., Jansky, P., Yusuf, S., ONTARGET/TRANSCEND Erectile Dysfunction Substudy Investigators, 2010. Erectile dysfunction predicts cardiovascular events in high-risk patients receiving telmisartan, ramipril, or both: The ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial/Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE iNtolerant subjects with cardiovascular Disease (ONTARGET/TRANSCEND) *Trials. Circulation* 121, 1439–1446. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.864199>
- Bola, B., Allan, V., 2009. How and why does the endoplasmic reticulum move? *Biochem. Soc. Trans.* 37, 961–965. <https://doi.org/10.1042/BST0370961>
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A., 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850–853. <https://doi.org/10.1038/368850a0>

- Brand, M.D., Esteves, T.C., 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.002>
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A.E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., Iglewski, M., Chiong, M., Simmen, T., Zorzano, A., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Szabadkai, G., Lavandero, S., 2011. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J. Cell Sci.* 124, 2143–2152. <https://doi.org/10.1242/jcs.080762>
- Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 682–685.
- Bretón-Romero, R., Lamas, S., 2014. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol.* 2, 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.005>
- Broadhead, M.W., Kharbanda, R.K., Peters, M.J., MacAllister, R.J., 2004. KATP channel activation induces ischemic preconditioning of the endothelium in humans in vivo. *Circulation* 110, 2077–2082. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000144304.91010.F0>
- Brock, T.G., McNish, R.W., Peters-Golden, M., 1999. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* 274, 11660–11666. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11660>
- Brown, G.C., Cooper, C.E., 1994. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356, 295–298. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01290-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01290-3)
- Brown, K.A., Didion, S.P., Andresen, J.J., Faraci, F.M., 2007. Effect of aging, MnSOD deficiency, and genetic background on endothelial function: evidence for MnSOD haploinsufficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1941–1946. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.146852>
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820. <https://doi.org/10.1038/414813a>
- Burchardt, M., Burchardt, T., Baer, L., Kiss, A.J., Pawar, R.V., Shabsigh, A., de la Taille, A., Hayek, O.R., Shabsigh, R., 2000. Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *J. Urol.* 164, 1188–1191.
- Burke, T.M., Wolin, M.S., 1987. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am. J. Physiol.* 252, H721–732. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.252.4.H721>
- Burke-Wolin, T., Abate, C.J., Wolin, M.S., Gurtner, G.H., 1991. Hydrogen peroxide-induced pulmonary vasodilation: role of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Am. J. Physiol.* 261, L393–398. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1991.261.6.L393>
- Burnett, A.L., Lowenstein, C.J., Bredt, D.S., Chang, T.S., Snyder, S.H., 1992. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 257, 401–403. <https://doi.org/10.1126/science.1378650>

- Burnett, A.L., Tillman, S.L., Chang, T.S., Epstein, J.I., Lowenstein, C.J., Bredt, D.S., Snyder, S.H., Walsh, P.C., 1993. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J. Urol.* 150, 73–76. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)35401-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)35401-0)
- Busiello, R.A., Savarese, S., Lombardi, A., 2015. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front. Physiol.* 6, 36. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00036>
- Busija, D.W., Gaspar, T., Domoki, F., Katakam, P.V., Bari, F., 2008. Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1471–1477. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.020>
- Busija, D.W., Katakam, P.V., 2014. Mitochondrial mechanisms in cerebral vascular control: shared signaling pathways with preconditioning. *J. Vasc. Res.* 51, 175–189. <https://doi.org/10.1159/000360765>
- Busija, D.W., Leffler, C.W., 1987. Hypothermia reduces cerebral metabolic rate and cerebral blood flow in newborn pigs. *Am. J. Physiol.* 253, H869-873. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.253.4.H869>
- Busija, D.W., Leffler, C.W., Pourcyrous, M., 1988. Hyperthermia increases cerebral metabolic rate and blood flow in neonatal pigs. *Am. J. Physiol.* 255, H343-346. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1988.255.2.H343>
- Busija, D.W., Miller, A.W., Katakam, P., Simandle, S., Erdös, B., 2004. Mechanisms of vascular dysfunction in insulin resistance. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 5, 929–935.
- Busija, D.W., Rutkai, I., Dutta, S., Katakam, P.V., 2016. Role of Mitochondria in Cerebral Vascular Function: Energy Production, Cellular Protection, and Regulation of Vascular Tone. *Compr. Physiol.* 6, 1529–1548. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150051>
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)
- Cai, H., Harrison, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87, 840–844. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.10.840>
- Calamita, G., Ferri, D., Gena, P., Liquori, G.E., Cavalier, A., Thomas, D., Svelto, M., 2005. The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water. *J. Biol. Chem.* 280, 17149–17153. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400595200>
- Cao, S.S., Kaufman, R.J., 2014. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 396–413. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5851>
- Carreira, R.S., Facundo, H.T.F., Kowaltowski, A.J., 2005. Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev.*

Bras. Pesqui. Medicas E Biol. 38, 345–352. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000300004>

- Carreras-Sureda, A., Pihán, P., Hetz, C., 2018. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium* 70, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.004>
- Carson, C.C., Rosano, G., 2012. Exogenous testosterone, cardiovascular events, and cardiovascular risk factors in elderly men: a review of trial data. *J. Sex. Med.* 9, 54–67. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02337.x>
- Carter, A.J., Ballard, S.A., Naylor, A.M., 1998. Effect of the selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile dysfunction in the anesthetized dog. *J. Urol.* 160, 242–246.
- Cassuto, J., Dou, H., Czikora, I., Szabo, A., Patel, V.S., Kamath, V., Belin de Chantemele, E., Feher, A., Romero, M.J., Bagi, Z., 2014. Peroxynitrite disrupts endothelial caveolae leading to eNOS uncoupling and diminished flow-mediated dilation in coronary arterioles of diabetic patients. *Diabetes* 63, 1381–1393. <https://doi.org/10.2337/db13-0577>
- Cellek, S., Foxwell, N.A., Moncada, S., 2003. Two phases of nitroergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52, 2353–2362.
- Cellek, S., Rodrigo, J., Lobos, E., Fernández, P., Serrano, J., Moncada, S., 1999. Selective nitroergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1804–1812. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702981>
- Cerami, A., Vlassara, H., Brownlee, M., 1987. Glucose and aging. *Sci. Am.* 256, 90–96. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0587-90>
- Ceylan-Isik, A.F., Guo, K.K., Carlson, E.C., Privratsky, J.R., Liao, S.-J., Cai, L., Chen, A.F., Ren, J., 2009. Metallothionein abrogates GTP cyclohydrolase I inhibition-induced cardiac contractile and morphological defects: role of mitochondrial biogenesis. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 53, 1023–1031. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123422>
- Chalmers, S., Saunter, C.D., Girkin, J.M., McCarron, J.G., 2015. Flicker-assisted localization microscopy reveals altered mitochondrial architecture in hypertension. *Sci. Rep.* 5, 16875. <https://doi.org/10.1038/srep16875>
- Chamness, S.L., Ricker, D.D., Crone, J.K., Dembeck, C.L., Maguire, M.P., Burnett, A.L., Chang, T.S., 1995. The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. *Fertil. Steril.* 63, 1101–1107.
- Chang, T.-S., Cho, C.-S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W., Rhee, S.G., 2004. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 41975–41984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407707200>
- Chaplin, N.L., Nieves-Cintrón, M., Fresquez, A.M., Navedo, M.F., Amberg, G.C., 2015. Arterial Smooth Muscle Mitochondria Amplify Hydrogen Peroxide Microdomains Functionally Coupled to L-Type Calcium Channels. *Circ. Res.* 117, 1013–1023. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306996>

- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Hellencourt, C., Ramanan, P., 2014. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 213. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00213>
- Cheang, W.S., Tian, X.Y., Wong, W.T., Lau, C.W., Lee, S.S.-T., Chen, Z.Y., Yao, X., Wang, N., Huang, Y., 2014. Metformin protects endothelial function in diet-induced obese mice by inhibition of endoplasmic reticulum stress through 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor δ pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 830–836. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301938>
- Chen, D., Yan, Y., Huang, H., Dong, Q., Tian, H., 2018. The association between subclinical hypothyroidism and erectile dysfunction. *Pak. J. Med. Sci.* 34, 621–625. <https://doi.org/10.12669/pjms.343.14330>
- Chen, K., Kirber, M.T., Xiao, H., Yang, Y., Keaney, J.F., 2008. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J. Cell Biol.* 181, 1129–1139. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709049>
- Chen, K.H., Reece, L.M., Leary, J.F., 1999. Mitochondrial glutathione modulates TNF- α -induced endothelial cell dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 100–109. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00059-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00059-3)
- Cheranov, S.Y., Jaggar, J.H., 2004. Mitochondrial modulation of Ca²⁺ sparks and transient K_{Ca} currents in smooth muscle cells of rat cerebral arteries. *J. Physiol.* 556, 755–771. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059568>
- Chiong, M., Cartes-Saavedra, B., Norambuena-Soto, I., Mondaca-Ruff, D., Morales, P.E., García-Miguel, M., Mellado, R., 2014. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front. Cell Dev. Biol.* 2, 72. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00072>
- Chiurlia, E., D'Amico, R., Ratti, C., Granata, A.R., Romagnoli, R., Modena, M.G., 2005. Subclinical Coronary Artery Atherosclerosis in Patients With Erectile Dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1503–1506. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.068>
- Cho, M.-R., Park, J.-W., Jung, I.-S., Yi, K.-Y., Yoo, S.-E., Chung, H.-J., Yun, Y.-P., Kwon, S.-H., Shin, H.-S., 2005. BMS-191095, a cardioselective mitochondrial K(ATP) opener, inhibits human platelet aggregation by opening mitochondrial K(ATP) channels. *Arch. Pharm. Res.* 28, 61–67. <https://doi.org/10.1007/BF02975137>
- Chong, W.C., Shastri, M.D., Eri, R., 2017. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 771. <https://doi.org/10.3390/ijms18040771>
- Christ, G.J., Maayani, S., Valcic, M., Melman, A., 1990. Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in alpha-adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. *Br. J. Pharmacol.* 101, 375–381.
- Chuang, A.T., Strauss, J.D., Murphy, R.A., Steers, W.D., 1998. Sildenafil, a type-5 CGMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP- dependent relaxation in rabbit corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J. Urol.* 160, 257–261.

- Cimellaro, A., Perticone, M., Fiorentino, T.V., Sciacqua, A., Hribal, M.L., 2016. Role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 26, 863–871. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.05.008>
- Classen, J.B., Mergner, W.J., Costa, M., 1989. ATP hydrolysis by ischemic mitochondria. *J. Cell. Physiol.* 141, 53–59. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041410109>
- Clementi, E., Brown, G.C., Foxwell, N., Moncada, S., 1999. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1559–1562.
- Coetzee, W.A., 2013. Multiplicity of effectors of the cardioprotective agent, diazoxide. *Pharmacol. Ther.* 140, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.007>
- Cohen, R.A., Vanhoutte, P.M., 1995. Endothelium-Dependent Hyperpolarization. *Circulation* 92, 3337–3349. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.11.3337>
- Comerma-Steffensen, S., Prat-Duran, J., Mogensen, S., Fais, R., Pinilla, E., Simonsen, U., 2022. Erectile Dysfunction and Altered Contribution of KCa1.1 and KCa2.3 Channels in the Penile Tissue of Type-2 Diabetic db/db Mice. *J. Sex. Med.* 19, 697–710. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2022.02.021>
- Comiter, C.V., Sullivan, M.P., Yalla, S.V., Kifor, I., 1997. Effect of angiotensin II on corpus cavernosum smooth muscle in relation to nitric oxide environment: in vitro studies in canines. *Int. J. Impot. Res.* 9, 135–140. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3900261>
- Confederat, L., Constantin, S., Lupașcu, F., Pânzariu, A., Hăncianu, M., Profire, L., 2015. HYPOGLYCEMIA INDUCED BY ANTIDIABETIC SULFONYLUREAS. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi* 119, 579–584.
- Contreras, C., Sánchez, A., Martínez, P., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., Hernández, M., Prieto, D., 2013. Impaired endothelin calcium signaling coupled to endothelin type B receptors in penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *J. Sex. Med.* 10, 2141–2153. <https://doi.org/10.1111/jsm.12234>
- Contreras, C., Sánchez, A., Martínez, P., Raposo, R., Climent, B., García-Sacristán, A., Benedito, S., Prieto, D., 2010. Insulin resistance in penile arteries from a rat model of metabolic syndrome. *Br. J. Pharmacol.* 161, 350–364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00825.x>
- Contreras Jiménez, C., 2011. Estudio de la resistencia vascular a la insulina en las arterias coronarias y peneanas durante el “síndrome metabólico.”
- Corona, D.G., Vena, W., Pizzocaro, A., Rastrelli, G., Sparano, C., Sforza, A., Vignozzi, L., Maggi, M., 2023. Metabolic syndrome and erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis study. *J. Endocrinol. Invest.* 46, 2195–2211. <https://doi.org/10.1007/s40618-023-02136-x>
- Corona, G., Rastrelli, G., Monami, M., Guay, A., Buvat, J., Sforza, A., Forti, G., Mannucci, E., Maggi, M., 2011. Hypogonadism as a risk factor for cardiovascular mortality in men: a meta-analytic study. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 687–701. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0447>

- Cortés-Ginez, M. del C., Baiza-Gutman, L.A., Manuel-Apolinar, L., Cruz-López, M., Ibáñez-Hernández, M.Á., Díaz-Flores, M., 2022. Activación de sensores del estrés del retículo endoplásmico por dietas asociadas a enfermedades metabólicas y COVID-19. *Rev Méd Inst Mex Seguro Soc* 211–223.
- Cosentino, F., Katusiá, Z.S., 1995. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 91, 139–144. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.1.139>
- Costa, A.D.T., Jakob, R., Costa, C.L., Andrukhiv, K., West, I.C., Garlid, K.D., 2006. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 281, 20801–20808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600959200>
- Craig, T.J., Ashcroft, F.M., Proks, P., 2008. How ATP Inhibits the Open KATP Channel. *J. Gen. Physiol.* 132, 131–144. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709874>
- Craige, S.M., Kant, S., Reif, M., Chen, K., Pei, Y., Angoff, R., Sugamura, K., Fitzgibbons, T., Keaney, J.F., 2015. Endothelial NADPH oxidase 4 protects ApoE^{-/-} mice from atherosclerotic lesions. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.004>
- Ct, T., S, M., 2010. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.181628>
- Culic, O., Gruwel, M.L., Schrader, J., 1997. Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 273, C205-213. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.1.C205>
- Cullinan, S.B., Diehl, J.A., 2006. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.018>
- Cybulsky, A.V., 2017. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 681–696. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.129>
- da Silva, M.M., Sartori, A., Belisle, E., Kowaltowski, A.J., 2003. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H₂O₂ release, and enhances K⁺ transport. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H154-162. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00955.2002>
- Dagher, Z., Ruderman, N., Tornheim, K., Ido, Y., 2001. Acute regulation of fatty acid oxidation and amp-activated protein kinase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ. Res.* 88, 1276–1282. <https://doi.org/10.1161/hh1201.092998>
- Dahlem, Y.A., Horn, T.F.W., Buntinas, L., Gonoj, T., Wolf, G., Siemen, D., 2004. The human mitochondrial KATP channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch-clamp approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1656, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.01.003>
- Dai, D.-F., Rabinovitch, P.S., Ungvari, Z., 2012. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ. Res.* 110, 1109–1124. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246140>
- Dai, J., Kuo, K.-H., Leo, J.M., van Breemen, C., Lee, C.-H., 2005. Rearrangement of the close contact between the mitochondria and the sarcoplasmic reticulum in airway

smooth muscle. *Cell Calcium* 37, 333–340.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.12.002>

- Daiber, A., 2010. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 897–906. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.032>
- Dail, W.G., Barba, V., Leyba, L., Galindo, R., 1995. Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res.* 282, 109–116. <https://doi.org/10.1007/BF00319137>
- Daley, J.T., Brown, M.L., Watkins, T., Traish, A.M., Huang, Y.H., Moreland, R.B., De Tejada, I.S., 1996. Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum: I. regulation by oxygen tension. *J. Urol.* 155, 1482–1487.
- Davies, P.F., 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* 75, 519–560. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.519>
- De Leonardis, F., Colalillo, G., Finazzi Agrò, E., Miano, R., Fuschi, A., Asimakopoulos, A.D., 2022. Endothelial Dysfunction, Erectile Deficit and Cardiovascular Disease: An Overview of the Pathogenetic Links. *Biomedicines* 10, 1848. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081848>
- de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D., Vane, J.R., 1988. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9797–9800. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9797>
- Dean, R.C., Lue, T.F., 2005. Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* 32, 379–v. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2005.08.007>
- Decuyper, J.-P., Monaco, G., Bultynck, G., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., 2011. The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1003–1013. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.023>
- Della Corte, V., Tuttolomondo, A., Pecoraro, R., Di Raimondo, D., Vassallo, V., Pinto, A., 2016. Inflammation, Endothelial Dysfunction and Arterial Stiffness as Therapeutic Targets in Cardiovascular Medicine. *Curr. Pharm. Des.* 22, 4658–4668. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160510124801>
- Demirel, Y., 2002. Chapter 12 - Thermodynamics and biological systems, in: Demirel, Y. (Ed.), *Nonequilibrium Thermodynamics*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 293–355. <https://doi.org/10.1016/B978-044450886-7/50012-6>
- Derby, C.A., Mohr, B.A., Goldstein, I., Feldman, H.A., Johannes, C.B., McKinlay, J.B., 2000. Modifiable risk factors and erectile dysfunction: can lifestyle changes modify risk? *Urology* 56, 302–306. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00614-2](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00614-2)
- Dhabuwala, C.B., Ramakrishna, C.V., Anderson, G.F., 1985. Beta adrenergic receptors in human cavernous tissue. *J. Urol.* 133, 721–723. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)49169-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)49169-5)

- Dikalov, S.I., Nazarewicz, R.R., 2013. Angiotensin II-Induced Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Potential Mechanisms and Relevance for Cardiovascular Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1085–1094. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4604>
- Dikalov, S.I., Nazarewicz, R.R., Bikineyeva, A., Hilenski, L., Lassègue, B., Griendling, K.K., Harrison, D.G., Dikalova, A.E., 2014. Nox2-Induced Production of Mitochondrial Superoxide in Angiotensin II-Mediated Endothelial Oxidative Stress and Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 281–294. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4918>
- Dikalov, S.I., Ungvari, Z., 2013. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, H1417-1427. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00089.2013>
- Domoki, F., Bari, F., Nagy, K., Busija, D.W., Siklós, L., 2004. Diazoxide prevents mitochondrial swelling and Ca²⁺ accumulation in CA1 pyramidal cells after cerebral ischemia in newborn pigs. *Brain Res.* 1019, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.088>
- Domoki, F., Kis, B., Nagy, K., Farkas, E., Busija, D.W., Bari, F., 2005. Diazoxide preserves hypercapnia-induced arteriolar vasodilation after global cerebral ischemia in piglets. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H368-373. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00887.2004>
- Dong, Y., Fernandes, C., Liu, Y., Wu, Y., Wu, H., Brophy, M.L., Deng, L., Song, K., Wen, A., Wong, S., Yan, D., Towner, R., Chen, H., 2017. Role of endoplasmic reticulum stress signalling in diabetic endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 14, 14–23. <https://doi.org/10.1177/1479164116666762>
- Dong, Y., Zhang, M., Wang, S., Liang, B., Zhao, Z., Liu, C., Wu, M., Choi, H.C., Lyons, T.J., Zou, M.-H., 2010. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes* 59, 1386–1396. <https://doi.org/10.2337/db09-1637>
- Dörschner, H., Brekardin, E., Uhde, I., Schwanstecher, C., Schwanstecher, M., 1999. Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol. Pharmacol.* 55, 1060–1066. <https://doi.org/10.1124/mol.55.6.1060>
- Dos Santos, P., Kowaltowski, A.J., Laclau, M.N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J.-B., Tariosse, L., Garlid, K.D., 2002. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H284-295. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00034.2002>
- Doughan, A.K., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., 2008. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 102, 488–496. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.162800>
- Drash, A., Wolff, F., Langs, H., Blizzard, R.M., 1966. Diazoxide-induced Diabetes Mellitus in a Hypopituitary Dwarf. *Diabetes* 15, 319–322. <https://doi.org/10.2337/diab.15.5.319>

- Duda, M., Konior, A., Klemenska, E., Beręsewicz, A., 2007. Preconditioning protects endothelium by preventing ET-1-induced activation of NADPH oxidase and xanthine oxidase in post-ischemic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.10.014>
- Duncan, E.R., Crossey, P.A., Walker, S., Anilkumar, N., Poston, L., Douglas, G., Ezzat, V.A., Wheatcroft, S.B., Shah, A.M., Kearney, M.I., 2008. Effect of Endothelium-Specific Insulin Resistance on Endothelial Function In Vivo. *Diabetes* 57, 3307–3314. <https://doi.org/10.2337/db07-1111>
- Dutta, S., Rutkai, I., Katakam, P.V.G., Busija, D.W., 2015. The mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway and S6 Kinase mediate diazoxide preconditioning in primary rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 134, 845–856. <https://doi.org/10.1111/jnc.13181>
- Duval, C., Nègre-Salvayre, A., Dogilo, A., Salvayre, R., Pénicaud, L., Casteilla, L., 2002. Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 80, 757–764. <https://doi.org/10.1139/o02-158>
- Dynnik, V.V., Grishina, E.V., Fedotcheva, N.I., 2020. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore. *FEBS J.* 287, 1525–1536. <https://doi.org/10.1111/febs.15090>
- Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., 2005. The metabolic syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 365, 1415–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66378-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66378-7)
- Edward, J.A., Pankey, E.A., Jupiter, R.C., Lasker, G.F., Yoo, D., Reddy, V.G., Peak, T.C., Chong, I., Jones, M.R., Feintech, S.V., Lindsey, S.H., Kadowitz, P.J., 2015. Analysis of erectile responses to bradykinin in the anesthetized rat. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 309, H499–H511. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00765.2014>
- Edwards, J.M., McCarthy, C.G., Wenceslau, C.F., 2020. The Obligatory Role of the Acetylcholine-Induced Endothelium-Dependent Contraction in Hypertension: Can Arachidonic Acid Resolve this Inflammation? *Curr. Pharm. Des.* 26, 3723–3732. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200417150121>
- Erdős, B., Simandle, S.A., Snipes, J.A., Miller, A.W., Busija, D.W., 2004a. Potassium channel dysfunction in cerebral arteries of insulin-resistant rats is mediated by reactive oxygen species. *Stroke* 35, 964–969. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000119753.05670.F1>
- Erdős, B., Snipes, J.A., Miller, A.W., Busija, D.W., 2004b. Cerebrovascular dysfunction in Zucker obese rats is mediated by oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes* 53, 1352–1359. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1352>
- Erdős, B., Snipes, J.A., Tulbert, C.D., Katakam, P., Miller, A.W., Busija, D.W., 2006. Rosuvastatin improves cerebrovascular function in Zucker obese rats by inhibiting NAD(P)H oxidase-dependent superoxide production. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1264–1270. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00804.2005>

- Ergul, A., 2011. Endothelin-1 and Diabetic Complications: Focus on the Vasculature. *Pharmacol. Res.* 63, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.01.012>
- Erusalimsky, J.D., Moncada, S., 2007. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2524–2531. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151167>
- Esposito, K., Giugliano, D., 2005. Obesity, the metabolic syndrome, and sexual dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 17, 391–398. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901333>
- Everaert, K., de Waard, W.I.Q., Van Hoof, T., Kiekens, C., Mulliez, T., D'herde, C., 2010. Neuroanatomy and neurophysiology related to sexual dysfunction in male neurogenic patients with lesions to the spinal cord or peripheral nerves. *Spinal Cord* 48, 182–191. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.172>
- Facundo, H.T.F., de Paula, J.G., Kowaltowski, A.J., 2007. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1039–1048. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.001>
- Facundo, H.T.F., de Paula, J.G., Kowaltowski, A.J., 2005. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 75–82. <https://doi.org/10.1007/s10863-005-4130-1>
- Facundo, H.T.F., Fornazari, M., Kowaltowski, A.J., 2006. Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.06.003>
- Fan, S.F., Brink, P.R., Melman, A., Christ, G.J., 1995. An analysis of the Maxi-K⁺ (KCa) channel in cultured human corporal smooth muscle cells. *J. Urol.* 153, 818–825.
- Feldman, H.A., Goldstein, I., Hatzichristou, D.G., Krane, R.J., McKinlay, J.B., 1994. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J. Urol.* 151, 54–61. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)34871-1](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)34871-1)
- Ferranti, R., da Silva, M.M., Kowaltowski, A.J., 2003. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett.* 536, 51–55. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00007-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00007-3)
- Figuroa, X.F., Duling, B.R., 2009. Gap Junctions in the Control of Vascular Function. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 251–266. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2117>
- Fink, B.D., Reszka, K.J., Herlein, J.A., Mathahs, M.M., Sivitz, W.I., 2005. Respiratory uncoupling by UCP1 and UCP2 and superoxide generation in endothelial cell mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E71–79. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00332.2004>
- Finkle, A.L., Taylor, S.P., 1981. Sexual potency after radical prostatectomy. *J. Urol.* 125, 350–352. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)55034-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)55034-x)
- Fiorentino, T.V., Prioletta, A., Zuo, P., Folli, F., 2013. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr. Pharm. Des.* 19, 5695–5703. <https://doi.org/10.2174/1381612811319320005>

- Fonseca, V., Jawa, A., 2005. Endothelial and erectile dysfunction, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome: common pathways and treatments? *Am. J. Cardiol.* 96, 13M-18M. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.07.005>
- Förstermann, U., Neufang, B., 1985. Endothelium-dependent vasodilation by melittin: are lipoxygenase products involved? *Am. J. Physiol.* 249, H14-19. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1985.249.1.H14>
- Fosset, M., De Weille, J.R., Green, R.D., Schmid-Antomarchi, H., Lazdunski, M., 1988. Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 263, 7933–7936.
- Foster, D.B., Ho, A.S., Rucker, J., Garlid, A.O., Chen, L., Sidor, A., Garlid, K.D., O'Rourke, B., 2012. Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK(ATP). *Circ. Res.* 111, 446–454. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.266445>
- Fraga-Silva, R.A., Montecucco, F., Mach, F., Santos, R.A.S., Stergiopoulos, N., 2013. Pathophysiological role of the renin-angiotensin system on erectile dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 978–985. <https://doi.org/10.1111/eci.12117>
- Freed, J.K., Beyer, A.M., LoGiudice, J.A., Hockenberry, J.C., Gutterman, D.D., 2014. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. *Circ. Res.* 115, 525–532. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303881>
- Freed, J.K., Gutterman, D.D., 2013. Mitochondrial reactive oxygen species and vascular function: less is more. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 673–675. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.13.301039>
- Fukai, T., 2009. Mitochondrial Thioredoxin: Novel Regulator for NADPH oxidase and Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension* 54, 224–225. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134403>
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2020. Cross-Talk between NADPH Oxidase and Mitochondria: Role in ROS Signaling and Angiogenesis. *Cells* 9, 1849. <https://doi.org/10.3390/cells9081849>
- Furmanik, M., van Gorp, R., Whitehead, M., Ahmad, S., Bordoloi, J., Kapustin, A., Schurgers, L.J., Shanahan, C.M., 2021. Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Calcification via Increased Release of Grp78 (Glucose-Regulated Protein, 78 kDa)-Loaded Extracellular Vesicles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 41, 898–914. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315506>
- Gabrielson, A.T., Sartor, R.A., Hellstrom, W.J.G., 2019. The Impact of Thyroid Disease on Sexual Dysfunction in Men and Women. *Sex. Med. Rev.* 7, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2018.05.002>
- Galán, M., Kassin, M., Choi, S.-K., Partyka, M., Trebak, M., Henrion, D., Matrougui, K., 2012. A novel role for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and its downstream endoplasmic reticulum stress in cardiac damage and microvascular dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 60, 71–80. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.192500>

- Galán, M., Kassan, M., Kadowitz, P.J., Trebak, M., Belmadani, S., Matrougui, K., 2014. Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1063–1075. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.009>
- Gandaglia, G., Briganti, A., Jackson, G., Kloner, R.A., Montorsi, F., Montorsi, P., Vlachopoulos, C., 2014. A systematic review of the association between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Eur. Urol.* 65, 968–978. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.023>
- Garban, H., Marquez, D., Cai, L., Rajfer, J., Gonzalez-Cadavid, N.F., 1995. Restoration of normal adult penile erectile response in aged rats by long-term treatment with androgens. *Biol. Reprod.* 53, 1365–1372. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1365>
- García-Cruz, E., Leibar-Tamayo, A., Romero, J., Piqueras, M., Luque, P., Cardeñosa, O., Alcaraz, A., 2013. Metabolic syndrome in men with low testosterone levels: relationship with cardiovascular risk factors and comorbidities and with erectile dysfunction. *J. Sex. Med.* 10, 2529–2538. <https://doi.org/10.1111/jsm.12265>
- Gargalovic, P.S., Gharavi, N.M., Clark, M.J., Pagnon, J., Yang, W.-P., He, A., Truong, A., Baruch-Oren, T., Berliner, J.A., Kirchgessner, T.G., Lusic, A.J., 2006a. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2490–2496. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000242903.41158.a1>
- Gargalovic, P.S., Imura, M., Zhang, B., Gharavi, N.M., Clark, M.J., Pagnon, J., Yang, W.-P., He, A., Truong, A., Patel, S., Nelson, S.F., Horvath, S., Berliner, J.A., Kirchgessner, T.G., Lusic, A.J., 2006b. Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605457103>
- Garlid, K.D., Paucek, P., 2001. The mitochondrial potassium cycle. *IUBMB Life* 52, 153–158. <https://doi.org/10.1080/15216540152845948>
- Garlid, K.D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H.N., Darbenzio, R.B., D'Alonzo, A.J., Lodge, N.J., Smith, M.A., Grover, G.J., 1997. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 81, 1072–1082. <https://doi.org/10.1161/01.res.81.6.1072>
- Garlid, K.D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., Schindler, P.A., 1996. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J. Biol. Chem.* 271, 8796–8799. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.15.8796>
- Gáspár, T., Domoki, F., Lenti, L., Katakam, P.V.G., Snipes, J.A., Bari, F., Busija, D.W., 2009. Immediate neuronal preconditioning by NS1619. *Brain Res.* 1285, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.008>
- Gáspár, T., Katakam, P., Snipes, J.A., Kis, B., Domoki, F., Bari, F., Busija, D.W., 2008a. Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels. *J. Neurochem.* 105, 1115–1128. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05210.x>

- Gáspár, T., Kis, B., Snipes, J.A., Lenzsér, G., Mayanagi, K., Bari, F., Busija, D.W., 2006. Transient glucose and amino acid deprivation induces delayed preconditioning in cultured rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 98, 555–565. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03899.x>
- Gáspár, T., Snipes, J.A., Busija, A.R., Kis, B., Domoki, F., Bari, F., Busija, D.W., 2008b. ROS-independent preconditioning in neurons via activation of mitoK(ATP) channels by BMS-191095. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1090–1103. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600611>
- Gazzaruso, C., Giordanetti, S., De Amici, E., Bertone, G., Falcone, C., Geroldi, D., Fratino, P., Solerte, S.B., Garzaniti, A., 2004. Relationship between erectile dysfunction and silent myocardial ischemia in apparently uncomplicated type 2 diabetic patients. *Circulation* 110, 22–26. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000133278.81226.C9>
- Gazzaruso, C., Solerte, S.B., Pujia, A., Coppola, A., Vezzoli, M., Salvucci, F., Valenti, C., Giustina, A., Garzaniti, A., 2008. Erectile dysfunction as a predictor of cardiovascular events and death in diabetic patients with angiographically proven asymptomatic coronary artery disease: a potential protective role for statins and 5-phosphodiesterase inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 2040–2044. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.10.069>
- Ghemrawi, R., Battaglia-Hsu, S.-F., Arnold, C., 2018. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. *Cells* 7, 63. <https://doi.org/10.3390/cells7060063>
- Gidday, J.M., 2006. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 437–448. <https://doi.org/10.1038/nrn1927>
- Gioscia-Ryan, R.A., LaRocca, T.J., Sindler, A.L., Zigler, M.C., Murphy, M.P., Seals, D.R., 2014. Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice. *J. Physiol.* 592, 2549–2561. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268680>
- Girona, J., Rodríguez-Borjabad, C., Ibarretxe, D., Vallvé, J.-C., Ferré, R., Heras, M., Rodríguez-Calvo, R., Guaita-Esteruelas, S., Martínez-Micaelo, N., Plana, N., Masana, L., 2019. The Circulating GRP78/BiP Is a Marker of Metabolic Diseases and Atherosclerosis: Bringing Endoplasmic Reticulum Stress into the Clinical Scenario. *J. Clin. Med.* 8, 1793. <https://doi.org/10.3390/jcm8111793>
- Gogvadze, V., Schweizer, M., Richter, C., 1996. Control of the pyridine nucleotide-linked Ca²⁺ release from mitochondria by respiratory substrates. *Cell Calcium* 19, 521–526. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(96\)90061-5](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(96)90061-5)
- Goldstein, I., Feldman, M.I., Deckers, P.J., Babayan, R.K., Krane, R.J., 1984. Radiation-associated impotence. A clinical study of its mechanism. *JAMA* 251, 903–910. <https://doi.org/10.1001/jama.251.7.903>
- Goldstein, I., Lue, T.F., Padma-Nathan, H., Rosen, R.C., Steers, W.D., Wicker, P.A., 1998. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. *N. Engl. J. Med.* 338, 1397–1404. <https://doi.org/10.1056/NEJM199805143382001>
- Golob, M.J., Tian, L., Wang, Z., Zimmerman, T.A., Caneba, C.A., Hacker, T.A., Song, G., Chesler, N.C., 2015. Mitochondria DNA mutations cause sex-dependent

- development of hypertension and alterations in cardiovascular function. *J. Biomech.* 48, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.12.044>
- Good, A.L., Stoffers, D.A., 2020. Stress-Induced Translational Regulation Mediated by RNA Binding Proteins: Key Links to β -Cell Failure in Diabetes. *Diabetes* 69, 499–507. <https://doi.org/10.2337/dbi18-0068>
- Gorgel, S.N., Gorgel, A., Sefik, E., 2014. Sexual Function in Male Patients with Metabolic Syndrome and Effective Parameters on Erectile Dysfunction. *Int. Braz. J. Urol.* 40, 56–61. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.01.08>
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O., 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 6, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
- Görlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T., 2006. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1391–1418. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1391>
- Granchi, S., Vannelli, G.B., Vignozzi, L., Crescioli, C., Ferruzzi, P., Mancina, R., Vinci, M.C., Forti, G., Filippi, S., Luconi, M., Ledda, F., Maggi, M., 2002. Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 1053–1064. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.12.1053>
- Gratzke, C., Angulo, J., Chitale, K., Dai, Y., Kim, N.N., Paick, J.-S., Simonsen, U., Ückert, S., Wespes, E., Andersson, K.E., Lue, T.F., Stief, C.G., 2010. Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *J. Sex. Med.* 7, 445–475. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01624.x>
- Gray, S.P., Di Marco, E., Kennedy, K., Chew, P., Okabe, J., El-Osta, A., Calkin, A.C., Biessen, E.A.L., Touyz, R.M., Cooper, M.E., Schmidt, H.H.H.W., Jandeleit-Dahm, K.A.M., 2016. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 295–307. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.307012>
- Greco, A.J., Master, R.G., Fokin, A., Baber, S.R., Kadowitz, P.J., 2006. Angiotensin-(1-7) potentiates responses to bradykinin but does not change responses to angiotensin I. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 1163–1175. <https://doi.org/10.1139/y06-053>
- Griendling, K.K., Touyz, R.M., Zweier, J.L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y.-R., Harrison, D.G., Bhatnagar, A., American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, 2016. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ. Res.* 119, e39-75. <https://doi.org/10.1161/RES.000000000000110>
- Grover, G.J., Burkett, D.E., Parham, C.S., Scalese, R.J., Sadanaga, K.K., 2003. Protective effect of mitochondrial KATP activation in an isolated gracilis model of ischemia and reperfusion in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42, 790–792. <https://doi.org/10.1097/00005344-200312000-00014>

- Grover, G.J., D'Alonzo, A.J., Garlid, K.D., Bajgar, R., Lodge, N.J., Sleph, P.G., Darbenzio, R.B., Hess, T.A., Smith, M.A., Paucek, P., Atwal, K.S., 2001. Pharmacologic characterization of BMS-191095, a mitochondrial K(ATP) opener with no peripheral vasodilator or cardiac action potential shortening activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 1184–1192.
- Grundy, S.M., 2002. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation* 105, 2696–2698. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000020650.86137.84>
- Guarini, G., Kiyooka, T., Ohyanan, V., Pung, Y.F., Marzilli, M., Chen, Y.R., Chen, C.L., Kang, P.T., Hardwick, J.P., Kolz, C.L., Yin, L., Wilson, G.L., Shokolenko, I., Dobson, J.G., Fenton, R., Chilian, W.M., 2016. Impaired coronary metabolic dilation in the metabolic syndrome is linked to mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA damage. *Basic Res. Cardiol.* 111, 29. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0547-4>
- Guengerich, F.P., 1991. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* 266, 10019–10022.
- Guiliano, F., Rampin, O., Benoit, G., Jardin, A., 1997. [The peripheral pharmacology of erection]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* 7, 24–33.
- Guo, S., Zhao, D., Zang, Z., Shao, D., Zhang, K., Fu, Q., 2023. Effects of endoplasmic reticulum stress on erectile function in rats with cavernous nerve injury. *Sex. Med.* 11, qfad050. <https://doi.org/10.1093/sexmed/qfad050>
- Gupta, A., Becker, T., 2021. Mechanisms and pathways of mitochondrial outer membrane protein biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1862, 148323. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148323>
- Ha, J., Xu, Y., Kawano, T., Hendon, T., Baki, L., Garai, S., Papapetropoulos, A., Thakur, G.A., Plant, L.D., Logothetis, D.E., 2018. Hydrogen sulfide inhibits Kir2 and Kir3 channels by decreasing sensitivity to the phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). *J. Biol. Chem.* 293, 3546–3561. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001679>
- Hajam, Y.A., Rani, R., Ganie, S.Y., Sheikh, T.A., Javaid, D., Qadri, S.S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M.F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., Reshi, M.S., 2022. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells* 11, 552. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., Quast, U., 2002. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 136, 995–1004. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704801>
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., Cadenas, E., 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 278, 5557–5563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210269200>
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353, 411–416.

- Han, J., Kaufman, R.J., 2016. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* 57, 1329–1338. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067595>
- Han, Z., Chen, Y.-R., Jones, C.I., Meenakshisundaram, G., Zweier, J.L., Alevriadou, B.R., 2007. Shear-induced reactive nitrogen species inhibit mitochondrial respiratory complex activities in cultured vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C1103-1112. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2006>
- Hanley, P.J., Gopalan, K.V., Lareau, R.A., Srivastava, D.K., von Martin Meltzer, Daut, J., 2003. β -Oxidation of 5-hydroxydecanoate, a Putative Blocker of Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels. *J. Physiol.* 547, 387–393. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.037044>
- Hardwick, J.P., Eckman, K., Lee, Y.K., Abdelmegeed, M.A., Esterle, A., Chilian, W.M., Chiang, J.Y., Song, B.-J., 2013. Chapter Five - Eicosanoids in Metabolic Syndrome, in: Webb, D.R. (Ed.), *Advances in Pharmacology, Immunopharmacology.* Academic Press, pp. 157–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404717-4.00005-6>
- Harris, A.K., Hutchinson, J.R., Sachidanandam, K., Johnson, M.H., Dorrance, A.M., Stepp, D.W., Fagan, S.C., Ergul, A., 2005. Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. *Diabetes* 54, 2638–2644. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.9.2638>
- Harrison, D.G., Gongora, M.C., 2009. Oxidative stress and hypertension. *Med. Clin. North Am.* 93, 621–635. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2009.02.015>
- Hassler, J., Cao, S.S., Kaufman, R.J., 2012. IRE1, a double-edged sword in pre-miRNA slicing and cell death. *Dev. Cell* 23, 921–923. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.025>
- Hayashi, K., Takamizawa, K., Nakamura, T., Kato, T., Tsushima, N., 1987. Effects of elastase on the stiffness and elastic properties of arterial walls in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 66, 259–267. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(87\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0021-9150(87)90069-4)
- Haynes, C.M., Titus, E.A., Cooper, A.A., 2004. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell* 15, 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.025>
- Heinzel, B., John, M., Klatt, P., Böhme, E., Mayer, B., 1992. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 281, 627–630.
- Helmke, B.P., Davies, P.F., 2002. The Cytoskeleton Under External Fluid Mechanical Forces: Hemodynamic Forces Acting on the Endothelium. *Ann. Biomed. Eng.* 30, 284–296. <https://doi.org/10.1114/1.1467926>
- Henrion, D., Dechaux, E., Dowell, F.J., Maclour, J., Samuel, J.L., Lévy, B.I., Michel, J.B., 1997. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br. J. Pharmacol.* 121, 83–90. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701109>

- Hernanz, R., Briones, A.M., Alonso, M.J., Vila, E., Salaices, M., 2004. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H225-234. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00548.2003>
- Herrmann, H.C., Chang, G., Klugherz, B.D., Mahoney, P.D., 2000. Hemodynamic effects of sildenafil in men with severe coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 1622–1626. <https://doi.org/10.1056/NEJM200006013422201>
- Hetz, C., Papa, F.R., 2018. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* 69, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>
- Hoch, N.E., Guzik, T.J., Chen, W., Deans, T., Maalouf, S.A., Gratzke, P., Weyand, C., Harrison, D.G., 2009. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R208-216. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90521.2008>
- Holmquist, F., Kirkeby, H.J., Larsson, B., Forman, A., Alm, P., Andersson, K.E., 1992. Functional effects, binding sites and immunolocalization of endothelin-1 in isolated penile tissues from man and rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 795–802.
- Hom, J., Sheu, S.-S., 2009. Morphological Dynamics of Mitochondria – A Special Emphasis on Cardiac Muscle Cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.023>
- Homme, R.P., Singh, M., Majumder, A., George, A.K., Nair, K., Sandhu, H.S., Tyagi, N., Lominadze, D., Tyagi, S.C., 2018. Remodeling of Retinal Architecture in Diabetic Retinopathy: Disruption of Ocular Physiology and Visual Functions by Inflammatory Gene Products and Pyroptosis. *Front. Physiol.* 9, 1268. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01268>
- Hong, Q., Qi, K., Feng, Z., Huang, Z., Cui, S., Wang, L., Fu, B., Ding, R., Yang, J., Chen, X., Wu, D., 2012. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction via mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated mitochondrial calcium overload. *Cell Calcium* 51, 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.01.003>
- Hotamisligil, G.S., 2010a. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140, 900–917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.034>
- Hotamisligil, G.S., 2010b. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat. Med.* 16, 396–399. <https://doi.org/10.1038/nm0410-396>
- Houstis, N., Rosen, E.D., Lander, E.S., 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944–948. <https://doi.org/10.1038/nature04634>
- Hurt, K.J., Musicki, B., Palese, M.A., Crone, J.K., Becker, R.E., Moriarity, J.L., Snyder, S.H., Burnett, A.L., 2002. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4061–4066. <https://doi.org/10.1073/pnas.052712499>
- Hutcheon, D.E., Barthalmus, K.S., 1962. Antihypertensive Action Of Diazoxide: A New Benzothiadiazine With Antidiuretic Properties. *Br. Med. J.* 2, 159–161.

- Iacono, F., Barra, S., de Rosa, G., Boscaino, A., Lotti, T., 1994. Microstructural disorders of tunica albuginea in patients affected by impotence. *Eur. Urol.* 26, 233–239. <https://doi.org/10.1159/000475386>
- Ichikawa, H., Kokura, S., Aw, T.Y., 2004. Role of endothelial mitochondria in oxidant production and modulation of neutrophil adherence. *J. Vasc. Res.* 41, 432–444. <https://doi.org/10.1159/000081466>
- Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 145–169. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01197-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01197-8)
- Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K., Higuti, T., 1991. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352, 244–247. <https://doi.org/10.1038/352244a0>
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., Glimcher, L.H., 2003. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat. Immunol.* 4, 321–329. <https://doi.org/10.1038/ni907>
- Iwamoto, Y., Song, K., Takai, S., Yamada, M., Jin, D., Sakaguchi, M., Ueda, H., Katsuoka, Y., Miyazaki, M., 2001. Multiple pathways of angiotensin I conversion and their functional role in the canine penile corpus cavernosum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 43–48.
- Jackson, G., 1999. Erectile Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Int. J. Clin. Pract.* 53, 363–368. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.1999.tb11747.x>
- Jackson, G., Boon, N., Eardley, I., Kirby, M., Dean, J., Hackett, G., Montorsi, P., Montorsi, F., Vlachopoulos, C., Kloner, R., Sharlip, I., Miner, M., 2010. Erectile dysfunction and coronary artery disease prediction: evidence-based guidance and consensus. *Int. J. Clin. Pract.* 64, 848–857. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02410.x>
- Jheng, H.-F., Tsai, P.-J., Guo, S.-M., Kuo, L.-H., Chang, C.-S., Su, I.-J., Chang, C.-R., Tsai, Y.-S., 2012. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 32, 309–319. <https://doi.org/10.1128/MCB.05603-11>
- Jiang, K., Wang, J., Zhao, C., Feng, M., Shen, Z., Yu, Z., Xia, Z., 2011. Regulation of gap junctional communication by astrocytic mitochondrial K(ATP) channels following neurotoxin administration in in vitro and in vivo models. *Neurosignals* 19, 63–74. <https://doi.org/10.1159/000323575>
- Joannides, R., Haefeli, W.E., Linder, L., Richard, V., Bakkali, E.H., Thuillez, C., Lüscher, T.F., 1995. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91, 1314–1319. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.5.1314>
- Johannes, C.B., Araujo, A.B., Feldman, H.A., Derby, C.A., Kleinman, K.P., McKinlay, J.B., 2000. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J. Urol.* 163, 460–463.

- Johnson, B.F., 1971. Diazoxide and renal function in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 12, 815–824. <https://doi.org/10.1002/cpt1971125815>
- Kadlec, A.O., Beyer, A.M., Ait-Aissa, K., Gutterman, D.D., 2016. Mitochondrial signaling in the vascular endothelium: beyond reactive oxygen species. *Basic Res. Cardiol.* 111, 26. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0546-5>
- Kadlec, A.O., Chabowski, D.S., Ait-Aissa, K., Hockenberry, J.C., Otterson, M.F., Durand, M.J., Freed, J.K., Beyer, A.M., Gutterman, D.D., 2017. PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1- α) Overexpression in Coronary Artery Disease Recruits NO and Hydrogen Peroxide During Flow-Mediated Dilation and Protects Against Increased Intraluminal Pressure. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 70, 166–173. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09289>
- Kalogeris, T., Bao, Y., Korthuis, R.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
- Kanaide, H., Ichiki, T., Nishimura, J., Hirano, K., 2003. Cellular mechanism of vasoconstriction induced by angiotensin II: it remains to be determined. *Circ. Res.* 93, 1015–1017. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000105920.33926.60>
- Kaplon, R.E., Chung, E., Reese, L., Cox-York, K., Seals, D.R., Gentile, C.L., 2013. Activation of the unfolded protein response in vascular endothelial cells of nondiabetic obese adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1505-1509. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1841>
- Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Lai, S.L., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, G.K., Miller, T.L., Chan, Y., Atkins, J., Wang, Y., Marsden, P.A., 1999. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J. Biol. Chem.* 274, 3076–3093. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.3076>
- Kars, M., Yang, L., Gregor, M.F., Mohammed, B.S., Pietka, T.A., Finck, B.N., Patterson, B.W., Horton, J.D., Mittendorfer, B., Hotamisligil, G.S., Klein, S., 2010. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* 59, 1899–1905. <https://doi.org/10.2337/db10-0308>
- Kassan, M., Galán, M., Partyka, M., Saifudeen, Z., Henrion, D., Trebak, M., Matrougui, K., 2012. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1652–1661. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.249318>
- Katakam, P.V.G., Domoki, F., Snipes, J.A., Busija, A.R., Jarajapu, Y.P.R., Busija, D.W., 2009. Impaired mitochondria-dependent vasodilation in cerebral arteries of Zucker obese rats with insulin resistance. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R289–R298. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90656.2008>
- Katakam, P.V.G., Dutta, S., Sure, V.N., Grovenburg, S.M., Gordon, A.O., Peterson, N.R., Rutkai, I., Busija, D.W., 2016. Depolarization of mitochondria in neurons promotes activation of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310, H1097-1106. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00759.2015>

- Katakam, P.V.G., Gordon, A.O., Sure, V.N.L.R., Rutkai, I., Busija, D.W., 2014. Diversity of mitochondria-dependent dilator mechanisms in vascular smooth muscle of cerebral arteries from normal and insulin-resistant rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307, H493-503. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00091.2014>
- Katakam, P.V.G., Jordan, J.E., Snipes, J.A., Tulbert, C.D., Miller, A.W., Busija, D.W., 2007. Myocardial preconditioning against ischemia-reperfusion injury is abolished in Zucker obese rats with insulin resistance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R920-926. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00520.2006>
- Katakam, P.V.G., Wappler, E.A., Katz, P.S., Rutkai, I., Institoris, A., Domoki, F., Gáspár, T., Grovenburg, S.M., Snipes, J.A., Busija, D.W., 2013. Depolarization of mitochondria in endothelial cells promotes cerebral artery vasodilation by activation of nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 752–759. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300560>
- Kawano, T., Zoga, V., Kimura, M., Liang, M.-Y., Wu, H.-E., Gemes, G., McCallum, J.B., Kwok, W.-M., Hogan, Q.H., Sarantopoulos, C.D., 2009. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol. Pain* 5, 12. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-12>
- Keating, S.T., El-Osta, A., 2012. Chromatin modifications associated with diabetes. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 5, 399–412. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9380-9>
- Keegan, K.A., Penson, D.F., 2013. Chapter 28 - Vasculogenic Erectile Dysfunction, in: Creager, M.A., Beckman, J.A., Loscalzo, J. (Eds.), *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease (Second Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 341–348. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2930-6.00028-8>
- Kelly-Cobbs, A.I., Harris, A.K., Elgebaly, M.M., Li, W., Sachidanandam, K., Portik-Dobos, V., Johnson, M., Ergul, A., 2011. Endothelial endothelin B receptor-mediated prevention of cerebrovascular remodeling is attenuated in diabetes because of up-regulation of smooth muscle endothelin receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337, 9–15. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.175380>
- Khan, M.I., Pichna, B.A., Shi, Y., Bowes, A.J., Werstuck, G.H., 2009a. Evidence Supporting a Role for Endoplasmic Reticulum Stress in the Development of Atherosclerosis in a Hyperglycaemic Mouse Model. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2289–2298. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2569>
- Khan, M.I., Pichna, B.A., Shi, Y., Bowes, A.J., Werstuck, G.H., 2009b. Evidence supporting a role for endoplasmic reticulum stress in the development of atherosclerosis in a hyperglycaemic mouse model. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2289–2298. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2569>
- Khaw, K.-T., Dowsett, M., Folkard, E., Bingham, S., Wareham, N., Luben, R., Welch, A., Day, N., 2007. Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular disease, and cancer in men: European prospective investigation into cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) Prospective Population Study. *Circulation* 116, 2694–2701. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.719005>
- Kifor, I., Williams, G.H., Vickers, M.A., Sullivan, M.P., Jodbert, P., Dluhy, R.G., 1997. Tissue Angiotensin II as a Modulator of Erectile Function. I. Angiotensin Peptide

Content, Secretion and Effects in the Corpus Cavernosum. *J. Urol.* 157, 1920–1925. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)64901-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)64901-2)

- Kihara, Y., Grossman, W., Morgan, J.P., 1989. Direct measurement of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ. Res.* 65, 1029–1044. <https://doi.org/10.1161/01.res.65.4.1029>
- Kim, B.-J., Ryu, S.-W., Song, B.-J., 2006. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 21256–21265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510644200>
- Kim, J., Jang, H.-J., Hwang, D.H., 2015. Toll-like receptor 4-induced endoplasmic reticulum stress contributes to impairment of vasodilator action of insulin. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 309, E767–E776. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00369.2015>
- Kim, N., Azadzoi, K.M., Goldstein, I., Tejada, I.S. de, 1991. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. [WWW Document]. <https://doi.org/10.1172/JCI115266>
- Kim, S.C., Oh, M.M., 1992. Norepinephrine involvement in response to intracorporeal injection of papaverine in psychogenic impotence. *J. Urol.* 147, 1530–1532. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)37617-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)37617-6)
- Kimoto, Y., Kessler, R., Constantinou, C.E., 1990. Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *J. Urol.* 144, 1015–1017. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)39649-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)39649-0)
- Kirby, M., Jackson, G., Betteridge, J., Friedli, K., 2001. Is Erectile Dysfunction a Marker for Cardiovascular Disease? *Int. J. Clin. Pract.* 55, 614–618. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2001.tb11141.x>
- Kirby, M., Jackson, G., Simonsen, U., 2005. Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease. *Int. J. Clin. Pract.* 59, 225–229. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2005.00453.x>
- Kirby, R.S., 1994. Impotence: diagnosis and management of male erectile dysfunction. *BMJ* 308, 957–961.
- Kirino, T., 2002. Ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 1283–1296. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000040942.89393.88>
- Kirkeby, H.J., Lundbeck, P.E., Djurhuus, J.C., Forman, A., 1992. Effects of vasoactive intestinal peptide, peptide histidine methionine, and neuropeptide y on intracavernous pressure in the rabbit. *Urology* 40, 270–276. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(92\)90491-E](https://doi.org/10.1016/0090-4295(92)90491-E)
- Kirkman, D.L., Muth, B.J., Ramick, M.G., Townsend, R.R., Edwards, D.G., 2018. Role of mitochondria-derived reactive oxygen species in microvascular dysfunction in chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 314, F423–F429. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00321.2017>

- Kirkman, D.L., Robinson, A.T., Rossman, M.J., Seals, D.R., Edwards, D.G., 2021. Mitochondrial contributions to vascular endothelial dysfunction, arterial stiffness, and cardiovascular diseases. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 320, H2080–H2100. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00917.2020>
- Kis, B., Nagy, K., Snipes, J.A., Rajapakse, N.C., Horiguchi, T., Grover, G.J., Busija, D.W., 2004. The mitochondrial K(ATP) channel opener BMS-191095 induces neuronal preconditioning. *Neuroreport* 15, 345–349. <https://doi.org/10.1097/00001756-200402090-00027>
- Kis, B., Rajapakse, N.C., Snipes, J.A., Nagy, K., Horiguchi, T., Busija, D.W., 2003. Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 87, 969–980. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02072.x>
- Kizhakekuttu, T.J., Wang, J., Dharmashankar, K., Ying, R., Gutterman, D.D., Vita, J.A., Widlansky, M.E., 2012. Adverse alterations in mitochondrial function contribute to type 2 diabetes mellitus-related endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2531–2539. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.256024>
- Kloner, R.A., Mullin, S.H., Shook, T., Matthews, R., Mayeda, G., Burstein, S., Peled, H., Pollick, C., Choudhary, R., Rosen, R., Padma-Nathan, H., 2003. Erectile dysfunction in the cardiac patient: how common and should we treat? *J. Urol.* 170, S46-50; discussion S50. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000075055.34506.59>
- Kluge, M.A., Fetterman, J.L., Vita, J.A., 2013. Mitochondria and endothelial function. *Circ. Res.* 112, 1171–1188. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300233>
- Knupp, J., Arvan, P., Chang, A., 2019. Increased mitochondrial respiration promotes survival from endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 26, 487–501. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0133-4>
- Konig, M., Lamos, E.M., Stein, S.A., Davis, S.N., 2013. An insight into the recent diabetes trials: what is the best approach to prevent macrovascular and microvascular complications? *Curr. Diabetes Rev.* 9, 371–381. <https://doi.org/10.2174/15733998113099990077>
- Kopec, K.O., Alva, V., Lupas, A.N., 2010. Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 1927–1931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq326>
- Kopustinskiene, D.M., Toleikis, A., Saris, N.-E.L., 2003. Adenine nucleotide translocase mediates the K(ATP)-channel-openers-induced proton and potassium flux to the mitochondrial matrix. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 141–148. <https://doi.org/10.1023/a:1023746103401>
- Korge, P., Honda, H.M., Weiss, J.N., 2002. Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: Implications for ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3312–3317. <https://doi.org/10.1073/pnas.052713199>
- Kornmann, B., 2013. The molecular hug between the ER and the mitochondria. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 443–448. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.02.010>

- Kovanecz, I., Ferrini, M.G., Vernet, D., Nolzco, G., Rajfer, J., Gonzalez-Cadavid, N.F., 2006. Pioglitazone prevents corporal veno-occlusive dysfunction in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *BJU Int.* 98, 116–124. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06268.x>
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>
- Kowaltowski, A.J., Maciel, E.N., Fornazari, M., Castilho, R.F., 2006. Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. *Exp. Neurol.* 201, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.004>
- Kowaltowski, A.J., Seetharaman, S., Paucek, P., Garlid, K.D., 2001. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H649–657. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.2.H649>
- Kozlov, A.V., Duvigneau, J.C., Miller, I., Nürnberger, S., Gesslbauer, B., Kungl, A., Ohlinger, W., Hartl, R.T., Gille, L., Staniek, K., Gregor, W., Haindl, S., Redl, H., 2009. Endotoxin causes functional endoplasmic reticulum failure, possibly mediated by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.03.004>
- Krassioukov, A., Elliott, S., 2017. Neural Control and Physiology of Sexual Function: Effect of Spinal Cord Injury. *Top. Spinal Cord Inj. Rehabil.* 23, 1. <https://doi.org/10.1310/sci2301-1>
- Kratzer, A., Giral, H., Landmesser, U., 2014. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc. Res.* 103, 350–361. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu139>
- Krebs, J., Agellon, L.B., Michalak, M., 2015. Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.004>
- Kubli, D.A., Gustafsson, Å.B., 2012. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ. Res.* 111, 1208–1221. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.265819>
- Kuo, S.S., Saad, A.H., Koong, A.C., Hahn, G.M., Giaccia, A.J., 1993. Potassium-channel activation in response to low doses of gamma-irradiation involves reactive oxygen intermediates in nonexcitatory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 908–912. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.908>
- Kvam, D.C., Stanton, H.C., White, J.B., 1964. Studies on Diazoxide Hyperglycemia. *Diabetes* 13, 639–644. <https://doi.org/10.2337/diab.13.6.639>
- Laaksonen, D.E., Niskanen, L., Punnonen, K., Nyysönen, K., Tuomainen, T.-P., Salonen, R., Rauramaa, R., Salonen, J.T., 2003. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur. J. Endocrinol.* 149, 601–608. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1490601>
- Lakatta, E.G., Levy, D., 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular

disease. *Circulation* 107, 139–146.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000048892.83521.58>

- Lakka, H.-M., Laaksonen, D.E., Lakka, T.A., Niskanen, L.K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., Salonen, J.T., 2002. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288, 2709–2716. <https://doi.org/10.1001/jama.288.21.2709>
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F., Hey-Mogensen, M., 2012. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* 590, 3349–3360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185>
- Laurindo, F.R.M., Araujo, T.L.S., Abrahão, T.B., 2014. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 2755–2775. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5605>
- Laursen, J.B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B.A., Harrison, D.G., 1997. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95, 588–593. <https://doi.org/10.1161/01.cir.95.3.588>
- Laycock, S.K., Vogel, T., Forfia, P.R., Tuzman, J., Xu, X., Ochoa, M., Thompson, C.I., Nasjletti, A., Hintze, T.H., 1998. Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. *Circ. Res.* 82, 1263–1271. <https://doi.org/10.1161/01.res.82.12.1263>
- Leanza, L., Checchetto, V., Biasutto, L., Rossa, A., Costa, R., Bachmann, M., Zoratti, M., Szabo, I., 2019. Pharmacological modulation of mitochondrial ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 176, 4258–4283. <https://doi.org/10.1111/bph.14544>
- Lee, J.E., Yuan, H., Liang, F.-X., Sehgal, P.B., 2013. Nitric oxide scavenging causes remodeling of the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and mitochondria in pulmonary arterial endothelial cells. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 33, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.06.005>
- Lee, K.-U., Lee, I.K., Han, J., Song, D.-K., Kim, Y.M., Song, H.S., Kim, H.S., Lee, W.J., Koh, E.H., Song, K.-H., Han, S.M., Kim, M.S., Park, I.-S., Park, J.-Y., 2005. Effects of recombinant adenovirus-mediated uncoupling protein 2 overexpression on endothelial function and apoptosis. *Circ. Res.* 96, 1200–1207. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000170075.73039.5b>
- Lee, S.B., Bae, I.H., Bae, Y.S., Um, H.-D., 2006. Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J. Biol. Chem.* 281, 36228–36235. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606702200>
- Lee, W.-K., Bork, U., Gholamrezaei, F., Thévenod, F., 2005. Cd(2+)-induced cytochrome c release in apoptotic proximal tubule cells: role of mitochondrial permeability transition pore and Ca(2+) uniporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288, F27-39. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00224.2004>
- Lei, K., Davis, R.J., 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2432–2437. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438011100>

- Lenna, S., Han, R., Trojanowska, M., 2014. ER stress and endothelial dysfunction. *IUBMB Life* 66, 530–537. <https://doi.org/10.1002/iub.1292>
- Lenzsér, G., Kis, B., Bari, F., Busija, D.W., 2005. Diazoxide preconditioning attenuates global cerebral ischemia-induced blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* 1051, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.064>
- Leonard, M.P., Nickel, C.J., Morales, A., 1989. Hyperprolactinemia and impotence: why, when and how to investigate. *J. Urol.* 142, 992–994. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)38964-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)38964-4)
- Lessiani, G., Santilli, F., Boccatonda, A., Iodice, P., Liani, R., Tripaldi, R., Saggini, R., Davì, G., 2016. Arterial stiffness and sedentary lifestyle: Role of oxidative stress. *Vascul. Pharmacol.* 79, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.017>
- Levin, R.M., Wein, A.J., 1980. Adrenergic alpha receptors outnumber beta receptors in human penile corpus cavernosum. *Invest. Urol.* 18, 225–226.
- Levine, F.J., Greenfield, A.J., Goldstein, I., 1990. Arteriographically determined occlusive disease within the hypogastric-cavernous bed in impotent patients following blunt perineal and pelvic trauma. *J. Urol.* 144, 1147–1153. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)39678-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)39678-7)
- Lewis, R.W., Fugl-Meyer, K.S., Corona, G., Hayes, R.D., Laumann, E.O., Moreira, E.D., Rellini, A.H., Segraves, T., 2010. Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. *J. Sex. Med.* 7, 1598–1607. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01778.x>
- Li, A., Song, N.-J., Riesenberger, B.P., Li, Z., 2020. The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Front. Immunol.* 10, 3154. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03154>
- Li, G., Mongillo, M., Chin, K.-T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R., Tabas, I., 2009. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 186, 783–792. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904060>
- Li, G., Scull, C., Ozcan, L., Tabas, I., 2010. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J. Cell Biol.* 191, 1113–1125. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006121>
- Li, J.-M., Shah, A.M., 2003. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J. Biol. Chem.* 278, 12094–12100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209793200>
- Li, J.-M., Shah, A.M., 2002. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 19952–19960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110073200>
- Li, R., Beebe, T., Cui, J., Rouhanizadeh, M., Ai, L., Wang, P., Gundersen, M., Takabe, W., Hsiai, T.K., 2009. Pulsatile Shear Stress Increased Mitochondrial Membrane Potential: Implication of Mn-SOD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.022>

- Li, Y., Schwabe, R.F., DeVries-Seimon, T., Yao, P.M., Gerbod-Giannone, M.-C., Tall, A.R., Davis, R.J., Flavell, R., Brenner, D.A., Tabas, I., 2005. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 280, 21763–21772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501759200>
- Liu, B., Zhu, X., Chen, C.-L., Hu, K., Harold M, S., Chen, Y.-R., He, G., 2010. Opening of the MitoKATP Channel and Decoupling of Mitochondrial Complex II and III Contribute to the Suppression of Myocardial Reperfusion Hyperoxygenation. *Mol. Cell. Biochem.* 337, 25–38. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0283-2>
- Liu, D., Lu, C., Wan, R., Auyeung, W.W., Mattson, M.P., 2002. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 431–443. <https://doi.org/10.1097/00004647-200204000-00007>
- Liu, L., Miao, M., Zhong, Z., Xu, P., Chen, Y., Liu, X., 2016. Chronic administration of caderofloxacin, a new fluoroquinolone, increases hepatic CYP2E1 expression and activity in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 37, 561–570. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.160>
- Liu, Y., Bubolz, A.H., Mendoza, S., Zhang, D.X., Gutterman, D.D., 2011. H₂O₂ Is the Transferrable Factor Mediating Flow-Induced Dilation in Human Coronary Arterioles. *Circ. Res.* 108, 566–573. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.237636>
- Liu, Y., Li, H., Bubolz, A.H., Zhang, D.X., Gutterman, D.D., 2008. Endothelial cytoskeletal elements are critical for flow-mediated dilation in human coronary arterioles. *Med. Biol. Eng. Comput.* 46, 469–478. <https://doi.org/10.1007/s11517-008-0331-1>
- Liu, Y., Zhao, H., Li, H., Kalyanaraman, B., Nicolosi, A.C., Gutterman, D.D., 2003. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ. Res.* 93, 573–580. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000091261.19387.AE>
- Lizza, E.F., Rosen, R.C., 1999. Definition and classification of erectile dysfunction: report of the Nomenclature Committee of the International Society of Impotence Research. *Int. J. Impot. Res.* 11, 141–143. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3900396>
- Ljubkovic, M., Shi, Y., Cheng, Q., Bosnjak, Z., Jiang, M.T., 2007. Cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel is activated by nitric oxide in vitro. *FEBS Lett.* 581, 4255–4259. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.071>
- Loesch, A., Burnstock, G., 2002. Endothelin in human cerebrovascular nerves. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 103 Suppl 48, 404S-407S. <https://doi.org/10.1042/CS103S404S>
- Loke, K.E., McConnell, P.I., Tuzman, J.M., Shesely, E.G., Smith, C.J., Stackpole, C.J., Thompson, C.I., Kaley, G., Wolin, M.S., Hintze, T.H., 1999. Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ. Res.* 84, 840–845. <https://doi.org/10.1161/01.res.84.7.840>

- Loukogeorgakis, S.P., Williams, R., Panagiotidou, A.T., Kolvekar, S.K., Donald, A., Cole, T.J., Yellon, D.M., Deanfield, J.E., MacAllister, R.J., 2007. Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation* 116, 1386–1395. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653782>
- Lu, B., Poirier, C., Gaspar, T., Gratzke, C., Harrison, W., Busija, D., Matzuk, M.M., Andersson, K.-E., Overbeek, P.A., Bishop, C.E., 2008. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (*Immp2l*) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice. *Biol. Reprod.* 78, 601–610. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065987>
- Lu, Y., Qian, L., Zhang, Q., Chen, B., Gui, L., Huang, D., Chen, G., Chen, L., 2013. Palmitate induces apoptosis in mouse aortic endothelial cells and endothelial dysfunction in mice fed high-calorie and high-cholesterol diets. *Life Sci.* 92, 1165–1173. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.05.002>
- Lucas, A.M.B., de Lacerda Alexandre, J.V., Araújo, M.T.S., David, C.E.B., Ponte Viana, Y.I., Coelho, B.N., Caldas, F.R.L., Varela, A.L.N., Kowaltowski, A.J., Facundo, H.T., 2020. Diazoxide Modulates Cardiac Hypertrophy by Targeting H₂O₂ Generation and Mitochondrial Superoxide Dismutase Activity. *Curr. Mol. Pharmacol.* 13, 76–83. <https://doi.org/10.2174/1874467212666190723144006>
- Lue, T.F., 2001. Neurogenic erectile dysfunction. *Clin. Auton. Res.* 11, 285–294. <https://doi.org/10.1007/BF02332973>
- Lukowski, R., Cruz Santos, M., Kuret, A., Ruth, P., 2022. cGMP and mitochondrial K⁺ channels-Compartmentalized but closely connected in cardioprotection. *Br. J. Pharmacol.* 179, 2344–2360. <https://doi.org/10.1111/bph.15536>
- Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., Holmgren, A., 2001. Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (*Grx2*) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 26269–26275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011605200>
- Luptak, I., Qin, F., Sverdlov, A.L., Pimentel, D.R., Panagia, M., Croteau, D., Siwik, D.A., Bachschmid, M.M., He, H., Balschi, J.A., Colucci, W.S., 2019. Energetic Dysfunction Is Mediated by Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Precedes Structural Remodeling in Metabolic Heart Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 31, 539–549. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7707>
- Lustgarten, M.S., Bhattacharya, A., Muller, F.L., Jang, Y.C., Shimizu, T., Shirasawa, T., Richardson, A., Van Remmen, H., 2012. Complex I generated, mitochondrial matrix-directed superoxide is released from the mitochondria through voltage dependent anion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.055>
- Luttrell, I.P., Swee, M., Starcher, B., Parks, W.C., Chitale, K., 2008. Erectile dysfunction in the type II diabetic db/db mouse: impaired venoocclusion with altered cavernosal vasoreactivity and matrix. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2204–H2211. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00027.2008>
- Lyons, T.J., 1993. Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 71, 26B–31B. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(93\)90142-y](https://doi.org/10.1016/0002-9149(93)90142-y)

- Maamoun, H., Abdelsalam, S.S., Zeidan, A., Korashy, H.M., Agouni, A., 2019a. Endoplasmic Reticulum Stress: A Critical Molecular Driver of Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disturbances Associated with Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1658. <https://doi.org/10.3390/ijms20071658>
- Maamoun, H., Benameur, T., Pintus, G., Munusamy, S., Agouni, A., 2019b. Crosstalk Between Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Endothelial Dysfunction and Aberrant Angiogenesis Associated With Diabetes: A Focus on the Protective Roles of Heme Oxygenase (HO)-1. *Front. Physiol.* 10, 70. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00070>
- Mabile, L., Meilhac, O., Escargueil-Blanc, I., Trolly, M., Pieraggi, M.T., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., 1997. Mitochondrial function is involved in LDL oxidation mediated by human cultured endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1575–1582. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.8.1575>
- MacDonald, S.M., Burnett, A.L., 2021. Physiology of Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* 48, 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2021.06.009>
- Maciel, E.N., Kowaltowski, A.J., Schwalm, F.D., Rodrigues, J.M., Souza, D.O., Vercesi, A.E., Wajner, M., Castilho, R.F., 2004. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. *J. Neurochem.* 90, 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02565.x>
- Malhotra, J.D., Kaufman, R.J., 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2277–2293. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782>
- Mannhold, R., 2004. KATP channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 24, 213–266. <https://doi.org/10.1002/med.10060>
- Marciniak, S.J., Ron, D., 2006. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.* 86, 1133–1149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2006>
- Martínez, A.C., Prieto, D., Hernández, M., Rivera, L., Recio, P., García-Sacristán, A., Benedito, S., 2005. Endothelial mechanisms underlying responses to acetylcholine in the horse deep dorsal penile vein. *Eur. J. Pharmacol.* 515, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.04.012>
- Martin-Morales, A., Sanchez-Cruz, J.J., Saenz de Tejada, I., Rodriguez-Vela, L., Jimenez-Cruz, J.F., Burgos-Rodriguez, R., 2001. Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the Epidemiologia de la Disfuncion Erectil Masculina Study. *J. Urol.* 166, 569–574; discussion 574-575. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(05\)65986-1](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(05)65986-1)
- Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., Segura-Galindo, A., del Cañizo-Gómez, F.J., 2014. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World J. Diabetes* 5, 444–470. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i4.444>
- Matoba, T., Shimokawa, H., Kubota, H., Morikawa, K., Fujiki, T., Kunihiro, I., Mukai, Y., Hirakawa, Y., Takeshita, A., 2002. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived

hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 909–913. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6278>

Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., Takeshita, A., 2000. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest.* 106, 1521–1530. <https://doi.org/10.1172/JCI10506>

Matsumoto, T., Kakami, M., Noguchi, E., Kobayashi, T., Kamata, K., 2007. Imbalance between endothelium-derived relaxing and contracting factors in mesenteric arteries from aged OLETF rats, a model of Type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1480-1490. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00229.2007>

Mayanagi, K., Gáspár, T., Katakam, P.V.G., Kis, B., Busija, D.W., 2007. The mitochondrial K(ATP) channel opener BMS-191095 reduces neuronal damage after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 348–355. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600345>

Mayanagi, K., Katakam, P.V., Gáspár, T., Domoki, F., Busija, D.W., 2008. Acute treatment with rosuvastatin protects insulin resistant (C57BL/6J ob/ob) mice against transient cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1927–1935. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.81>

McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* CB 16, R551-560. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>

McDermott, D.W., Bates, R.J., Heney, N.M., Althausen, A., 1981. Erectile impotence as complication of direct vision cold knife urethrotomy. *Urology* 18, 467–469. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(81\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0090-4295(81)90291-0)

McIntosh, V.J., Lasley, R.D., 2012. Adenosine receptor-mediated cardioprotection: are all 4 subtypes required or redundant? *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 17, 21–33. <https://doi.org/10.1177/1074248410396877>

McMurray, F., Patten, D.A., Harper, M.-E., 2016. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity* 24, 2301–2310. <https://doi.org/10.1002/oby.21654>

Mendoza, S.A., Fang, J., Gutterman, D.D., Wilcox, D.A., Bubolz, A.H., Li, R., Suzuki, M., Zhang, D.X., 2010. TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 298, H466–H476. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00854.2009>

Menezes-Filho, S.L., Amigo, I., Prado, F.M., Ferreira, N.C., Koike, M.K., Pinto, I.F.D., Miyamoto, S., Montero, E.F.S., Medeiros, M.H.G., Kowaltowski, A.J., 2017. Caloric restriction protects livers from ischemia/reperfusion damage by preventing Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.* 110, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.013>

- Merdzo, I., Rutkai, I., Sure, V.N.L.R., McNulty, C.A., Katakam, P.V.G., Busija, D.W., 2017. Impaired mitochondrial respiration in large cerebral arteries of rats with type 2 diabetes. *J. Vasc. Res.* 54, 1–12. <https://doi.org/10.1159/000454812>
- Mersdorf, A., Goldsmith, P.C., Diederichs, W., Padula, C.A., Lue, T.F., Fishman, I.J., Tanagho, E.A., 1991. Ultrastructural changes in impotent penile tissue: a comparison of 65 patients. *J. Urol.* 145, 749–758. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)38443-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)38443-4)
- Mertens, S., Noll, T., Spahr, R., Krützfeldt, A., Piper, H.M., 1990. Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia. *Am. J. Physiol.* 258, H689-694. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.258.3.H689>
- Metz, P., Ebbelhøj, J., Uhrenholdt, A., Wagner, G., 1983. Peyronie's disease and erectile failure. *J. Urol.* 130, 1103–1104. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)51706-1](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)51706-1)
- Meulemans, A., 2005. Production of hydrogen peroxide in rat corpus cavernosum: An on-line study with microvoltammetric electrodes. *C. R. Biol.* 328, 834–840. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.07.006>
- Midzak, A., Papadopoulos, V., 2016. Adrenal Mitochondria and Steroidogenesis: From Individual Proteins to Functional Protein Assemblies. *Front. Endocrinol.* 7, 106. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00106>
- Mills, T.M., Stopper, V.S., Wiedmeier, V.T., 1994. Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol. Reprod.* 51, 234–238. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.2.234>
- Minamino, T., Komuro, I., Kitakaze, M., 2010. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 107, 1071–1082. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227819>
- Minhas, S., Cartledge, J., Eardley, I., 2000. The role of prostaglandins in penile erection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids PLEFA* 62, 137–146. <https://doi.org/10.1054/plef.2000.0133>
- Mirone, V., Imbimbo, C., Fusco, F., Verze, P., Creta, M., Tajana, G., 2009. Androgens and Morphologic Remodeling at Penile and Cardiovascular Levels: A Common Piece in Complicated Puzzles? *Eur. Urol.* 56, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.12.037>
- Mironova, G.D., Negoda, A.E., Marinov, B.S., Paucek, P., Costa, A.D.T., Grigoriev, S.M., Skarga, Y.Yu., Garlid, K.D., 2004. Functional Distinctions between the Mitochondrial ATP-dependent K⁺ Channel (mitoKATP) and Its Inward Rectifier Subunit (mitoKIR)*. *J. Biol. Chem.* 279, 32562–32568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401115200>
- Mironova, G.D., Skarga, Y.Y., Grigoriev, S.M., Negoda, A.E., Kolomytkin, O.V., Marinov, B.S., 1999. Reconstitution of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel into bilayer lipid membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 159–163. <https://doi.org/10.1023/a:1005408029549>
- Mittawae, B., El-Nashaar, A.R., Fouda, A., Magdy, M., Shamloul, R., 2006. Incidence of erectile dysfunction in 800 hypertensive patients: a multicenter Egyptian national study. *Urology* 67, 575–578. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.09.040>

- Miura, H., Bosnjak, J.J., Ning, G., Saito, T., Miura, M., Gutterman, D.D., 2003. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ. Res.* 92, e31-40. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000054200.44505.ab>
- Miyagawa, K., Ohashi, M., Yamashita, S., Kojima, M., Sato, K., Ueda, R., Dohi, Y., 2007. Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 25, 415–421. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3280115b96>
- Mohan Nair, M., Zhao, R., Xie, X., Shen, G.X., 2016. Impact of glycated LDL on endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: involvement of transmembrane signaling and endoplasmic reticulum stress. *J. Diabetes Complications* 30, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.01.008>
- Moncada, S., Erusalimsky, J.D., 2002. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 214–220. <https://doi.org/10.1038/nrm762>
- Moncada, S., Higgs, E.A., 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S193-201. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706458>
- Monteiro, G., Kowaltowski, A.J., Barros, M.H., Netto, L.E.S., 2004. Glutathione and thioredoxin peroxidases mediate susceptibility of yeast mitochondria to Ca(2+)-induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 425, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.005>
- Montorsi, F., Briganti, A., Salonia, A., Rigatti, P., Margonato, A., Macchi, A., Galli, S., Ravagnani, P.M., Montorsi, P., 2003. Erectile Dysfunction Prevalence, Time of Onset and Association with Risk Factors in 300 Consecutive Patients with Acute Chest Pain and Angiographically Documented Coronary Artery Disease. *Eur. Urol.* 44, 360–365. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(03\)00305-1](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00305-1)
- Montorsi, F., Guazzoni, G., Strambi, L.F., Da Pozzo, L.F., Nava, L., Barbieri, L., Rigatti, P., Pizzini, G., Miani, A., 1997. Recovery of spontaneous erectile function after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy with and without early intracavernous injections of alprostadil: results of a prospective, randomized trial. *J. Urol.* 158, 1408–1410.
- Montorsi, P., Montorsi, F., Schulman, C.C., 2003. Is erectile dysfunction the “tip of the iceberg” of a systemic vascular disorder? *Eur. Urol.* 44, 352–354. [https://doi.org/10.1016/s0302-2838\(03\)00307-5](https://doi.org/10.1016/s0302-2838(03)00307-5)
- Montorsi, P., Ravagnani, P.M., Galli, S., Salonia, A., Briganti, A., Werba, J.P., Montorsi, F., 2006. Association between erectile dysfunction and coronary artery disease: Matching the right target with the right test in the right patient. *Eur. Urol.* 50, 721–731. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.07.015>
- Moreland, R.B., 2000. Pathophysiology of erectile dysfunction: the contributions of trabecular structure to function and the role of functional antagonism. *Int. J. Impot. Res.* 12 Suppl 4, S39-46. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3900576>
- Moreland, R.B., Albadawi, H., Bratton, C., Patton, G., Goldstein, I., Traish, A., Watkins, M.T., 2001. O₂-dependent prostanoid synthesis activates functional PGE

receptors on corpus cavernosum smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H552-558. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.2.H552>

- Moreland, R.B., Traish, A., McMillin, M.A., Smith, B., Goldstein, I., Saenz de Tejada, I., 1995. PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor-beta 1 in human corpus cavernosum smooth muscle. *J. Urol.* 153, 826–834.
- Morino, K., Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Frattini, J., Shatzkes, N., Neschen, S., White, M.F., Bilz, S., Sono, S., Pypaert, M., Shulman, G.I., 2005. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J. Clin. Invest.* 115, 3587–3593. <https://doi.org/10.1172/JCI25151>
- Mosentsov, A.A., Rozova, E.V., Belosludtseva, N.V., Mankovskaya, I.N., Putiy, Y.V., Karaban, I.N., Mikheeva, I.B., Mironova, G.D., 2021. Does the Operation of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels Affect the Structural Component of Mitochondrial and Endothelial Dysfunctions in Experimental Parkinsonism? *Bull. Exp. Biol. Med.* 170, 431–435. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05081-y>
- Mowbray, A.L., Kang, D.-H., Rhee, S.G., Kang, S.W., Jo, H., 2008. Laminar shear stress up-regulates peroxiredoxins (PRX) in endothelial cells: PRX 1 as a mechanosensitive antioxidant. *J. Biol. Chem.* 283, 1622–1627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707985200>
- Mozos, I., Malainer, C., Horbańczuk, J., Gug, C., Stoian, D., Luca, C.T., Atanasov, A.G., 2017. Inflammatory Markers for Arterial Stiffness in Cardiovascular Diseases. *Front. Immunol.* 8, 1058. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01058>
- Müller, A., Mulhall, J.P., 2006. Cardiovascular disease, metabolic syndrome and erectile dysfunction. *Curr. Opin. Urol.* 16, 435–443. <https://doi.org/10.1097/01.mou.0000250284.83108.a6>
- Muller, C., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., Vindis, C., 2011. HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ.* 18, 817–828. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.149>
- Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H., 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064–49073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407715200>
- Mulligan, T., Schmitt, B., 1993. Testosterone for erectile failure. *J. Gen. Intern. Med.* 8, 517–521. <https://doi.org/10.1007/BF02600118>
- Mulvany, M.J., Halpern, W., 1977. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* 41, 19–26. <https://doi.org/10.1161/01.res.41.1.19>
- Muñoz, M., López-Oliva, M.E., Pinilla, E., Martínez, M.P., Sánchez, A., Rodríguez, C., García-Sacristán, A., Hernández, M., Rivera, L., Prieto, D., 2017. CYP epoxygenase-derived H₂O₂ is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries. *Free Radic. Biol. Med.* 106, 168–183. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.031>

- Muñoz, M., López-Oliva, M.E., Rodríguez, C., Martínez, M.P., Sáenz-Medina, J., Sánchez, A., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., Rivera, L., Hernández, M., Prieto, D., 2020. Differential contribution of Nox1, Nox2 and Nox4 to kidney vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity. *Redox Biol.* 28, 101330. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101330>
- Muñoz, M., Martínez, M.P., López-Oliva, M.E., Rodríguez, C., Corbacho, C., Carballido, J., García-Sacristán, A., Hernández, M., Rivera, L., Sáenz-Medina, J., Prieto, D., 2018. Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contributes to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries. *Redox Biol.* 19, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.08.004>
- Murakoshi, N., Miyauchi, T., Kakinuma, Y., Ohuchi, T., Goto, K., Yanagisawa, M., Yamaguchi, I., 2002. Vascular endothelin-B receptor system in vivo plays a favorable inhibitory role in vascular remodeling after injury revealed by endothelin-B receptor-knockout mice. *Circulation* 106, 1991–1998. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000032004.56585.2a>
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E., Snyder, S.H., 2011. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ. Res.* 109, 1259–1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>
- Nakai, T., Ichihara, K., 1994. Effects of diazoxide on norepinephrine-induced vasoconstriction and ischemic myocardium in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1341–1344. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1341>
- Nakazono, K., Watanabe, N., Matsuno, K., Sasaki, J., Sato, T., Inoue, M., 1991. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10045–10048. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10045>
- Nangle, M.R., Proietto, J., Keast, J.R., 2009. Impaired cavernous reinnervation after penile nerve injury in rats with features of the metabolic syndrome. *J. Sex. Med.* 6, 3032–3044. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01415.x>
- Neves, K.B., Harvey, A.P., Moreton, F., Montezano, A.C., Rios, F.J., Alves-Lopes, R., Cat, A.N.D., Rocchiccioli, P., Delles, C., Joutel, A., Muir, K., Touyz, R.M., 2019. ER stress and Rho kinase activation underlie the vasculopathy of CADASIL. *JCI Insight* 4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131344>
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Attardi, G., Holt, I.J., 2001. Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene. *J. Biol. Chem.* 276, 6755–6762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008114200>
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790. <https://doi.org/10.1038/35008121>

- Noma, A., 1983. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147–148. <https://doi.org/10.1038/305147a0>
- Notsu, T., Tanaka, I., Takano, M., Noma, A., 1992. Blockade of the ATP-sensitive K⁺ channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 702–708.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* 153, 1011–1022.
- Ockaili, R., Salloum, F., Hawkins, J., Kukreja, R.C., 2002. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1263-1269. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00324.2002>
- Oh, Y.K., Bachar, A.R., Zacharias, D.G., Kim, S.G., Wan, J., Cobb, L.J., Lerman, L.O., Cohen, P., Lerman, A., 2011. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* 219, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.038>
- Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276, 38388–38393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105395200>
- Okahara, K., Sun, B., Kambayashi, J., 1998. Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1922–1926. <https://doi.org/10.1161/01.atv.18.12.1922>
- O’Kane, P., Jackson, G., 2001. Erectile Dysfunction: Is There Silent Obstructive Coronary Artery Disease? *Int. J. Clin. Pract.* 55, 219–220. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2001.tb11016.x>
- Okon, E.B., Chung, A.W.Y., Rauniyar, P., Padilla, E., Tejerina, T., McManus, B.M., Luo, H., van Breemen, C., 2005. Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes* 54, 2415–2423. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2415>
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., Brown, W.J., 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* 1, 409–417. <https://doi.org/10.1002/ana.410010502>
- Omar, H.A., Wolin, M.S., 1992. Endothelium-dependent and independent cGMP mechanisms appear to mediate O₂ responses in calf pulmonary resistance arteries. *Am. J. Physiol.* 262, L560-565. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.5.L560>
- O’Rourke, B., 2004. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ. Res.* 94, 420–432. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000117583.66950.43>

- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchon, M.R., 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
- O-Uchi, J., Ryu, S.-Y., Jhun, B.S., Hurst, S., Sheu, S.-S., 2014. Mitochondrial Ion Channels/Transporters as Sensors and Regulators of Cellular Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 987–1006. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5681>
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., Mori, M., 2002. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 525–532. <https://doi.org/10.1172/JCI14550>
- Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S., 2004. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 306, 457–461. <https://doi.org/10.1126/science.1103160>
- Padma-Nathan, H., McCullough, A., Forest, C., 2004. Erectile dysfunction secondary to nerve-sparing radical retropubic prostatectomy: comparative phosphodiesterase-5 inhibitor efficacy for therapy and novel prevention strategies. *Curr. Urol. Rep.* 5, 467–471. <https://doi.org/10.1007/s11934-004-0072-0>
- Paggio, A., Checchetto, V., Campo, A., Menabò, R., Di Marco, G., Di Lisa, F., Szabo, I., Rizzuto, R., De Stefani, D., 2019. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature* 572, 609–613. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1498-3>
- Palácio, P.B., de Freitas Soares, G.C., Lima, G.M.B., Cunha, P.L.O., Varela, A.L.N., Facundo, H.T., 2023. Competitive interaction between ATP and GTP regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Chem. Biol. Interact.* 381, 110560. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110560>
- Palacios-Callender, M., Quintero, M., Hollis, V.S., Springett, R.J., Moncada, S., 2004. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7630–7635. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401723101>
- Pandey, V.K., Mathur, A., Kakkar, P., 2019. Emerging role of Unfolded Protein Response (UPR) mediated proteotoxic apoptosis in diabetes. *Life Sci.* 216, 246–258. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.041>
- Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E., Epstein, S.E., 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 323, 22–27. <https://doi.org/10.1056/NEJM199007053230105>
- Park, J.K., Kim, S.Z., Kim, S.H., Park, Y.K., Cho, K.W., 1997. Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: functional characterization of angiotensin II receptors. *J. Urol.* 158, 653–658.
- Park, S., Lakatta, E.G., 2012. Role of Inflammation in the Pathogenesis of Arterial Stiffness. *Yonsei Med. J.* 53, 258–261. <https://doi.org/10.3349/ymj.2012.53.2.258>

- Park, S.H., Kwon, O.S., Park, S.-Y., Weavil, J.C., Hydren, J.R., Reese, V., Andtbacka, R.H.I., Hyngstrom, J.R., Richardson, R.S., 2020. Vasodilatory and vascular mitochondrial respiratory function with advancing age: evidence of a free radically mediated link in the human vasculature. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 318, R701–R711. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00268.2019>
- Park, S.-Y., Gifford, J.R., Andtbacka, R.H.I., Trinity, J.D., Hyngstrom, J.R., Garten, R.S., Diakos, N.A., Ives, S.J., Dela, F., Larsen, S., Drakos, S., Richardson, R.S., 2014. Cardiac, skeletal, and smooth muscle mitochondrial respiration: are all mitochondria created equal? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307, H346–352. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00227.2014>
- Park, S.-Y., Pekas, E.J., Headid, R.J., Son, W.-M., Wooden, T.K., Song, J., Layec, G., Yadav, S.K., Mishra, P.K., Pipinos, I.I., 2020. Acute mitochondrial antioxidant intake improves endothelial function, antioxidant enzyme activity, and exercise tolerance in patients with peripheral artery disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 319, H456–H467. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00235.2020>
- Parkkisenniemi, U.M., Palkama, A., Virtanen, I., Klinge, E., 2000. The endothelin ET(B) receptor agonist [125I]BQ-3020 binds predominantly to nerves in the bovine retractor penis muscle and penile artery. *Pharmacol. Toxicol.* 87, 234–241. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2000.d01-80.x>
- Paskaloglu, K., Sener, G., Ayançolu-Dülger, G., 2004. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur. J. Pharmacol.* 499, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.08.002>
- Pastuszak, A.W., 2014. Current Diagnosis and Management of Erectile Dysfunction. *Curr. Sex. Health Rep.* 6, 164–176. <https://doi.org/10.1007/s11930-014-0023-9>
- Patterson, H.C., Gerbeth, C., Thiru, P., Vögtle, N.F., Knoll, M., Shahsafaei, A., Samochoa, K.E., Huang, C.X., Harden, M.M., Song, R., Chen, C., Kao, J., Shi, J., Salmon, W., Shaul, Y.D., Stokes, M.P., Silva, J.C., Bell, G.W., MacArthur, D.G., Ruland, J., Meisinger, C., Lodish, H.F., 2015. A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5679–E5688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517932112>
- Patti, M.-E., Corvera, S., 2010. The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.* 31, 364–395. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0027>
- Paucek, P., Mironova, G., Mahdi, F., Beavis, A.D., Woldegiorgis, G., Garlid, K.D., 1992. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 267, 26062–26069.
- Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., Garlid, K.D., 1996. Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 271, 32084–32088. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.32084>
- Pauls, A.D., Sandhu, V., Young, D., Nevay, D.-L., Yeung, D.F., Sirrs, S., Tsang, M.Y., Tsang, T.S.M., Lehman, A., Mezei, M.M., Poburko, D., 2020. High rate of

hypertension in patients with m.3243A>G MELAS mutations and POLG variants. *Mitochondrion* 53, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.05.011>

Pearlstein, D.P., Ali, M.H., Mungai, P.T., Hynes, K.L., Gewertz, B.L., Schumacker, P.T., 2002. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 566–573. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000012262.76205.6a>

Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F., Miroux, B., 2001. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 8705–8712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006938200>

Penson, D.F., Ng, C., Cai, L., Rajfer, J., González-Cadavid, N.F., 1996. Androgen and pituitary control of penile nitric oxide synthase and erectile function in the rat. *Biol. Reprod.* 55, 567–574. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.3.567>

Pereira, O., Kowaltowski, A.J., 2021a. Mitochondrial K⁺ Transport: Modulation and Functional Consequences. *Molecules* 26, 2935. <https://doi.org/10.3390/molecules26102935>

Pereira, O., Kowaltowski, A.J., 2021b. Mitochondrial K⁺ Transport: Modulation and Functional Consequences. *Mol. Basel Switz.* 26, 2935. <https://doi.org/10.3390/molecules26102935>

Pérez, S., Rius-Pérez, S., Finamor, I., Martí-Andrés, P., Prieto, I., García, R., Monsalve, M., Sastre, J., 2019. Obesity causes PGC-1 α deficiency in the pancreas leading to marked IL-6 upregulation via NF- κ B in acute pancreatitis. *J. Pathol.* 247, 48–59. <https://doi.org/10.1002/path.5166>

Perez-Pinzon, M.A., Dave, K.R., Raval, A.P., 2005. Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1150–1157. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1150>

Persson, C., Diederichs, W., Lue, T.F., Yen, T.S., Fishman, I.J., McLin, P.H., Tanagho, E.A., 1989. Correlation of altered penile ultrastructure with clinical arterial evaluation. *J. Urol.* 142, 1462–1468. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)39127-9](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)39127-9)

Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R., Shulman, G.I., 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 350, 664–671. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031314>

Phillips, S.A., Hatoum, O.A., Gutterman, D.D., 2007. The mechanism of flow-induced dilation in human adipose arterioles involves hydrogen peroxide during CAD. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H93-100. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00819.2006>

Pinto, A., Abraham, N.G., Mullane, K.M., 1987. Arachidonic acid-induced endothelial-dependent relaxations of canine coronary arteries: contribution of a cytochrome P-450-dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240, 856–863.

Pirola, L., Balcerczyk, A., Tothill, R.W., Haviv, I., Kaspi, A., Lunke, S., Ziemann, M., Karagiannis, T., Tonna, S., Kowalczyk, A., Beresford-Smith, B., Macintyre, G.,

- Kelong, M., Hongyu, Z., Zhu, J., El-Osta, A., 2011. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Res.* 21, 1601–1615. <https://doi.org/10.1101/gr.116095.110>
- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobó, N., Schöpfer, F., Boveris, A., 1996. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 85–92. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0146>
- Podlasek, C.A., Zelner, D.J., Bervig, T.R., Gonzalez, C.M., McKenna, K.E., McVary, K.T., 2001. Characterization and localization of nitric oxide synthase isoforms in the BB/WOR diabetic rat. *J. Urol.* 166, 746–755.
- Pollock, D.M., 2010. Dissecting the complex physiology of endothelin: new lessons from genetic models. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 56, 31–33. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.139758>
- Porst, H., Sharlip, I.D., 2006. Chapter 3. Anatomy and Physiology of Erection. Hartmut Post and Ira D. Sharlip, in: *Standard Practice in Sexual Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 31–42. <https://doi.org/10.1002/9780470755235.ch3>
- Potenza, M.A., Gagliardi, S., Nacci, C., Carratu', M.R., Montagnani, M., 2009. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.* 16, 94–112. <https://doi.org/10.2174/092986709787002853>
- Prieto, D., 2008a. Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int. J. Impot. Res.* 20, 17–29. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901581>
- Prieto, D., 2008b. Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int. J. Impot. Res.* 20, 17–29. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901581>
- Prieto, D., Arcos, L.R. de L., Martínez, P., Benedito, S., García-Sacristán, A., Hernández, M., 2004. Heterogeneity of the neuropeptide Y (NPY) contractile and relaxing receptors in horse penile small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 143, 976–986. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706005>
- Prieto, D., Contreras, C., Sánchez, A., 2014. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 412–426. <https://doi.org/10.2174/1570161112666140423221008>
- Prieto, D., Kaminski, P.M., Bagi, Z., Ahmad, M., Wolin, M.S., 2010. Hypoxic relaxation of penile arteries: involvement of endothelial nitric oxide and modulation by reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 299, H915–H924. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00382.2010>
- Prieto, D., Rivera, L., Benedito, S., Recio, P., Villalba, N., Hernández, M., García-Sacristán, A., 2006a. Ca²⁺-activated K⁺ (KCa) channels are involved in the relaxations elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 531, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.033>
- Prieto, D., Rivera, L., Recio, P., Rubio, J.L.R., Hernández, M., García-Sacristán, A., 2006b. Role of nitric oxide in the relaxation elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *J. Urol.* 175, 1164–1170. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00320-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00320-4)

- Prieto, D., Simonsen, U., Hernández, M., García-Sacristán, A., 1998. Contribution of K⁺ channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 123, 1609–1620. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701780>
- Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F., Ashcroft, F., 2002. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 3, S368-376. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.s368>
- Protasoni, M., Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Harbour, M.E., Ding, S., Peñas, A., Diaz, F., Moraes, C.T., Fearnley, I.M., Zeviani, M., Ugalde, C., Fernández-Vizarra, E., 2020. Respiratory supercomplexes act as a platform for complex III-mediated maturation of human mitochondrial complexes I and IV. *EMBO J.* 39, e102817. <https://doi.org/10.15252/emj.2019102817>
- Pueyo, M.E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J.F., Michel, J.B., 2000. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 645–651. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.3.645>
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001. *Autonomic Regulation of Sexual Function*, in: *Neuroscience*. 2nd Edition. Sinauer Associates.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., Strasser, A., 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>
- Queliconi, B.B., Wojtovich, A.P., Nadtochiy, S.M., Kowaltowski, A.J., Brookes, P.S., 2011. Redox regulation of the mitochondrial K(ATP) channel in cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1309–1315. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.005>
- Quintero, M., Colombo, S.L., Godfrey, A., Moncada, S., 2006. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5379–5384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601026103>
- Rabhi, N., Salas, E., Froguel, P., Annicotte, J.-S., 2014. Role of the Unfolded Protein Response in β Cell Compensation and Failure during Diabetes. *J. Diabetes Res.* 2014, 795171. <https://doi.org/10.1155/2014/795171>
- Rainbolt, T.K., Saunders, J.M., Wiseman, R.L., 2014. Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 25, 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.007>
- Rajapakse, N., Kis, B., Horiguchi, T., Snipes, J., Busija, D., 2003. Diazoxide pretreatment induces delayed preconditioning in astrocytes against oxygen glucose deprivation and hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci. Res.* 73, 206–214. <https://doi.org/10.1002/jnr.10657>
- Rajfer, J., Rosciszewski, A., Mehninger, M., 1988. Prevalence of corporeal venous leakage in impotent men. *J. Urol.* 140, 69–71. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)41489-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)41489-3)

- Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J.I., Milagro, F.I., Moreno-Aliaga, M.J., Martinez, J.A., project MENA, 2018. Endoplasmic reticulum stress epigenetics is related to adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *Adipocyte* 7, 137–142. <https://doi.org/10.1080/21623945.2018.1447731>
- Ray, R., Murdoch, C.E., Wang, M., Santos, C.X., Zhang, M., Alom-Ruiz, S., Anilkumar, N., Ouattara, A., Cave, A.C., Walker, S.J., Grieve, D.J., Charles, R.L., Eaton, P., Brewer, A.C., Shah, A.M., 2011. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1368–1376. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.219238>
- Reaven, G.M., Hollenbeck, C., Jeng, C.Y., Wu, M.S., Chen, Y.D., 1988. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37, 1020–1024. <https://doi.org/10.2337/diab.37.8.1020>
- Rees, R.W., Ralph, D.J., Royle, M., Moncada, S., Cellek, S., 2001. Y-27632, an inhibitor of Rho-kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 133, 455–458. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704124>
- Rego, A.C., Vesce, S., Nicholls, D.G., 2001. The mechanism of mitochondrial membrane potential retention following release of cytochrome c in apoptotic GT1-7 neural cells. *Cell Death Differ.* 8, 995–1003. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400916>
- Reilly, C.M., Lewis, R.W., Stopper, V.S., Mills, T.M., 1997. Androgenic maintenance of the rat erectile response via a non-nitric-oxide-dependent pathway. *J. Androl.* 18, 588–594.
- Renna, N.F., Miatello, R.M., 2013. Fisiología del músculo liso vascular, Hipertensión arterial: Epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica. *Inter-Médica*.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.S., Jeong, W., Kim, K., 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52, 35–41. <https://doi.org/10.1080/15216540252774748>
- Riess, M.L., Camara, A.K.S., Heinen, A., Eells, J.T., Henry, M.M., Stowe, D.F., 2008. KATP channel openers have opposite effects on mitochondrial respiration under different energetic conditions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51, 483–491. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31816bf4a4>
- Rigobello, M.P., Vianello, F., Folda, A., Roman, C., Scutari, G., Bindoli, A., 2006. Differential effect of calcium ions on the cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 873–878. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.050>
- Rizzoni, D., Porteri, E., Guelfi, D., Muesan, M.L., Valentini, U., Cimino, A., Girelli, A., Rodella, L., Bianchi, R., Sleiman, I., Rosei, E.A., 2001. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 103, 1238–1244. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.9.1238>
- Rojas, M., Arias, C.F., López, S., 2010. Protein Kinase R Is Responsible for the Phosphorylation of eIF2 α in Rotavirus Infection. *J. Virol.* 84, 10457–10466. <https://doi.org/10.1128/JVI.00625-10>

- Rolfe, D.F., Brown, G.C., 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77, 731–758. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>
- Ron, D., Hubbard, S.R., 2008. How IRE1 reacts to ER stress. *Cell* 132, 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.017>
- Rosen, M.P., Greenfield, A.J., Walker, T.G., Grant, P., Guben, J.K., Dubrow, J., Bettmann, M.A., Goldstein, I., 1990. Arteriogenic impotence: findings in 195 impotent men examined with selective internal pudendal angiography. Young Investigator's Award. *Radiology* 174, 1043–1048. <https://doi.org/10.1148/radiology.174.3.174-3-1043>
- Rossmann, M.J., Santos-Parker, J.R., Steward, C.A.C., Bispham, N.Z., Cuevas, L.M., Rosenberg, H.L., Woodward, K.A., Chonchol, M., Gioscia-Ryan, R.A., Murphy, M.P., Seals, D.R., 2018. Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 71, 1056–1063. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10787>
- Rossmann, M.P., Dubois, S.M., Agarwal, S., Zon, L.I., 2021. Mitochondrial function in development and disease. *Dis. Model. Mech.* 14, dmm048912. <https://doi.org/10.1242/dmm.048912>
- Roumeguère, T., Wespes, E., Carpentier, Y., Hoffmann, P., Schulman, C.C., 2003. Erectile dysfunction is associated with a high prevalence of hyperlipidemia and coronary heart disease risk. *Eur. Urol.* 44, 355–359. [https://doi.org/10.1016/s0302-2838\(03\)00306-3](https://doi.org/10.1016/s0302-2838(03)00306-3)
- Roy Chowdhury, S.K., Sangle, G.V., Xie, X., Stelmack, G.L., Halayko, A.J., Shen, G.X., 2010. Effects of extensively oxidized low-density lipoprotein on mitochondrial function and reactive oxygen species in porcine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E89-98. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00433.2009>
- Ruan, Y., Zhou, J., Kang, N., Reed-Maldonado, A.B., Tamaddon, A., Wang, B., Wang, H.S., Wang, G., Banie, L., Lin, G., Liu, J., Lue, T.F., 2018. The effect of low-intensity extracorporeal shockwave therapy in an obesity-associated erectile dysfunction rat model. *BJU Int.* 122, 133–142. <https://doi.org/10.1111/bju.14202>
- Ruan, Z., Wang, H., Zhang, K., Xu, Z., Zang, Z., Fu, Q., 2021. Probucol improves erectile function by regulating endoplasmic reticulum stress in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Andrologia* 53, e13999. <https://doi.org/10.1111/and.13999>
- Rubin, A.A., 1963. Hemodynamic Aspects of Certain Antihypertensive Agents. *Angiology* 14, 74–78. <https://doi.org/10.1177/000331976301400204>
- Rubin, A.A., Roth, F.E., Taylor, R.M., Rosenkilde, H., 1962. Pharmacology of diazoxide, an antihypertensive, nondiuretic benzothiadiazine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 136, 344–352.
- Rucker, D., Dhmoon, A.S., 2024. Physiology, Thromboxane A2, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

- Ruiz Rubio, J.L., Hernández, M., Rivera de los Arcos, L., Martínez, A.C., García-Sacristán, A., Prieto, D., 2004. Mechanisms of prostaglandin E1-induced relaxation in penile resistance arteries. *J. Urol.* 171, 968–973. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000097496.27675.c4>
- Russwurm, M., Koesling, D., 2004. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 23, 4443–4450. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600422>
- Rutkai, I., Katakam, P.V.G., Dutta, S., Busija, D.W., 2014. Sustained mitochondrial functioning in cerebral arteries after transient ischemic stress in the rat: a potential target for therapies. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 307, H958– H966. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00405.2014>
- Ruzbarský, V., Michal, V., 1977. Morphologic changes in the arterial bed of the penis with aging. Relationship to the pathogenesis of impotence. *Invest. Urol.* 15, 194–199.
- Ryan, J.G., Gajraj, J., 2012. Erectile dysfunction and its association with metabolic syndrome and endothelial function among patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications* 26, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2011.12.001>
- Saenz de Tejada, I., Carson, M.P., de las Morenas, A., Goldstein, I., Traish, A.M., 1991a. Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *Am. J. Physiol.* 261, H1078-1085. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.4.H1078>
- Saenz de Tejada, I., Goldstein, I., Azadzoi, K., Krane, R.J., Cohen, R.A., 1989. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N. Engl. J. Med.* 320, 1025–1030. <https://doi.org/10.1056/NEJM198904203201601>
- Saenz de Tejada, I., Ware, J.C., Blanco, R., Pittard, J.T., Nadig, P.W., Azadzoi, K.M., Krane, R.J., Goldstein, I., 1991b. Pathophysiology of prolonged penile erection associated with trazodone use. *J. Urol.* 145, 60–64. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)38247-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)38247-2)
- Safiedeen, Z., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., 2016. Dialogue between endoplasmic reticulum and mitochondria as a key actor of vascular dysfunction associated to metabolic disorders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 77, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.011>
- Sakamuri, S.S.V.P., Sperling, J.A., Evans, W.R., Dholakia, M.H., Albuck, A.L., Sure, V.N., Satou, R., Mostany, R., Katakam, P.V.G., 2020. Nitric oxide synthase inhibitors negatively regulate respiration in isolated rodent cardiac and brain mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 318, H295–H300. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00720.2019>
- Salloum, F.N., Takenoshita, Y., Ockaili, R.A., Daoud, V.P., Chou, E., Yoshida, K., Kukreja, R.C., 2007. Sildenafil and Vardenafil but not Nitroglycerin Limit Myocardial Infarction through Opening of Mitochondrial KATP Channels when Administered at Reperfusion following Ischemia in Rabbits. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.10.015>

- Sánchez, A., Contreras, C., Martínez, M.P., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., Hernández, M., Prieto, D., 2012a. Role of neural NO synthase (nNOS) uncoupling in the dysfunctional nitrenergic vasorelaxation of penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *PLoS One* 7, e36027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036027>
- Sánchez, A., Contreras, C., Martínez, M.P., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., Hernández, M., Prieto, D., 2012b. Role of Neural NO Synthase (nNOS) Uncoupling in the Dysfunctional Nitrenergic Vasorelaxation of Penile Arteries from Insulin-Resistant Obese Zucker Rats. *PLoS ONE* 7, e36027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036027>
- Sánchez, A., Contreras, C., Martínez, P., Muñoz, M., Martínez, A.C., García-Sacristán, A., Hernández, M., Prieto, D., 2014. Endothelin A (ET(A)) receptors are involved in augmented adrenergic vasoconstriction and blunted nitric oxide-mediated relaxation of penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *J. Sex. Med.* 11, 1463–1474. <https://doi.org/10.1111/jsm.12526>
- Sánchez, A., Contreras, C., Villalba, N., Martínez, P., Martínez, A., Briones, A., Salaíces, M., García-Sacristán, A., Hernández, M., Prieto, D., 2010. Altered arachidonic acid metabolism via COX-1 and COX-2 contributes to the endothelial dysfunction of penile arteries from obese Zucker rats. *Br. J. Pharmacol.* 159, 604–616. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00553.x>
- Sánchez, A., Villalba, N., Martínez, A.C., García-Sacristán, A., Hernández, M., Prieto, D., 2008. Mechanisms of the relaxant effect of vardenafil in rat penile arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 586, 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.002>
- Sanchez, E., Pastuszak, A.W., Khera, M., 2017. Erectile dysfunction, metabolic syndrome, and cardiovascular risks: facts and controversies. *Transl. Androl. Urol.* 6, 28–36. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.01>
- Sánchez-Duarte, E., Trujillo, X., Huerta, M., Ortiz-Mesina, M., Cortés-Rojo, C., Manzo-Ávalos, S., Saavedra-Molina, A., Montoya-Pérez, R., 2012. Mitochondrial K_{ATP} channels in skeletal muscle: are protein kinases C and G, and nitric oxide synthase involved in the fatigue process? *Open Access Anim. Physiol.* 4, 21–28. <https://doi.org/10.2147/OAAP.S34818>
- Sánchez-Gómez, F.J., Calvo, E., Bretón-Romero, R., Fierro-Fernández, M., Anilkumar, N., Shah, A.M., Schröder, K., Brandes, R.P., Vázquez, J., Lamas, S., 2015. NOX4-dependent Hydrogen peroxide promotes shear stress-induced SHP2 sulfenylation and eNOS activation. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 419–430. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.014>
- Sanson, M., Augé, N., Vindis, C., Muller, C., Bando, Y., Thiers, J.-C., Marachet, M.-A., Zarkovic, K., Sawa, Y., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., 2009. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: Prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ. Res.* 104, 328–336. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183749>
- Santiago, E., Contreras, C., García-Sacristán, A., Sánchez, A., Rivera, L., Climent, B., Prieto, D., 2013. Signaling pathways involved in the H₂O₂-induced vasoconstriction of rat coronary arteries. *Free Radic. Biol. Med.* 60, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.014>

- Santos, C.X.C., Nabeebaccus, A.A., Shah, A.M., Camargo, L.L., Filho, S.V., Lopes, L.R., 2014. Endoplasmic Reticulum Stress and Nox-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in the Peripheral Vasculature: Potential Role in Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 121–134. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5262>
- Santos, C.X.C., Tanaka, L.Y., Wosniak, J., Laurindo, F.R.M., 2009. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2409–2427. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2625>
- Sasaki, N., Sato, T., Ohler, A., O'Rourke, B., Marbán, E., 2000. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 101, 439–445. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.4.439>
- Sato, T., Li, Y., Saito, T., Nakaya, H., 2004. Minoxidil opens mitochondrial KATP channels and confers cardioprotection. *Br. J. Pharmacol.* 141, 360–366. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705613>
- Sato, T., Nishida, H., Miyazaki, M., Nakaya, H., 2006. Effects of sulfonylureas on mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac myocytes: implications for sulfonylurea controversy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22, 341–347. <https://doi.org/10.1002/dmrr.621>
- Sato, T., O'Rourke, B., Marbán, E., 1998. Modulation of Mitochondrial ATP-Dependent K⁺ Channels by Protein Kinase C. *Circ. Res.* 83, 110–114. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.1.110>
- Schäfer, G., Wegener, C., Portenhausser, R., Bojanovski, D., 1969. Diazoxide, an inhibitor of succinate oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 18, 2678–2681.
- Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W.M., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C., Kaufman, R.J., 2005. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat. Med.* 11, 757–764. <https://doi.org/10.1038/nm1259>
- Schiffrin, E.L., 2001. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am. J. Hypertens.* 14, 83S-89S. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(01\)02074-x](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(01)02074-x)
- Schnackenberg, C.G., Welch, W.J., Wilcox, C.S., 1998. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 32, 59–64. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.32.1.59>
- Schneeberger, M., Dietrich, M.O., Sebastián, D., Imbernón, M., Castaño, C., Garcia, A., Esteban, Y., Gonzalez-Franquesa, A., Rodríguez, I.C., Bortolozzi, A., Garcia-Roves, P.M., Gomis, R., Nogueiras, R., Horvath, T.L., Zorzano, A., Claret, M., 2013. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155, 172–187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.003>
- Schneider, M.P., Boesen, E.I., Pollock, D.M., 2007. Contrasting Actions of Endothelin ETA and ETB Receptors in Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 731–759. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105134>

- Schulz, E., Gori, T., Münzel, T., 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 34, 665–673. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.39>
- Schulz, E., Jansen, T., Wenzel, P., Daiber, A., Münzel, T., 2008. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1115–1126. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1989>
- Schwartz, B.G., Kloner, R.A., 2011. Cardiovascular Implications of Erectile Dysfunction. *Circulation* 123, e609–e611. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.017681>
- Schwartz, B.G., Levine, L.A., Comstock, G., Stecher, V.J., Kloner, R.A., 2012. Cardiac Uses of Phosphodiesterase-5 Inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.07.051>
- Schwarz, D.S., Blower, M.D., 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Schwinn, D.A., Lomasney, J.W., 1992. Pharmacologic characterization of cloned α 1-adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtype. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 227, 433–436. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(92\)90162-O](https://doi.org/10.1016/0922-4106(92)90162-O)
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., Orešič, M., Pich, S., Burcelin, R., Palacín, M., Zorzano, A., 2012. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5523–5528. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108220109>
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P., 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12013–12017. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12013>
- Senft, D., Ronai, Z.A., 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem. Sci.* 40, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.01.002>
- Serretti, A., Chiesa, A., 2011. A meta-analysis of sexual dysfunction in psychiatric patients taking antipsychotics. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 26, 130–140. <https://doi.org/10.1097/YIC.0b013e328341e434>
- Shabsigh, R., 2003. Hypogonadism and erectile dysfunction: the role for testosterone therapy. *Int. J. Impot. Res. Suppl* 4, S9-13. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901030>
- Shabsigh, R., 1997. The effects of testosterone on the cavernous tissue and erectile function. *World J. Urol.* 15, 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF01275152>
- Shah, M.S., Brownlee, M., 2016. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ. Res.* 118, 1808–1829. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306923>

- Shamloul, R., Ghanem, H., 2013. Erectile dysfunction. *Lancet Lond. Engl.* 381, 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60520-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60520-0)
- Sharma, N.K., Das, S.K., Mondal, A.K., Hackney, O.G., Chu, W.S., Kern, P.A., Rasouli, N., Spencer, H.J., Yao-Borengasser, A., Elbein, S.C., 2008. Endoplasmic Reticulum Stress Markers Are Associated with Obesity in Nondiabetic Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4532–4541. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1001>
- Sheikh-Ali, M., Sultan, S., Alamir, A.-R., Haas, M.J., Mooradian, A.D., 2010. Hyperglycemia-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 26, 1146–1150. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.08.019>
- Sheldon, K.L., San Martín, A., 2015. Role of Subplasmalemmal Mitochondria in Angiotensin II-Mediated Contraction. *Circ. Res.* 117, 984–986. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307795>
- Shen, W., Hintze, T.H., Wolin, M.S., 1995. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 92, 3505–3512. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.12.3505>
- Shen, W., Xu, X., Ochoa, M., Zhao, G., Wolin, M.S., Hintze, T.H., 1994. Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circ. Res.* 75, 1086–1095. <https://doi.org/10.1161/01.res.75.6.1086>
- Shenouda, S.M., Widlansky, M.E., Chen, K., Xu, G., Holbrook, M., Tabit, C.E., Hamburg, N.M., Frame, A.A., Caiano, T.L., Kluge, M.A., Duess, M.-A., Levit, A., Kim, B., Hartman, M.-L., Joseph, L., Shirihai, O.S., Vita, J.A., 2011. Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 124, 444–453. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014506>
- Shimizu, K., Lacza, Z., Rajapakse, N., Horiguchi, T., Snipes, J., Busija, D.W., 2002. MitoK(ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1005-1011. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00054.2002>
- Simonsen, U., García-Sacristán, A., Prieto, D., 2002. Penile arteries and erection. *J. Vasc. Res.* 39, 283–303. <https://doi.org/10.1159/000065541>
- Simonsen, U., Prieto, D., Delgado, J.A., Hernández, M., Resel, L., Saenz de Tejada, I., García-Sacristán, A., 1997a. Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 92, 269–275. <https://doi.org/10.1042/cs0920269>
- Simonsen, U., Prieto, D., Hernández, M., Sáenz de Tejada, I., García-Sacristán, A., 1997b. Adrenoceptor-mediated regulation of the contractility in horse penile resistance arteries. *J. Vasc. Res.* 34, 90–102. <https://doi.org/10.1159/000159206>
- Simonsen, U., Prieto, D., Hernández, M., Sáenz de Tejada, I., García-Sacristán, A., 1997c. Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitroergic neurotransmission in horse penile resistance arteries. *J. Urol.* 157, 2356–2360.

- Singh, B.K., Tripathi, M., Pandey, P.K., Kakkar, P., 2011. Alteration in mitochondrial thiol enhances calcium ion dependent membrane permeability transition and dysfunction in vitro: a cross-talk between mtThiol, Ca(2+), and ROS. *Mol. Cell. Biochem.* 357, 373–385. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0908-0>
- Sivarajah, A., Collino, M., Yasin, M., Benetti, E., Gallicchio, M., Mazzon, E., Cuzzocrea, S., Fantozzi, R., Thiernemann, C., 2009. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock Augusta Ga* 31, 267–274. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318180ff89>
- Skulachev, V.P., 1998. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100–124. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(97\)00091-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00091-1)
- Sood, R., Sharma, D., Goel, H., Khattar, N., Kulshreshtha, B., Singh, K.K., 2019. The correlation between erectile dysfunction and metabolic syndrome in an Indian population: A cross-sectional observational study. *Arab J. Urol.* 17, 221–227. <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1600990>
- Souza-Smith, F.M., Katz, P.S., Trask, A.J., Stewart, J.A., Lord, K.C., Varner, K.J., Vassallo, D.V., Lucchesi, P.A., 2011. Mesenteric Resistance Arteries in Type 2 Diabetic db/db Mice Undergo Outward Remodeling. *PLoS ONE* 6, e23337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023337>
- Spahr, R., Krützfeldt, A., Mertens, S., Siegmund, B., Piper, H.M., 1989. Fatty acids are not an important fuel for coronary microvascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 88, 59–64. <https://doi.org/10.1007/BF00223424>
- Spinetti, G., Kraenkel, N., Emanuelli, C., Madeddu, P., 2008. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies. *Cardiovasc. Res.* 78, 265–273. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn039>
- Springo, Z., Tarantini, S., Toth, P., Tucsek, Z., Koller, A., Sonntag, W.E., Csiszar, A., Ungvari, Z., 2015. Aging Exacerbates Pressure-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Mouse Cerebral Arteries. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 70, 1355–1359. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu244>
- Srinivasan, S., Yeh, M., Danziger, E.C., Hatley, M.E., Riggan, A.E., Leitinger, N., Berliner, J.A., Hedrick, C.C., 2003. Glucose regulates monocyte adhesion through endothelial production of interleukin-8. *Circ. Res.* 92, 371–377. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000061714.74668.5C>
- Stanton, B.J., Coupar, I.M., 1986. The effect of BW 755C and nordihydroguaiaretic acid in the rat isolated perfused mesenteric vasculature. *Prostaglandins. Leukot. Med.* 25, 199–207. [https://doi.org/10.1016/0262-1746\(86\)90066-1](https://doi.org/10.1016/0262-1746(86)90066-1)
- Steers, W.D., 1990. Neural control of penile erection. *Semin. Urol.* 8, 66–79.
- Stein, S., Lohmann, C., Handschin, C., Stenfeldt, E., Borén, J., Lüscher, T.F., Matter, C.M., 2010. ApoE^{-/-} PGC-1 α ^{-/-} mice display reduced IL-18 levels and do not develop enhanced atherosclerosis. *PloS One* 5, e13539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013539>
- Stewart, J.D., 2004. Chapter 28. Primer on the Autonomic Nervous System. Sexual Function. John D. Stewart, in: Robertson, D., Biaggioni, I., Burnstock, G., Low,

- P.A. (Eds.), *Primer on the Autonomic Nervous System (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 116–117. <https://doi.org/10.1016/B978-012589762-4/50029-3>
- Stief, C.G., Uckert, S., Becker, A.J., Harringer, W., Truss, M.C., Forssmann, W.G., Jonas, U., 2000. Effects of sildenafil on cAMP and cGMP levels in isolated human cavernous and cardiac tissue. *Urology* 55, 146–150. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(99\)00371-4](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(99)00371-4)
- Stocker, R., Keane, J.F., 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 84, 1381–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>
- Strzyz, P., 2019. ER stress boosts respiration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 453–453. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0139-x>
- Suganya, N., Dornadula, S., Chatterjee, S., Mohanram, R.K., 2018. Quercetin improves endothelial function in diabetic rats through inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* 819, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.034>
- Sun, D., Huang, A., Sharma, S., Koller, A., Kaley, G., 2001. Endothelial microtubule disruption blocks flow-dependent dilation of arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2087-2093. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2087>
- Sure, V.N., Sakamuri, S.S.V.P., Sperling, J.A., Evans, W.R., Merdzo, I., Mostany, R., Murfee, W.L., Busija, D.W., Katakam, P.V.G., 2018. A novel high-throughput assay for respiration in isolated brain microvessels reveals impaired mitochondrial function in the aged mice. *GeroScience* 40, 365–375. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0037-8>
- Sverdlov, A.L., Elezaby, A., Behring, J.B., Bachschmid, M.M., Luptak, I., Tu, V.H., Siwik, D.A., Miller, E.J., Liesa, M., Shirihai, O.S., Pimentel, D.R., Cohen, R.A., Colucci, W.S., 2015. High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.07.018>
- Sverdlov, A.L., Elezaby, A., Qin, F., Behring, J.B., Luptak, I., Calamaras, T.D., Siwik, D.A., Miller, E.J., Liesa, M., Shirihai, O.S., Pimentel, D.R., Cohen, R.A., Bachschmid, M.M., Colucci, W.S., 2016. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Cardiac Structural, Functional, and Mitochondrial Consequences of Diet-Induced Metabolic Heart Disease. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002555. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002555>
- Szabo, I., Zoratti, M., 2014. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol. Rev.* 94, 519–608. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2013>
- Szewczyk, A., Mikołajek, B., Piękała, S., Nalecz, M.J., 1993. Potassium channel openers induce mitochondrial matrix volume changes via activation of ATP-sensitive K⁺ channel. *Pol. J. Pharmacol.* 45, 437–443.
- Tabachnick, I.I.A., Gulbenkian, A., Seidman, F., 1964. The Effect of a Benzothiadiazine, Diazoxide, on Carbohydrate Metabolism. *Diabetes* 13, 408–418. <https://doi.org/10.2337/diab.13.4.408>

- Tabas, I., García-Cardena, G., Owens, G.K., 2015. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell Biol.* 209, 13–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412052>
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A., Salvetti, A., 1998. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 97, 2222–2229. <https://doi.org/10.1161/01.cir.97.22.2222>
- Tahara, E.B., Navarete, F.D.T., Kowaltowski, A.J., 2009. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1283–1297. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008>
- Tampakakis, E., Tabit, C.E., Holbrook, M., Linder, E.A., Berk, B.D., Frame, A.A., Bretón-Romero, R., Fetterman, J.L., Gokce, N., Vita, J.A., Hamburg, N.M., 2016. Intravenous Lipid Infusion Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Endothelial Cells and Blood Mononuclear Cells of Healthy Adults. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002574. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002574>
- Tamura, M., Hazeki, O., Nioka, S., Chance, B., 1989. In vivo study of tissue oxygen metabolism using optical and nuclear magnetic resonance spectroscopies. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 813–834. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.51.030189.004121>
- Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., Spyrou, G., Yodoi, J., 2002. Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J.* 21, 1695–1703. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1695>
- Tang, G., Wu, L., Liang, W., Wang, R., 2005. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 68, 1757–1764. <https://doi.org/10.1124/mol.105.017467>
- Tang, X., Luo, Y.-X., Chen, H.-Z., Liu, D.-P., 2014. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front. Physiol.* 5, 175. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00175>
- Tarhan, F., Kuyumcuoğlu, U., Kolsuz, A., Özgül, A., Cangüven, O., 1997. Cavernal oxygen tension in the patients with erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 9, 149–153. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3900270>
- Terao, S., Yilmaz, G., Stokes, K.Y., Ishikawa, M., Kawase, T., Granger, D.N., 2008. Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice. *Stroke* 39, 943–950. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.494542>
- Testai, L., Marino, A., Piano, I., Brancaleone, V., Tomita, K., Di Cesare Mannelli, L., Martelli, A., Citi, V., Breschi, M.C., Levi, R., Gargini, C., Bucci, M., Cirino, G., Ghelardini, C., Calderone, V., 2016. The novel H₂S-donor 4-carboxyphenyl isothiocyanate promotes cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury through activation of mitoK_{ATP} channels and reduction of oxidative stress. *Pharmacol. Res.* 113, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.006>
- Testai, L., Rapposelli, S., Calderone, V., 2007. Cardiac ATP-sensitive potassium channels: a potential target for an anti-ischaemic pharmacological strategy.

Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 5, 79–90.
<https://doi.org/10.2174/187152507779315831>

- Thomas, A., Woodard, C., Rovner, E.S., Wein, A.J., 2003. Urologic complications of nonurologic medications. *Urol. Clin. North Am.* 30, 123–131. [https://doi.org/10.1016/s0094-0143\(02\)00111-8](https://doi.org/10.1016/s0094-0143(02)00111-8)
- Thomas, D.D., Liu, X., Kantrow, S.P., Lancaster, J.R., 2001. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 355–360. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.355>
- Thomas, S.R., Witting, P.K., Drummond, G.R., 2008. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1713–1765. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2027>
- Thompson, I.M., Tangen, C.M., Goodman, P.J., Probstfield, J.L., Moinpour, C.M., Coltman, C.A., 2005. Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. *JAMA* 294, 2996–3002. <https://doi.org/10.1001/jama.294.23.2996>
- Timimi, F.K., Ting, H.H., Haley, E.A., Roddy, M.A., Ganz, P., Creager, M.A., 1998. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 552–557. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(97\)00536-6](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(97)00536-6)
- Titus, A., Marappa-Ganeshan, R., 2024. Physiology, Endothelin, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Toda, N., Ayajiki, K., Okamura, T., 2005. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol. Ther.* 106, 233–266. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.011>
- Toombs, C.F., Moore, T.L., Shebuski, R.J., 1993. Limitation of infarct size in the rabbit by ischaemic preconditioning is reversible with glibenclamide. *Cardiovasc. Res.* 27, 617–622. <https://doi.org/10.1093/cvr/27.4.617>
- Touyz, R.M., Briones, A.M., 2011. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 34, 5–14. <https://doi.org/10.1038/hr.2010.201>
- Traish, A.M., Goldstein, I., Kim, N.N., 2007. Testosterone and Erectile Function: From Basic Research to a New Clinical Paradigm for Managing Men with Androgen Insufficiency and Erectile Dysfunction. *Eur. Urol.* 52, 54–70. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.02.034>
- Traish, A.M., Netsuwan, N., Daley, J., Padman-Nathan, H., Goldstein, I., Saenz de Tejada, Inigo., 1995. A Heterogeneous Population of Alpha sub 1 Adrenergic Receptors Mediates Contraction of Human Corpus Cavernosum Smooth Muscle to Norepinephrine. *J. Urol.* 153, 222–227. <https://doi.org/10.1097/00005392-199501000-00081>
- Traish, A.M., Park, K., Dhir, V., Kim, N.N., Moreland, R.B., Goldstein, I., 1999. Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology* 140, 1861–1868. <https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6655>
- Tran, Q.K., Ohashi, K., Watanabe, H., 2000. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 48, 13–22. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00172-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00172-3)

- Tripathi, Y.B., Pandey, V., 2012. Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses. *Front. Immunol.* 3, 240. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00240>
- Trujillo, M., Mauri, P., Benazzi, L., Comini, M., De Palma, A., Flohé, L., Radi, R., Stehr, M., Singh, M., Ursini, F., Jaeger, T., 2006. The mycobacterial thioredoxin peroxidase can act as a one-cysteine peroxiredoxin. *J. Biol. Chem.* 281, 20555–20566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601008200>
- Tu, B.P., Weissman, J.S., 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.* 164, 341–346. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311055>
- Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.-A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., Vidal, H., Rieusset, J., 2014. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 63, 3279–3294. <https://doi.org/10.2337/db13-1751>
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Uchiyama, Y., Otani, H., Wakeno, M., Okada, T., Uchiyama, T., Sumida, T., Kido, M., Imamura, H., Nakao, S., Shingu, K., 2003. Role of mitochondrial KATP channels and protein kinase C in ischaemic preconditioning. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30, 426–436. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03853.x>
- Ungvari, Z., Labinskyy, N., Gupte, S., Chander, P.N., Edwards, J.G., Csiszar, A., 2008. Dysregulation of mitochondrial biogenesis in vascular endothelial and smooth muscle cells of aged rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 294, H2121–H2128. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00012.2008>
- Ungvari, Z., Orosz, Z., Labinskyy, N., Rivera, A., Xiangmin, Z., Smith, K., Csiszar, A., 2007. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H37–47. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01346.2006>
- Uotila, P., Vargas, R., Wroblewska, B., d'Alarcao, M., Matsuda, S.P., Corey, E.J., Cunard, C.M., Ramwell, P.W., 1987. Relaxing effects of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid on rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242, 945–949.
- Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., Monsalve, M., 2005. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 66, 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.026>
- van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., Lüscher, T.F., 2000. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.* 192, 1731–1744. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>
- van der Vlies, D., Makkinje, M., Jansens, A., Braakman, I., Verkleij, A.J., Wirtz, K.W.A., Post, J.A., 2003. Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein

maturation. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 381–387.
<https://doi.org/10.1089/152308603768295113>

- Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Feletou, M., Tang, E.H.C., 2017. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* 219, 22–96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>
- Vannuvel, K., Renard, P., Raes, M., Arnould, T., 2013. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J. Cell. Physiol.* 228, 1802–1818. <https://doi.org/10.1002/jcp.24360>
- Veenema, R.J., Gursel, E.O., Lattimer, J.K., 1977. Radical retropubic prostatectomy for cancer: a 20-year experience. *J. Urol.* 117, 330–331. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)58449-9](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)58449-9)
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc. Res.* 79, 208–217. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn098>
- Verfaillie, T., Garg, A.D., Agostinis, P., 2013. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer Lett., Apoptosis Targeting Drugs in Cancer* 332, 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.07.016>
- Vernet, D., Cai, L., Garban, H., Babbitt, M.L., Murray, F.T., Rajfer, J., Gonzalez-Cadavid, N.F., 1995. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology* 136, 5709–5717. <https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588327>
- Villalba, N., Contreras, C., Hernández, M., García-Sacristán, A., Prieto, D., 2011. Impaired Ca²⁺ handling in penile arteries from prediabetic Zucker rats: involvement of Rho kinase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H2044-2053. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01204.2010>
- Villalba, N., Martínez, P., Briones, A.M., Sánchez, A., Salaíces, M., García-Sacristán, A., Hernández, M., Benedito, S., Prieto, D., 2009. Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H696-707. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01308.2008>
- Villalba, N., Stankevicius, E., Garcia-Sacristán, A., Simonsen, U., Prieto, D., 2007. Contribution of both Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization to the α 1-adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H1157-1169. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01034.2006>
- Villalba, N., Stankevicius, E., Simonsen, U., Prieto, D., 2008. Rho kinase is involved in Ca²⁺ entry of rat penile small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H1923-1932. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01221.2007>
- Villalobos-Labra, R., Subiabre, M., Toledo, F., Pardo, F., Sobrevia, L., 2019. Endoplasmic reticulum stress and development of insulin resistance in adipose, skeletal, liver, and foetoplacental tissue in diabetes. *Mol. Aspects Med.* 66, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.11.001>

- Virag, R., Bouilly, P., Frydman, D., 1985. Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 440 impotent men. *Lancet Lond. Engl.* 1, 181–184. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(85\)92023-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)92023-9)
- Vizzard, M.A., Erdman, S.L., Förstermann, U., de Groat, W.C., 1994. Differential distribution of nitric oxide synthase in neural pathways to the urogenital organs (urethra, penis, urinary bladder) of the rat. *Brain Res.* 646, 279–291. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90090-6)
- Vlachopoulos, C., Aznaouridis, K., Ioakeimidis, N., Rokkas, K., Vasiliadou, C., Alexopoulos, N., Stefanadi, E., Askitis, A., Stefanadis, C., 2006. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 27, 2640–2648. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl341>
- Vlachopoulos, C., Ioakeimidis, N., Terentes-Printzios, D., Aznaouridis, K., Rokkas, K., Aggelis, A., Synodinos, A., Lazaros, G., Stefanadis, C., 2013a. Plasma Total Testosterone and Incident Cardiovascular Events in Hypertensive Patients. *Am. J. Hypertens.* 26, 373–381. <https://doi.org/10.1093/ajh/hps056>
- Vlachopoulos, C., Ioakeimidis, N., Terentes-Printzios, D., Stefanadis, C., 2008. The triad: erectile dysfunction--endothelial dysfunction--cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* 14, 3700–3714. <https://doi.org/10.2174/138161208786898716>
- Vlachopoulos, C., Jackson, G., Stefanadis, C., Montorsi, P., 2013b. Erectile dysfunction in the cardiovascular patient. *Eur. Heart J.* 34, 2034–2046. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh112>
- Vlachopoulos, C., Rokkas, K., Ioakeimidis, N., Stefanadis, C., 2007. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: common links. *Eur. Urol.* 52, 1590–1600. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.08.004>
- Vozmediano Chicharro, R., Bonilla Parrilla, R., 2010. Recuerdo y actualización de las bases anatómicas del pene. *Arch. Esp. Urol. Ed Impresa* 63, 575–580.
- Walewska, A., Szewczyk, A., Koprowski, P., 2018. Gas Signaling Molecules and Mitochondrial Potassium Channels. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3227. <https://doi.org/10.3390/ijms19103227>
- Walsh, P.C., Donker, P.J., 1982. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J. Urol.* 128, 492–497. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)53012-8](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)53012-8)
- Walton, A., Usta, M., Wong, M., Hellstrom, W., 2021. Metabolic Syndrome and Erectile Dysfunction. *OBM Integr. Complement. Med.* 6, 1–29. <https://doi.org/10.21926/obm.icm.2104042>
- Wang, X.Z., Ron, D., 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272, 1347–1349. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1347>
- Wang, Y.I., Bettaieb, A., Sun, C., DeVerse, J.S., Radecke, C.E., Mathew, S., Edwards, C.M., Haj, F.G., Passerini, A.G., Simon, S.I., 2013. Triglyceride-rich lipoprotein modulates endothelial vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 expression via

differential regulation of endoplasmic reticulum stress. *PloS One* 8, e78322.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078322>

- Weinstein, M., Roberts, M., 1977. Sexual potency following surgery for rectal carcinoma. A followup of 44 patients. *Ann. Surg.* 185, 295–300.
<https://doi.org/10.1097/00000658-197703000-00008>
- Weintraub, N.L., Joshi, S.N., Branch, C.A., Stephenson, A.H., Sprague, R.S., Lonigro, A.J., 1994. Relaxation of porcine coronary artery to bradykinin. Role of arachidonic acid. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 23, 976–981.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.23.6.976>
- Wenzel, P., Mollnau, H., Oelze, M., Schulz, E., Wickramanayake, J.M.D., Müller, J., Schuhmacher, S., Hortmann, M., Baldus, S., Gori, T., Brandes, R.P., Münzel, T., Daiber, A., 2008. First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1435–1447.
<https://doi.org/10.1089/ars.2007.1969>
- Wermuth, L., Stenager, E., 1992. Sexual aspects of Parkinson's disease. *Semin. Neurol.* 12, 125–127. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1041166>
- Wespes, E., 2001. Testosterone and penile erection. *Aging Male* 4, 130–133.
<https://doi.org/10.1080/tam.4.3.130.133>
- Widder, J.D., Fraccarollo, D., Galuppo, P., Hansen, J.M., Jones, D.P., Ertl, G., Bauersachs, J., 2009. Attenuation of Angiotensin II-induced Vascular Dysfunction and Hypertension by Overexpression of Thioredoxin-2. *Hypertension* 54, 338–344.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.127928>
- Widlansky, M.E., Gutterman, D.D., 2011a. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1517–1530.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3642>
- Widlansky, M.E., Gutterman, D.D., 2011b. Regulation of Endothelial Function by Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1517.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3642>
- Widlansky, M.E., Hill, R.B., 2018. Mitochondrial regulation of diabetic vascular disease: an emerging opportunity. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 202, 83–98.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.015>
- Williams, D.L., Jones, K.L., Colton, C.D., Nutt, R.F., 1991. Identification of high affinity endothelin-1 receptor subtypes in human tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 475–480. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)81089-7](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)81089-7)
- Williams, S.B., Goldfine, A.B., Timimi, F.K., Ting, H.H., Roddy, M.A., Simonson, D.C., Creager, M.A., 1998. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 97, 1695–1701.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.97.17.1695>
- Wingard, C., Fulton, D., Husain, S., 2007. Altered Penile Vascular Reactivity andErection in the Zucker Obese-Diabetic Rat. *J. Sex. Med.* 4, 348–363.
<https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2007.00439.x>

- Wingard, C.J., Husain, S., Williams, J., James, S., 2003. RhoA-Rho kinase mediates synergistic ET-1 and phenylephrine contraction of rat corpus cavernosum. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R1145-1152. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00329.2003>
- Wingard, C.J., Moukdar, F., Prasad, R.Y., Cathey, B.L., Wilkinson, L., 2009. Reversal of voltage-dependent erectile responses in the Zucker obese-diabetic rat by rosuvastatin-altered RhoA/Rho-kinase signaling. *J. Sex. Med.* 6 Suppl 3, 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01184.x>
- Wispé, J.R., Clark, J.C., Burhans, M.S., Kropp, K.E., Korfhagen, T.R., Whitsett, J.A., 1989. Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta* 994, 30–36. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90058-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90058-7)
- Wojtovich, A.P., Brookes, P.S., 2008. The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: implications for ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.025>
- Wolff, F.W., Parmley, W.W., 1963. Actiological factors in benzothiadiazine hyperglycemia. *Lancet Lond. Engl.* 2, 69. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(63\)90066-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(63)90066-7)
- Wong, R., Steenbergen, C., Murphy, E., 2012. Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 810, 235–242. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_15
- Wu, M., Pritchard, K.A., Kaminski, P.M., Fayngersh, R.P., Hintze, T.H., Wolin, M.S., 1994. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* 266, H2108-2113. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.5.H2108>
- Wu, M.-Y., Li, C.-J., Hou, M.-F., Chu, P.-Y., 2017. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2034. <https://doi.org/10.3390/ijms18102034>
- Wu, R.-F., Ma, Z., Liu, Z., Terada, L.S., 2010. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3553–3568. <https://doi.org/10.1128/MCB.01445-09>
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M., 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115–124. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
- Xi, Q., Cheranov, S.Y., Jaggar, J.H., 2005a. Mitochondria-derived reactive oxygen species dilate cerebral arteries by activating Ca²⁺ sparks. *Circ. Res.* 97, 354–362. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000177669.29525.78>
- Xi, Q., Cheranov, S.Y., Jaggar, J.H., 2005b. Mitochondria-derived reactive oxygen species dilate cerebral arteries by activating Ca²⁺ sparks. *Circ. Res.* 97, 354–362. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000177669.29525.78>

- Xian, H., Liou, Y.-C., 2021. Functions of outer mitochondrial membrane proteins: mediating the crosstalk between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Cell Death Differ.* 28, 827–842. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00657-z>
- Xie, X., Zhao, R., Shen, G.X., 2012. Impact of cyanidin-3-glucoside on glycated LDL-induced NADPH oxidase activation, mitochondrial dysfunction and cell viability in cultured vascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 15867–15880. <https://doi.org/10.3390/ijms131215867>
- Yang, Y.-M., Huang, A., Kaley, G., Sun, D., 2009. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1829-1836. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00230.2009>
- Yeager, E.S., Van Heerden, J.A., 1980. Sexual dysfunction following proctocolectomy and abdominoperineal resection. *Ann. Surg.* 191, 169–170. <https://doi.org/10.1097/00000658-198002000-00007>
- Yin, F., Boveris, A., Cadenas, E., 2014. Mitochondrial Energy Metabolism and Redox Signaling in Brain Aging and Neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 353–371. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4774>
- Ying, Z., Jin, L., Palmer, T., Webb, R.C., 2006. Angiotensin II up-regulates the leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF), a regulator of G protein signaling domain-containing RhoGEF, in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 69, 932–940. <https://doi.org/10.1124/mol.105.017830>
- Yokoyama, S., Nakagawa, I., Ogawa, Y., Morisaki, Y., Motoyama, Y., Park, Y.S., Saito, Y., Nakase, H., 2019. Ischemic postconditioning prevents surge of presynaptic glutamate release by activating mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the mouse hippocampus. *PLoS ONE* 14, e0215104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215104>
- Young, C.N., 2017. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of hypertension. *Exp. Physiol.* 102, 869–884. <https://doi.org/10.1113/EP086274>
- Yu, T., Robotham, J.L., Yoon, Y., 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2653–2658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103>
- Zavadskis, S., Shiganyan, A., Müllebner, A., Oesterreicher, J., Holnthoner, W., Duvigneau, J.C., Kozlov, A.V., 2024. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Vasodilation in Liver Vessels That Is Not Mediated by Unfolded Protein Response. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 3865. <https://doi.org/10.3390/ijms25073865>
- Zeeshan, H.M.A., Lee, G.H., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2016. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>
- Zeng, L., Zampetaki, A., Margariti, A., Pepe, A.E., Alam, S., Martin, D., Xiao, Q., Wang, W., Jin, Z.-G., Cockerill, G., Mori, K., Li, Y.-S.J., Hu, Y., Chien, S., Xu, Q., 2009. Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8326–8331. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903197106>

- Zhang, D.X., Borbouse, L., Gebremedhin, D., Mendoza, S.A., Zinkevich, N.S., Li, R., Gutterman, D.D., 2012. H₂O₂-Induced Dilation in Human Coronary Arterioles: Role of Protein Kinase G Dimerization and Large-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Activation. *Circ. Res.* 110, 471–480. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258871>
- Zhang, D.X., Chen, Y.F., Campbell, W.B., Zou, A.P., Gross, G.J., Li, P.L., 2001. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ. Res.* 89, 1177–1183. <https://doi.org/10.1161/hh2401.101752>
- Zhang, D.X., Gutterman, D.D., 2007. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H2023–2031. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01283.2006>
- Zhang, H., Luo, Y., Zhang, W., He, Y., Dai, S., Zhang, R., Huang, Y., Bernatchez, P., Giordano, F.J., Shadel, G., Sessa, W.C., Min, W., 2007. Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin improves endothelial cell function and reduces atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 170, 1108–1120. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060960>
- Zhang, I.X., Raghavan, M., Satin, L.S., 2020. The Endoplasmic Reticulum and Calcium Homeostasis in Pancreatic Beta Cells. *Endocrinology* 161, bqz028. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqz028>
- Zhang, K., Kaufman, R.J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455–462. <https://doi.org/10.1038/nature07203>
- Zhang, R., Jiang, M., Zhang, J., Qiu, Y., Li, D., Li, S., Liu, J., Liu, C., Fang, Z., Cao, F., 2020. Regulation of the cerebrovascular smooth muscle cell phenotype by mitochondrial oxidative injury and endoplasmic reticulum stress in simulated microgravity rats via the PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866, 165799. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165799>
- Zhang, Y., Chen, J., Ji, H., Xiao, Z.-G., Shen, P., Xu, L.-H., 2018. Protective effects of Danshen injection against erectile dysfunction via suppression of endoplasmic reticulum stress activation in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *BMC Complement. Altern. Med.* 18, 343. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2414-3>
- Zhang, Z., Huang, Q., Zhao, D., Lian, F., Li, X., Qi, W., 2023. The impact of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction on diabetic microvascular complications. *Front. Endocrinol.* 14, 1112363. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1112363>
- Zhao, R., Xie, X., Le, K., Li, W., Moghadasian, M.H., Beta, T., Shen, G.X., 2015. Endoplasmic reticulum stress in diabetic mouse or glycated LDL-treated endothelial cells: protective effect of Saskatoon berry powder and cyanidin glycos. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1248–1253. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.015>
- Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., Yu, Z.-B., 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* 44, 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>

Zhou, A.-X., Wang, X., Lin, C.S., Han, J., Yong, J., Nadolski, M.J., Borén, J., Kaufman, R.J., Tabas, I., 2015. C/EBP-Homologous Protein (CHOP) in Vascular Smooth Muscle Cells Regulates Their Proliferation in Aortic Explants and Atherosclerotic Lesions. *Circ. Res.* 116, 1736–1743.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305602>

