

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos de las proantocianidinas sobre las  
alteraciones cardíacas producidas por la  
aldosterona en la rata: mecanismos implicados**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Adrián Galiana Rodríguez-Barbero**

DIRECTORES

**Beatriz Martín Fernández**  
**Natalia de las Heras Jiménez**  
**Vicente Lahera Juliá**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA**  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**Efectos de las proantocianidinas sobre las  
alteraciones cardíacas producidas por la  
aldosterona en la rata: mecanismos  
implicados**

**TESIS DOCTORAL**

**Adrián Galiana Rodríguez-Barbero**  
Madrid, 2016







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**Efectos de las proantocianidinas sobre las alteraciones  
cardíacas producidas por la aldosterona en la rata:  
mecanismos implicados**

Memoria presentada por

**Adrián Galiana Rodríguez-Barbero**

para la obtención del grado de Doctor

VºBº Directores:

Dra. Beatriz Martín Fernández

Firma manuscrita de Dra. Beatriz Martín Fernández en tinta negra.

Dra. Natalia de las Heras Jiménez

Firma manuscrita de Dra. Natalia de las Heras Jiménez en tinta azul.

Dr. Vicente Lahera Juliá

Firma manuscrita de Dr. Vicente Lahera Juliá en tinta negra.

Madrid, 2016







**Dña. BEATRIZ MARTÍN FERNÁNDEZ**, Profesora Asociada Doctora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

**Dña. NATALIA DE LAS HERAS JIMENEZ**, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y

**D. VICENTE LAHERA JULIÁ**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que D. Adrián Galiana Rodríguez-Barbero ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: **“Efectos de las proantocianidinas sobre las alteraciones cardíacas producidas por la aldosterona en la rata: mecanismos implicados”**, que ha terminado con el mayor aprovechamiento y se encuentra en condiciones para ser defendida ante un Tribunal. Para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 14 de Noviembre de 2016.

Dra. Beatriz Martín Fernández



Dra. Natalia de las Heras Jiménez



Dr. Vicente Lahera Juliá









## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral es la suma del trabajo y buen hacer de muchas personas que han confiado en mí, me han aconsejado, ayudado, criticado, soportado y corregido mis muchos defectos durante estos años. Por todo ello quiero dar las gracias:

- A mis directores de tesis por el esfuerzo y tiempo invertidos en mi formación, los ánimos, la comprensión y el apoyo recibidos durante toda esta etapa. Me gustaría agradecer muy especialmente a quien ha sido mi guía, Beatriz Martín Fernández, su dedicación, intenso trabajo e infinita paciencia. Sin ella esta tesis no existiría. Estoy muy agradecido a Vicente Lahera y Natalia de las Heras por haberme dado la oportunidad de unirme al equipo de investigación, su supervisión, consejos y por su trato siempre cercano. A todos ellos, muchas gracias por todo lo que me habéis enseñado.
- A mis compañeras del grupo de investigación Merche, Sandra, Belén y Elena, de las que he recibido su ayuda, conocimiento, compañía y muchos ánimos, gracias por todo. Me he sentido muy afortunado de haberos tenido cerca en el día a día de esta importante etapa.
- A todo el departamento de Fisiología de la facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid por su acogida y afecto, especialmente a

Ernesto, María, Raquel y Ricardo, que siempre han estado dispuestos a enseñarme y aconsejarme.

- A Miriam Granado y Sara Amor así como al departamento de Fisiología de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid por haberme acogido, enseñado y tratado con tanta cercanía durante mi estancia en sus laboratorios.
- A la empresa Natac Biotech S.L. y a su director José Carlos Quintela por habernos proporcionado el tratamiento experimental que ha sido objeto de estudio en este trabajo.

Esta tesis también es producto del apoyo incondicional de mis familiares y amigos, que me han aconsejado y acompañado en los momentos buenos y malos a lo largo de todos los años que ha supuesto mi formación académica y personal. Por ello estoy profundamente agradecido a:

- Toda mi familia: Galiana, Rodríguez-Barbero, Simal y Gómez del Pulgar (que no se me quede nadie fuera). Agradezco en especial a mis queridos padres Jesús y Nati su inmenso cariño, educación recibida y ánimos constantes. También por su respeto ante las decisiones (algunas más acertadas y otras menos) que he ido tomando en la vida. Siempre he sentido su apoyo y recibido consejo y ayuda,

sobre todo cuando les he necesitado porque me encontraba sin rumbo fijo. Ejemplos de sacrificio, disciplina, constancia, trabajo y sensatez, un carácter en parte heredado por mis queridos abuelos, a quien quiero recordar y agradecer expresamente su cariño y enseñanzas.

- Mi hermana Teresa, que siempre ha sabido comprenderme, dando los mejores besos y abrazos que solo una hermana mayor con su bondad saben dar cuando uno los necesita. Mi referencia durante la infancia, el ejemplo a seguir y el refugio asegurado de por vida.
- Toda mi familia Romero Vela, sinónimo de unión, lucha, ¡mucho acción! y buen humor practicados a diario pase lo que pase, sean buenos o malos tiempos. Poniendo ladrillos, dando zancadas, y en definitiva, centrándose en el momento, se llegan a construir casas, se logra terminar maratones y se supera cualquier reto; este tipo de lecciones solo se aprenden con la práctica. Siempre dispuestos a enfrentar el siguiente desafío, sigo aprendiendo y asombrándome de la fuerza de voluntad y arrojo de mis queridos Manolo y Pilar, abuela Pilar y Víctor.
- Mis pequeños, Elián, Loïc y Lúa, de los que me siento tan honrado de poder acompañar en sus vidas y aprender de ellos nuevas formas de pensamiento, fresco y puro, sin la contaminación y rigidez propia de mentes que ya empiezan a oxidarse como la mía. Me han enseñado a no tomarme a mí mismo tan en serio y a recuperar el niño que fui.

- Mis queridos amigos y amigas que me han acompañado durante estos primeros años en la ciencia. A Alfonso, Gemma, Salva y Laura, con los que he compartido los inicios e incertidumbres con cerveza y muchas risas. También a Kutu y Adri, que han conseguido lo imposible, remover las bases de mis esquemas y mi conciencia para darme el empujón y salir del círculo por la tangente y empezar a ver las cosas con otra perspectiva. A los Gabrieles, padre e hijo, por tantas y tan buenas conversaciones en estos últimos años y el apoyo recibido. Mis amig@s, siempre en calma, escuchando, opinando sin juzgar y con la sonrisa puesta, todo a la vez, con exquisita sencillez.

Para finalizar, quiero agradecer con especial cariño el apoyo incondicional recibido por mi mejor compañera, que ha depositado una confianza ciega y total hacia mí. Conoce con exactitud mis miedos y me ha enseñado a superarlos. Ella es mi soporte fundamental y mi mayor motivación y alegría. La que ha tenido palabras de ánimo y gestos de cariño profundo durante todos los días desde que he tenido la suerte de conocerla. Me ha dado dos hijos, un hogar y dado el valor para hacer lo más difícil: averiguar qué es lo que realmente uno quiere y no lo que es fácil o ha sido impuesto por los demás o las circunstancias, para después adquirir el compromiso y la determinación de trabajar duro para conseguirlo. A María, mi mujer. Gracias por hacerme completamente feliz.





# ABREVIATURAS

---

<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>11β-HSD2</b>	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
<b>αENaC</b>	Subunidad alfa del canal epitelial de sodio
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AII</b>	Angiotensina II
<b>ALDO</b>	Aldosterona
<b>ANOVA</b>	Test estadístico de análisis de la varianza
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>βENaC</b>	Subunidad beta del canal epitelial de sodio
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración intracelular de calcio
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L
<b>CaMKII</b>	Quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2
<b>CD68</b>	Molécula de diferenciación 68 de macrófagos
<b>CMLV</b>	Células de músculo liso vascular
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
<b>CYP11B2</b>	Aldosterona sintasa
<b>DAG</b>	Diacilglicerol

<b>DHE</b>	Dihidroetidid
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo Dulbeco <i>Eagle</i> modificado
<b>DOCA</b>	Acetato de desoxicorticosterona
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EC</b>	Acoplamiento excitación-contracción
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ENaC</b>	Canal epitelial de sodio
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ESPIRO</b>	Espironolactona
<b>ET</b>	Acoplamiento excitación-transcripción
<b>ET1</b>	Endotelina tipo 1
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FC</b>	Frecuencia cardíaca
<b>FGFb</b>	Factor de crecimiento para fibroblastos básico
<b>γENaC</b>	Subunidad gamma del canal epitelial de sodio
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>H9c2</b>	Línea celular de cardiomiocitos embrionarios de rata
<b>HC</b>	Hipertrofia cardíaca
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>IECA</b>	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

<b>IC</b>	Insuficiencia cardíaca
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IGF1</b>	Factor-1 de crecimiento similar a la insulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>Lpm</b>	Latidos por minuto
<b>MAPK/ERK</b>	Quinasas activadas por mitógenos y señales extracelulares
<b>MCP1</b>	Proteína quimio-atrayente de monocitos tipo 1
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MEF2</b>	Factor estimulante de miocitos tipo 2
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas de matriz extracelular
<b>[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración intracelular de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NADPHox</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa</b>	Bomba de sodio-potasio dependiente de ATP
<b>NCX1</b>	Intercambiador de sodio-calcio tipo 1
<b>Nedd4-2</b>	Precursor neuronal de células en desarrollo regulado a la baja4-2
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas
<b>NFκβ</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B
<b>NHE1</b>	Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa

<b>Nrf2</b>	Factor de transcripción derivado de eritrocitos tipo 2
<b>OPCs</b>	Proantocianidinas oligoméricas
<b>oxCaMKII</b>	Forma oxidada de CaMKII en las metioninas 281 y 282
<b>p22phox</b>	Subunidad p22phox de NADPHox
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBST</b>	Tampón fosfato salino con tween-20
<b>pCaMKII</b>	Forma fosforilada CaMKII en la treonina 286
<b>PDFVI</b>	Presión diastólica final del ventrículo izquierdo
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PNA</b>	Péptido natriurético auricular
<b>pNedd4-2</b>	Forma fosforilada de Nedd4-2 en la serina 436
<b>PPAR</b>	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
<b>PPCs</b>	Proantocianidinas poliméricas
<b>PRC</b>	Peso relativo del corazón
<b>PRO80</b>	Extracto con proantocianidinas al 80% en riqueza
<b>PRO</b>	Proantocianidinas puras
<b>PSVI</b>	Presión sistólica del ventrículo izquierdo

<b>PVDF</b>	Polivinildifluoruro
<b>RM</b>	Receptor de mineralocorticoides
<b>ROMK</b>	Canal de potasio medular exterior renal
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SGK1</b>	Quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1
<b>SOD1</b>	Superóxido dismutasa tipo 1
<b>SRAA</b>	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>Src</b>	Proteína quinasa de sarcoma
<b>TCC</b>	Túbulo colector cortical
<b>TCD</b>	Túbulo contorneado distal
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral tipo alfa









	<i>pág.</i>
<b>1.4</b> Regulación de la secreción de la aldosterona	74
<b>1.4.1</b> Angiotensina II	74
<b>1.4.2</b> Hormona adrenocorticotropa	76
<b>1.4.3</b> Sodio	76
<b>1.4.4</b> Potasio	77
<b>1.4.5</b> Péptido natriurético auricular	78
<b>1.5</b> Degradación de la aldosterona	78
<b>1.6</b> Hiperaldosteronismo	79
<b>1.7</b> Alteraciones cardiovasculares asociadas al exceso de aldosterona	80
<b>2. HIPERTROFIA CARDÍACA</b>	81
<b>2.1</b> Alteraciones estructurales	84
<b>2.1.1</b> Hipertrofia de los cardiomiocitos	85
<b>2.1.2</b> Matriz extracelular y acumulación de colágeno	86
<b>2.2</b> Alteraciones funcionales	88
<b>2.2.1</b> Disfunción sistólica y diastólica	88
<b>2.2.2</b> Insuficiencia cardíaca	89
<b>2.3</b> Mecanismos y factores implicados en el desarrollo de la Hipertrofia cardíaca	92
<b>2.3.1</b> Fibrosis miocárdica	92
<b>2.3.1.1</b> Factor de crecimiento de tejido conectivo, CTGF	94



	<i>pág.</i>
<b>III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>121</b>
1. JUSTIFICACIÓN	125
2. HIPÓTESIS	126
3. OBJETIVOS	126
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>131</b>
1. MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL	135
2. PRESIÓN ARTERIAL Y HEMODINÁMICA CARDÍACA	137
2.1 Presión arterial indirecta	137
2.2 Hemodinámica cardíaca	137
3. PESO RELATIVO DEL CORAZÓN	139
4. HISTOLOGÍA CARDÍACA	140
4.1 Contenido de colágeno	140
4.2 Contenido de calcio	141
5. CULTIVOS CELULARES	141
5.1 Mantenimiento de la línea celular	142
5.2 Diseño experimental	142
5.3 Supervivencia celular	144
5.4 Cuantificación de anión superóxido	145
6. EXPRESIÓN PROTEICA	147
6.1 Extracción de proteínas de tejido	147
6.2 Extracción de proteínas de células	147

	<i>pág.</i>
6.3 Cuantificación de proteínas	148
6.4 Electroforesis y transferencia	149
6.5 <i>Western Blot</i>	150
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	152
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>155</b>
1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA HEMODINÁMICA CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA	159
1.1 Presión arterial sistólica y diastólica, PAS y PAD	159
1.2 Hemodinámica cardíaca	160
1.2.1 Frecuencia cardíaca, FC	160
1.2.2 Presión sistólica del ventrículo izquierdo, PSVI	160
1.2.3 Presión diastólica final del ventrículo izquierdo, PDFVI	161
2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA HIPERTROFIA CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA	162
2.1 Peso relativo del corazón, PRC	162
3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA FIBROSIS CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA	163
3.1 Contenido de colágeno	163
3.2 Factor de crecimiento de tejido conectivo, CTGF	164

	<i>pág.</i>
<b>4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA</b>	165
<b>4.1</b> <i>Cluster</i> de diferenciación 68, CD68	165
<b>4.2</b> Factor de necrosis tumoral alfa, TNF $\alpha$	166
<b>4.3</b> Óxido nítrico sintasa inducible, iNOS	167
<b>4.4</b> Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, NADPHox: subunidad p22phox	167
<b>5. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA CARDÍACA DE SGK1, ENAC, NEDD4-2 Y pNEDD4-2 EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA</b>	168
<b>5.1</b> Quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1, SGK1	168
<b>5.2</b> Canal epitelial de sodio, ENaC: subunidades $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$	169
<b>5.3</b> Ubiquitina ligasa Nedd4-2 y su fosforilación, pNedd4-2	171
<b>6. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA CARDÍACA DE LOS TRANSPORTADORES IÓNICOS ROMK, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPASA, NHE1, Ca<sub>v</sub>1.2 Y NCX1, EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA</b>	172
<b>6.1</b> Canal de potasio medular exterior renal, ROMK	172
<b>6.2</b> Bomba de sodio-potasio dependiente de ATP, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa: subunidad $\alpha$ 1	173

	<i>pág.</i>
6.3 Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1, NHE1	173
6.4 Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, Ca <sub>v</sub> 1.2: subunidad α1C	174
6.5 Intercambiador de sodio-calcio tipo 1, NCX1	175
<b>7. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE EL CONTENIDO DE CALCIO CARDÍACO Y LA EXPRESIÓN PROTEICA, FOSFORILACIÓN Y OXIDACIÓN DE LA CAMKII CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA</b>	176
7.1 Contenido de calcio	176
7.2 Quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2, CaMKII, y su fosforilación, pCaMKII y oxidación, ox-CaMKII	178
<b>8. EFECTOS DE LA INCUBACIÓN CON PROANTOCIANIDINAS Y ESPIRONOLACTONA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN CÉLULAS H9C2 ESTIMULADAS CON ALDOSTERONA</b>	181
8.1 Supervivencia celular en células H9c2	181
8.1.1 Estudio dosis-respuesta de aldosterona en células H9c2	181
8.1.2 Efecto de la incubación con proantocianidinas y espironolactona sobre la supervivencia celular en células H9c2 estimuladas con aldosterona	182

	<i>pág.</i>
<p><b>8.2</b> Efecto de la incubación con proantocianidinas y            espironolactona sobre la producción de anión superóxido            en células H9c2 estimuladas con aldosterona</p>	184
<p><b>9.</b> EFECTOS DE LA INCUBACIÓN CON PROANTOCIANIDINAS Y            ESPIRONOLACTONA SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL SGK1            Y LA SUBUNIDAD P22PHOX DE LA NADPHOX EN CÉLULAS H9C2            ESTIMULADAS CON ALDOSTERONA</p>	187
<p><b>9.1</b> Quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1,            SGK1</p>	187
<p><b>9.2</b> Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa,            NADPHox: subunidad p22phox</p>	188
<p><b>VI. DISCUSIÓN</b></p>	<b>191</b>
<p><b>1.</b> EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LAS            ALTERACIONES CARDÍACAS PRODUCIDAS POR LA            ALDOSTERONA EN RATAS</p>	195
<p><b>1.1</b> Presión arterial y hemodinámica cardíaca</p>	195
<p><b>1.2</b> Hipertrofia y fibrosis</p>	197
<p><b>1.3</b> Inflamación y oxidación</p>	199
<p><b>2.</b> EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN            PROTEICA CARDÍACA DE SGK1, ENAC, NEDD4-2 Y pNEDD4-2 EN            RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA</p>	206

	<i>pág.</i>
<b>3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA CARDÍACA DE MEDIADORES RELACIONADOS CON EL TRANSPORTE DE POTASIO, SODIO Y CALCIO EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA</b>	216
<b>3.1</b> Canal de potasio medular exterior renal, ROMK	216
<b>3.2</b> Bomba de sodio-potasio dependiente de ATP, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa: subunidad α1	219
<b>3.3</b> Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1, NHE1	222
<b>3.4</b> Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, Ca <sub>v</sub> 1.2: subunidad α1C	224
<b>3.5</b> Intercambiador de sodio-calcio tipo 1, NCX1	226
<b>3.6</b> Contenido de calcio cardíaco y auto-fosforilación y oxidación de la quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2, CaMKII	231
<b>VII. RESUMEN DE LOS RESULTADOS</b>	<b>239</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>247</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>255</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>325</b>









# Resumen

---







# **1. RESUMEN**

## **INTRODUCCIÓN**

El exceso de aldosterona produce alteraciones cardíacas estructurales y funcionales a través de diversos mecanismos, tales como determinados cambios en la expresión de sus mediadores intracelulares y de transportadores iónicos. Un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación demostró los efectos cardioprotectores de las proantocianidinas en ratas con hiperaldosteronismo. En dicho estudio, el tratamiento con proantocianidinas disminuyó la expresión del SGK1, el principal mediador intracelular de la aldosterona, sugiriéndose así un posible efecto antagonista del receptor de mineralocorticoides. Teniendo en cuenta que el SGK1 modula la acción de ciertos transportadores iónicos en el riñón y en el corazón en respuesta a la aldosterona, y dados los efectos cardíacos de las proantocianidinas mencionados anteriormente, se planteó estudiar los posibles efectos de éstas sobre la expresión de mediadores intracelulares implicados en el transporte iónico de sodio, potasio y calcio en el corazón de ratas con hiperaldosteronismo producido por la administración crónica de aldosterona.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para realizar el estudio se utilizaron 32 ratas Wistar macho distribuidas en 4 grupos (n=8): CONTROL, ratas en condiciones normales; ALDO: ratas que recibieron una inyección subcutánea diaria de 1,5 mg/kg/día de aldosterona más 1% NaCl en el

agua de bebida; PRO80: ratas tratadas con un extracto de arándano rojo al 80% de riqueza en proantocianidinas (5mg/kg/día de extracto el agua de bebida) y ALDO+PRO80: ratas tratadas con aldosterona y proantocianidinas a las dosis mencionadas. El periodo experimental fue de 21 días, al final del cual se anestesió a los animales y se cateterizó el ventrículo izquierdo para medir los siguientes parámetros: presión arterial sistólica y diastólica (PAS, PAD), frecuencia cardíaca (FC), presión sistólica máxima del ventrículo izquierdo (PSVI) y presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI). Tras sacrificar a los animales, se extrajeron los corazones y se valoró el grado de hipertrofia cardíaca calculando el peso relativo del corazón (PRC), y se evaluó el contenido cardíaco de colágeno y de calcio por técnicas histológicas. Asimismo, se determinó la expresión proteica mediante western blot de: marcadores de fibrosis (CTGF), inflamación (TNF $\alpha$ , CD68 e iNOS), oxidación (subunidad p22phox de la NADPH oxidasa), transportadores iónicos ( $\alpha$ ENaC,  $\beta$ ENaC,  $\gamma$ ENaC ROMK, subunidad  $\alpha$ 1 de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, NHE1, NCX1, subunidad  $\alpha$ 1C del Cav1.2), y mediadores implicados en la modulación de los transportadores (SGK1, Nedd4-2 y pNedd4-2, CaMKII, oxCaMKII y pCaMKII). En estudios adicionales, se utilizaron cultivos de células H9c2 procedentes de miocardio embrionario de rata que fueron estimuladas con aldosterona (50nM), y se co-incubaron con proantocianidinas puras (10, 100 o 1000nM) o con el antagonista del receptor de mineralocorticoides, espironolactona (10, 100 o 1000nM) durante 24 horas. En dichas células se valoró la supervivencia celular, la producción de anión superóxido y la expresión proteica por western blot del SGK1 y de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa.

**RESULTADOS**

En el grupo ALDO, los niveles de PAS, PAD, PSVI y PDFVI aumentaron respecto al grupo CONTROL ( $p < 0,05$ ) y disminuyeron en el grupo ALDO+PRO80 en comparación con el grupo ALDO ( $p < 0,05$ ). De igual manera, el PRC, el contenido de colágeno y la expresión proteica del CTGF, CD68, TNF $\alpha$ , iNOS y p22phox en el corazón aumentaron en el grupo ALDO respecto al grupo CONTROL ( $p < 0,05$ ), y disminuyeron en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO ( $p < 0,05$ ). Así mismo, la expresión proteica del SGK1,  $\gamma$ ENaC, Nedd4-2 y los niveles de pNedd4-2 y pNedd4-2/Nedd4-2 aumentaron en el grupo ALDO comparado con el grupo CONTROL ( $p < 0,05$ ) y disminuyeron en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO ( $p < 0,05$ ). En el grupo ALDO aumentó la expresión proteica del ROMK, NHE1, subunidad  $\alpha 1C$  del Ca $_v$ 1.2 y NCX1 comparado con el grupo CONTROL ( $p < 0,05$ ), disminuyendo todas éstas en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, la expresión proteica de la subunidad  $\alpha 1$  de la Na $^+$ /K $^+$  ATPasa disminuyó en el grupo ALDO frente al grupo CONTROL ( $p < 0,05$ ) y aumentó en el grupo ALDO+PRO80 comparado con el grupo ALDO ( $p < 0,05$ ). La administración de aldosterona aumentó el contenido de calcio cardíaco, así como los niveles de pCaMKII, oxCaMKII, pCaMKII/CaMKII y oxCaMKII/CaMKII respecto al grupo CONTROL ( $p < 0,05$ ), mientras que en el grupo ALDO+PRO80 disminuyeron respecto al grupo ALDO ( $p < 0,05$ ) a excepción de oxCaMKII y oxCaMKII/CaMKII. En células H9c2, la estimulación con aldosterona disminuyó la supervivencia celular y aumentó la producción del anión superóxido y la expresión del SGK1 y p22phox respecto al grupo CONTROL ( $p < 0,05$ ). Las proantocianidinas a dosis de 100 y 1000nM previnieron los efectos producidos por la aldosterona de manera similar a la espirolactona, en comparación al grupo ALDO ( $p < 0,05$ ).

## **CONCLUSIONES**

El tratamiento con proantocianidinas (PRO80) previno los cambios inducidos por la administración de aldosterona sobre la expresión proteica de transportadores y mediadores implicados en el transporte del sodio, potasio y calcio. Este efecto podría estar relacionado con la mejora estructural y funcional observada en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO. Los resultados obtenidos en el presente trabajo junto con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación apoyan que el tratamiento con proantocianidinas podría estar ejerciendo sus efectos beneficiosos a nivel cardíaco por medio del bloqueo del receptor de mineralocorticoides. Por ello cabría proponer las proantocianidinas, además de sus efectos antioxidantes, como alternativa terapéutica natural a los antagonistas del receptor de mineralocorticoides clásicos para la prevención y tratamiento de patologías relacionadas con el exceso de aldosterona.

## **2. SUMMARY**

### **INTRODUCTION**

Aldosterone excess produces structural and functional cardiac alterations through several mechanisms, such as certain changes in the expression of its intracellular cardiac mediators and proteins involved in ion transport. A previous study from our research group demonstrated a cardioprotective effect of proanthocyanidins in rats with experimental hyperaldosteronism. In that study, treatment with proanthocyanidins downregulated the cardiac expression of SGK1 which is considered the main aldosterone intracellular mediator, suggesting a mineralocorticoid receptor antagonism. Since SGK1 modulates several ion transporters in the kidney and in the heart in response to aldosterone, and considering the mentioned beneficial effects of proanthocyanidins, we aimed to study the possible effects of these compounds on protein expression of intracellular mediators involved in sodium, potassium and calcium transport in the heart of rats with hyperaldosteronism induced by chronic administration of aldosterone.

### **METHODS**

The study was conducted in 32 male Wistar rats, distributed in 4 groups (n=8): CONTROL, rats under normal conditions; ALDO: rats receiving a daily subcutaneous injection of 1,5 mg/kg/day of aldosterone plus 1% NaCl in the drinking water; PRO80: rats treated with a red cranberry extract (80% w/w rich, 5 mg/kg/day of extract in the

drinking water) and ALDO+PRO80: rats treated with aldosterone plus proanthocyanidins at the doses indicated. At the end of the 21 days experimental period, animals were anesthetized and left ventricle was catheterized through right carotid artery to measure the following parameters: systolic and diastolic blood pressure from carotid artery (SBP and DBP), heart rate (HR), left ventricle end diastolic pressure (LVEDP) and left ventricle maximal systolic pressure (LVSP). After the sacrifice, heart weight-to-body weight ratio (HW/BW) was calculated as the index of cardiac hypertrophy. Histological cardiac samples were properly stained to measure collagen and calcium content. Expression of the following markers was measured by western blot: fibrosis (CTGF), inflammation (TNF $\alpha$ , CD68 e iNOS) and oxidative stress markers (p22phox subunit of NADPH oxidase), ionic transporters ( $\alpha$ ENaC,  $\beta$ ENaC,  $\gamma$ ENaC ROMK,  $\alpha$ 1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, NHE1, NCX1,  $\alpha$ 1C subunit of Cav1.2), and mediators involved in ion transport modulation (SGK1, Nedd4-2 y pNedd4-2, CaMKII, oxCaMKII y pCaMKII). In additional experiments, cultured rat H9c2 embryonic cardiac cells were stimulated with aldosterone (50nM) and co-incubated with proanthocyanidins (10, 100, 1000nM) or the mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone (10, 100, 1000nM) for 24 hours (n=4). Cell viability, superoxide anion production and protein expression by western blot of SGK1 and p22phox subunit of NADPHox were analyzed.

## **RESULTS**

SBP, DBP, HR, LVEDP, LVSP and HW/BW increased in ALDO group compared with CONTROL group (p<0,05) and decreased in ALDO+PRO80 group compared with ALDO group (p<0,05). Similarly, cardiac collagen content and cardiac protein expression

levels of CTGF, CD68 TNF $\alpha$ , iNOS and p22phox were higher in ALDO compared with CONTROL group ( $p < 0,05$ ) and lower in ALDO+PRO80 compared with ALDO group ( $p < 0,05$ ). In ALDO group, protein expression levels of SGK1,  $\gamma$ ENaC, Nedd4-2 and the pNedd4-2/Nedd4-2 ratio increased compared with CONTROL group ( $p < 0,05$ ) and decreased in ALDO+PRO80 compared with ALDO group ( $p < 0,05$ ). Additionally, protein expression levels of ROMK, NHE1,  $\alpha$ 1C-Ca $_v$ 1.2 and NCX1, cardiac calcium content, pCaMKII, oxCaMKII levels, pCaMKII/CaMKII and oxCaMKII/CaMKII ratios increased in ALDO group compared with CONTROL group ( $p < 0,05$ ) and decreased in ALDO+PRO80 group compared with ALDO group ( $p < 0,05$ ) excepting oxCaMKII and oxCaMKII/CaMKII ratio. Conversely,  $\alpha$ 1-Na $^+$ /K $^+$  ATPase protein levels were lower in ALDO group compared with CONTROL group ( $p < 0,05$ ) and higher in ALDO+PRO80 group compared with ALDO group ( $p < 0,05$ ). There were no changes in protein expression levels of CaMKII between groups. In H9c2 cells, aldosterone stimulation decreased cell viability and enhanced superoxide anion production and protein expression levels of SGK1 and p22phox compared to CONTROL group ( $p < 0,05$ ), while 100 and 1000nM proanthocyanidins or spironolactone prevented all aldosterone-induced effects.

## **CONCLUSIONS**

Treatment with proanthocyanidins (PRO80) prevented changes induced by aldosterone in cardiac protein expression of transporters and mediators involved in sodium, potassium and calcium ion transport. This effect could be related with the cardiac structural and functional improvement observed in ALDO+PRO80 group compared with ALDO group. The results obtained in the study, together with those

previously found, further support the concept that proanthocyanidins could exert their cardiac beneficial effects through MR antagonism. Consequently it could be proposed that, proanthocyanidins, besides their antioxidant properties, could be considered as a natural alternative therapeutical approach of classical MR antagonists for the prevention and treatment of pathologies related with aldosterone excess.







# Introducción

---







## 1. ALDOSTERONA

La aldosterona es una hormona esteroidea perteneciente a la familia de los mineralocorticoides sintetizada en la glándula adrenal (Bollag, 2014). Las glándulas adrenales se hallan situadas en los polos superiores del riñón y en ellas se pueden diferenciar dos zonas, una externa, denominada corteza, y una interna denominada médula.

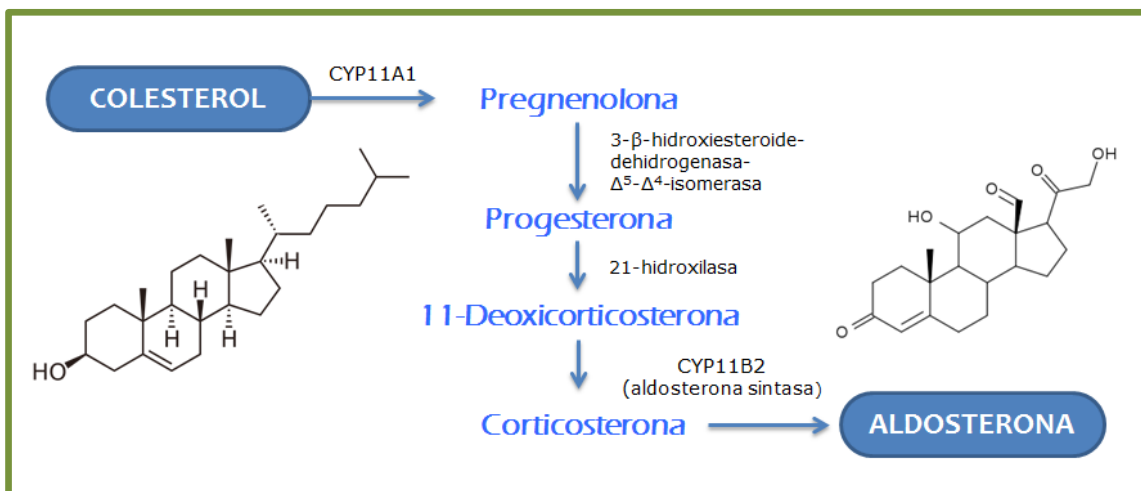
La corteza supone aproximadamente el 85-90% de la masa total de la glándula adrenal y secreta los dos tipos principales de hormonas corticoides, los mineralocorticoides y los glucocorticoides. Desde un punto de vista tanto anatómico como funcional, la corteza se divide en tres zonas: la zona más externa o glomerular, cuyas células están distribuidas en masas irregulares ocupando el 15% de la corteza, y sintetiza la aldosterona, que supone casi el 90% de toda la actividad mineralocorticoide; la zona fascicular o intermedia, cuyas células están dispuestas en forma radial, sintetiza fundamentalmente el cortisol y representa el 75% de la corteza, y por último, la zona más interna y próxima a la médula, la reticular, cuyas células forman una red irregular y sintetiza andrógenos y cortisol, aunque en menos cantidad que el secretado por la zona fascicular (Kay y Kim, 2015). La médula, que ocupa el 10-15% central de la glándula, se relaciona desde el punto de vista funcional con el sistema nervioso simpático (SNS); secreta sus hormonas adrenalina y noradrenalina en respuesta a la estimulación simpática. A su vez, estas hormonas provocan casi los mismos efectos que la estimulación directa de los nervios simpáticos en todas las regiones del cuerpo (Kay y Kim, 2015).

## 1.1 Biosíntesis de la aldosterona

La aldosterona se sintetiza a partir de colesterol transportado en lipoproteínas de baja densidad (LDL), cuya captación en la glándula adrenal está estimulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Las células corticoadrenales tienen en su membrana plasmática receptores específicos para las LDL. La unión de ambos induce la endocitosis y como consecuencia la internalización a la célula de las LDL y de los ésteres de colesterol que van unidos a ellas. Las LDL son degradadas por proteasas y los ésteres de colesterol son transformados en colesterol libre. El colesterol se esterifica de nuevo y se almacena en el citoplasma en las vacuolas lipídicas. El almacenamiento de colesterol en las gotas lipídicas depende de la actividad de dos enzimas, la colesterol-éster-sintetasa y la colesterol esterasa. La estimulación con ACTH aumenta la actividad colesterol esterasa inhibiendo la esterificación de colesterol, lo que hace que aumente el colesterol libre disponible para la biosíntesis de hormonas (Bollag, 2014).

El primer paso, común en la síntesis de todas las hormonas esteroideas, es la conversión del colesterol en pregnenolona catalizado por la enzima mitocondrial CYP11A1, que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria. La enzima CYP11A1 posee un mecanismo de acción muy lento por lo que la unión del colesterol al sitio activo es la reacción limitante en la síntesis de la aldosterona. Un vez que se ha producido la conversión del colesterol a pregnenolona, ésta se convierte, en el retículo endoplásmico mitocondrial, a progesterona y ésta a 11-deoxicorticosterona,

reacciones en las que intervienen las enzimas 3- $\beta$ -hidroxiesteroide-dehidrogenasa- $\Delta^5$   $\Delta^4$ -isomerasa y la 21-hidroxilasa, respectivamente. El último paso de la ruta de la síntesis de la aldosterona está catalizado por la enzima aldosterona sintasa (CYP11B2), que posee tres actividades: 11- $\beta$ -hidroxilasa, 18-hidroxilasa y 18-oxidasa. Dicha enzima cataliza la conversión de 11-deoxicorticosterona a corticosterona y de ésta a aldosterona (figura 1) (Bollag, 2014; Williams, 2005).



**Figura 1.** Síntesis de aldosterona a partir del colesterol y enzimas implicadas.

En 1998, se demostró la existencia de un sistema de producción endógena de aldosterona en el corazón, indicándose lo siguiente: 1) la aldosterona sintasa se expresa en el corazón de rata a unos niveles aproximadamente 500 veces menores que en las glándulas adrenales; 2) la concentración cardíaca de la aldosterona en ratas es 16 nM, 17 veces superior a la plasmática; 3) la producción cardíaca de aldosterona está regulada por los mismos estímulos que en las glándulas adrenales (potasio y angiotensina II (AII)) aunque; 4) están reguladas de forma independiente entre sí, como sugiere el hecho de que los cambios en los niveles de aldosterona cardíacos no estaban relacionados directamente con los niveles plasmáticos de aldosterona (Silvestre *et al.*, 1998).

Además, se ha demostrado que los cardiomiocitos expresan el receptor de la aldosterona (Bolten y Heron, 2006; Funder, 2001; Lombes *et al.*, 1992; Yasuoka *et al.*, 2013). El hecho de que el miocardio sintetice aldosterona y exprese su receptor, ha sugerido la existencia de un sistema de señalización autocrina o paracrina de esta hormona a nivel cardíaco (Horky, 2011; Jaisser y Farman, 2016; Lijnen y Petrov, 2000; Lothar *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2016; Shimoni *et al.*, 2008; White, 2003).

## 1.2 Mecanismo de acción de la aldosterona

Al igual que otras hormonas esteroideas, la aldosterona se une a su receptor en el citoplasma de la célula diana, el receptor de mineralocorticoides (RM). El RM y el receptor de glucocorticoides, pertenecen a una amplia familia de receptores hormonales intracelulares que comparten una estructura general común (más del 90% de homología), pero una baja selectividad por el ligando. Así, el RM puede unirse tanto al glucocorticoide cortisol, como al mineralocorticoide aldosterona, ya que tiene similar afinidad para ambos (Fuller, 2015; Funder, 2009). Sin embargo, y a pesar de que los niveles circulantes de cortisol son de 100 a 1000 veces superiores a los de aldosterona (Funder, 2009), en los tejidos diana de ésta, el cortisol es transformado por la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2) en cortisona, un metabolito inactivo (Fuller, 2015). De esta manera, la 11- $\beta$ HSD2 evita que el cortisol se una al RM, favoreciendo así la unión del mismo únicamente con la aldosterona, aportando así especificidad del ligando por el receptor a nivel de tejido.

En ausencia de ligando, el RM se localiza en el citoplasma asociado a proteínas chaperonas tales como proteínas de choque térmico, hsp90 (Binart *et al.*, 1995; Gekle *et al.*, 2014) y hsp70, proteínas p23 y p48, inmunofilina FKBP-59 y ciclofilina CYP40 (Bruner *et al.*, 1997; Galigniana *et al.*, 2010). La unión del RM a la aldosterona induce un cambio conformacional en el receptor que provoca la disociación de las citadas proteínas, la homodimerización del complejo y su translocación al núcleo celular (Kiilerich *et al.*, 2015; Yang y Young, 2009). Una vez allí se produce el anclaje a los elementos de respuesta hormonal situados en la región reguladora del promotor de los genes diana, activando la transcripción de genes y la consecuente síntesis de proteínas implicadas en el transporte iónico y su regulación (Kiilerich *et al.*, 2015; Yang y Young, 2009)

### 1.3 Acciones de la aldosterona

La aldosterona, ejerce sus acciones a través de mecanismos genómicos y no genómicos (Ashton *et al.*, 2015). Las acciones genómicas dependen de la unión de la aldosterona con el RM. Cuando la aldosterona se une al RM en la célula diana, se forma un complejo activo que modula la síntesis del ARNm de ciertas proteínas que median el transporte iónico. Debido a que las acciones genómicas requieren la síntesis de nuevas proteínas, su desarrollo es lento (de 60 a 90 minutos) (Ashton *et al.*, 2015). Por otro lado, las acciones no genómicas no necesitan la transcripción de un gen, ni por tanto la síntesis de nuevas proteínas, actuando a través de la activación de vías de señalización intracelular y de sistemas de segundos mensajeros; por tanto, tienen lugar

de manera rápida, en segundos o pocos minutos (Ashton *et al.*, 2015; Dooley *et al.*, 2012).

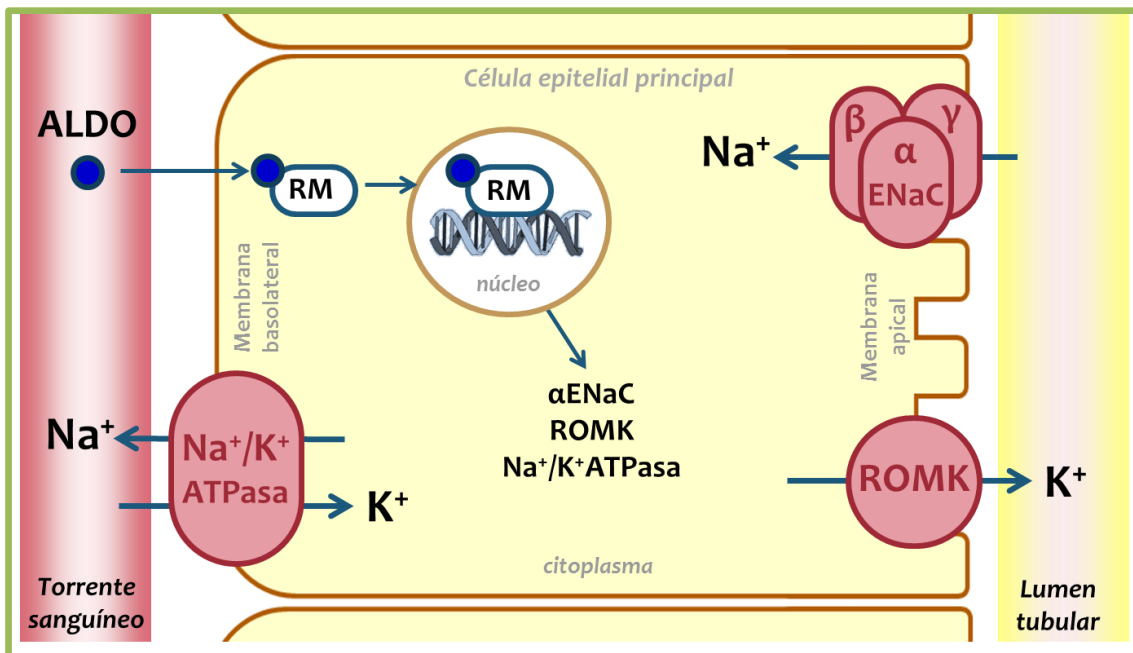
### 1.3.1 Acciones genómicas de la aldosterona

El mecanismo clásico de acción genómica de la aldosterona implica la síntesis de proteínas mediadoras y efectoras involucradas en el manejo iónico a través de la activación del RM; un mecanismo ampliamente estudiado a nivel renal (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2006; Bhandari, 2012; Brem *et al.*, 2011; Namsolleck y Unger, 2014; Poulsen *et al.*, 2016; Quinn *et al.*, 2014; Welling, 2013), que sin embargo no ha sido investigado en profundidad en otros órganos diana de la aldosterona como el corazón (Cannavo *et al.*, 2016), donde el mantenimiento de la homeostasis iónica y su regulación son clave para su correcto funcionamiento.

Las proteínas mediadoras de las acciones de la aldosterona tienen una acción estimulante sobre las proteínas efectoras, aumentando su actividad. Entre las proteínas más importantes mediadoras de las acciones genómicas de la aldosterona, se encuentra la quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1 (SGK1) (Martín-Fernández *et al.*, 2014b), y entre las proteínas efectoras clásicas, destacan el canal epitelial de sodio (ENaC) (Wagner *et al.*, 2006), el canal de potasio medular exterior renal (ROMK) y la bomba de sodio-potasio dependiente de ATP ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa) (Preston y Wilson, 2012; Rossier *et al.*, 2015; Schrier *et al.*, 2010).

El mecanismo clásico de acción genómica de la aldosterona ha sido estudiado fundamentalmente en el riñón. La aldosterona induce la absorción renal de sodio y la excreción de potasio, aumentando así la concentración de sodio en sangre o natremia y disminuyendo la de potasio o potasemia (Preston y Wilson, 2012). En las células epiteliales del túbulo contorneado distal (TCD) y las células principales del túbulo colector cortical (TCC), el ENaC y el canal ROMK se sitúan en la membrana apical, mientras que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa se sitúa en la membrana basolateral (figura 2). El transporte iónico en dichas células comprende el movimiento de sodio desde el lumen tubular hacia el interior de la célula a través del ENaC. A su vez, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa permite la salida activa de sodio hacia el fluido intersticial y el torrente sanguíneo, a la vez que retira potasio del mismo, para introducirlo en la célula epitelial. Finalmente, el canal ROMK facilita la salida pasiva de potasio hacia el lumen tubular (Preston y Wilson, 2012) (figura 2).

Sin embargo, más allá de la acción clásica de la aldosterona a nivel renal, en los últimos años se ha demostrado que, al igual que en el riñón, la aldosterona también induce la expresión del SGK1 en el corazón (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a).



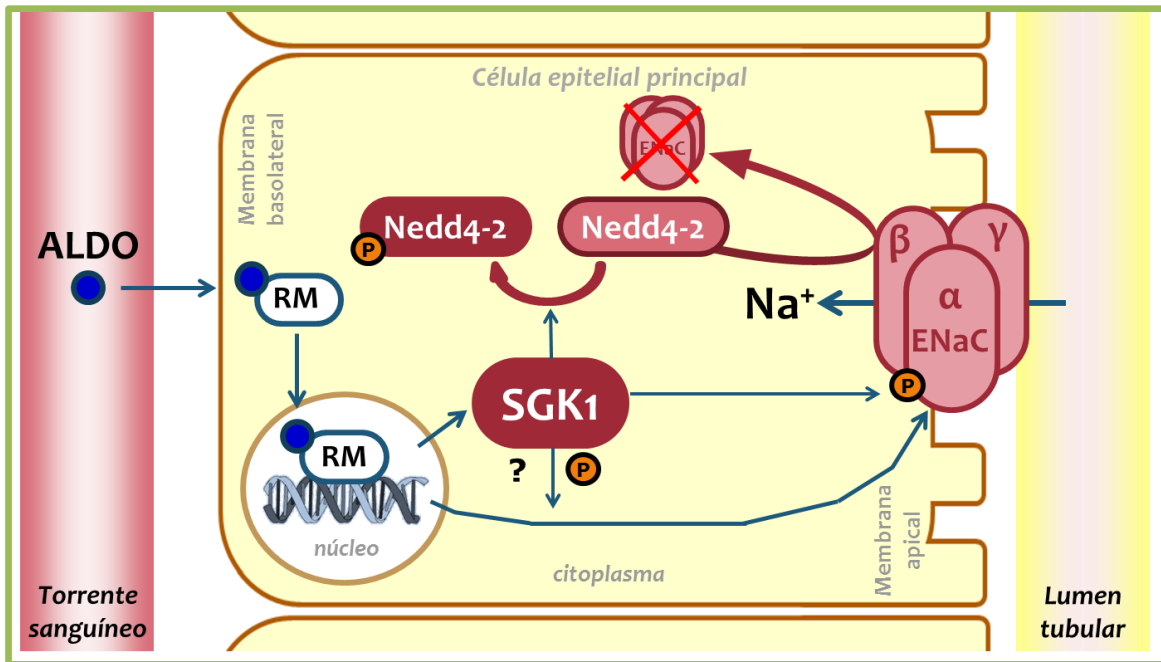
**Figura 2.** Principales efectores de la acción genómica de la aldosterona implicados en la absorción de sodio y la excreción de potasio a nivel renal, en una célula epitelial principal del túbulo colector cortical. ALDO, aldosterona; RM, receptor de mineralocorticoides; ENaC, canal epitelial de sodio; ROMK, canal de potasio medular exterior renal; Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, bomba sodio-potasio dependiente de ATP.

### 1.3.1.1 Quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1, SGK1

El SGK fue identificado inicialmente como una enzima serina-treonina quinasa inducida de manera rápida por los glucocorticoides (Firestone *et al.*, 2003). Se han descrito tres isoformas (SGK1, SGK2 y SGK3) (Lang *et al.*, 2006; Martín-Fernández *et al.*, 2014b), compartiendo el SGK2 y el SGK3 el 80% de la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico del SGK1 (Kobayashi *et al.*, 1999). En mamíferos, tanto SGK1 como SGK3 se expresan en todos los tejidos (esta última en el estado embrionario principalmente), mientras que la expresión del SGK2 es más abundante en tejidos epiteliales incluyendo riñón, hígado y páncreas (Lang *et al.*, 2006).

La expresión del SGK1 es dependiente de la activación del RM, siendo una proteína mediadora clave de las acciones de la aldosterona, ya que tiene la propiedad de aumentar la actividad, mediante fosforilación de proteínas muy importantes en el manejo de sodio y potasio, como son los canales ENaC y ROMK, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y el intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1 (NHE1) (Lang *et al.*, 2006; Martín-Fernández *et al.*, 2014b; Voelkl *et al.*, 2013; Yoo *et al.*, 2003).

En el riñón, el SGK1 aumenta el número de canales ENaC en la superficie de la membrana citoplasmática de las células epiteliales tubulares de manera indirecta, a través de la inactivación por fosforilación en la serina 436 de la ubiquitina ligasa E3 precursor neuronal de células en desarrollo regulado a la baja 4-2 (Nedd4-2) (Lang *et al.*, 2014). El Nedd4-2 ubiquitina las subunidades del ENaC en la cara citosólica de cada una de ellas en los llamados motivos PY (regiones estructurales ricas en prolina), promoviendo su endocitosis y degradación en el proteosoma (Kamynina y Staub, 2002; Lang *et al.*, 2014). Así, el Nedd4-2 es un regulador negativo del ENaC, ya que promueve su degradación, mientras que el SGK1 ha demostrado ser un regulador positivo del canal, ya que puede aumentar de manera directa su actividad mediante la fosforilación del canal, promoviendo además un aumento del número de canales en la membrana, activando la transcripción de sus genes (aunque aún no se ha descubierto mediante qué mecanismo), y de manera indirecta desactivando al Nedd4-2 por fosforilación (figura 3) (Boyd y Naray-Fejes-Toth, 2005; Konstas *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Regulación del ENaC mediante el factor SGK1 y la ubiquitina ligasa Nedd4-2 en una célula epitelial principal del túbulo colector cortical. ALDO, aldosterona; RM, receptor de mineralocorticoides; SGK1, quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1; Nedd4-2, ubiquitina ligasa E3 precursor neuronal de células en desarrollo regulado a la baja 4-2; ENaC, canal epitelial de sodio; P, fosforilación; ?, factores desconocidos.

Se ha demostrado que la aldosterona induce la expresión del SGK1 no solo en el riñón (tejido donde ha sido estudiada principalmente), sino también en el corazón (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a; Martin-Fernandez *et al.*, 2014b). Este hecho ha sido relacionado con las alteraciones cardíacas producidas por el exceso de aldosterona, entre las que se incluye el desajuste en la homeostasis iónica cardíaca (Martin-Fernandez *et al.*, 2009; Martin-Fernandez *et al.*, 2014b); un proceso en el cual estaría implicado el SGK1 dada su importante acción reguladora sobre los canales iónicos.

### 1.3.1.2 Canal epitelial de sodio, ENaC

El ENaC es el canal más importante implicado en la reabsorción de sodio en el riñón (Pearce *et al.*, 2015). Estructuralmente está formado por un complejo proteico heteromultimérico compuesto por tres subunidades homólogas, llamadas alfa ( $\alpha$ ENaC), beta ( $\beta$ ENaC) y gamma ( $\gamma$ ENaC), que está intercalado en la membrana celular (Rossier, 2014). La subunidad  $\alpha$  es crítica para la funcionalidad del canal, mientras que las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  estabilizan el complejo proteico, aumentando su actividad (Shehata, 2010).

La expresión basal del ENaC es particularmente alta en el riñón, pulmón y colon, tejidos donde ha sido estudiado tradicionalmente, sin embargo, también se ha demostrado su expresión en tejidos no epiteliales (Brouard *et al.*, 1999; Shakibaei y Mobasheri, 2003). La aldosterona, una vez unida al RM, activa directamente la transcripción de una u otra subunidad dependiendo del tejido diana; así por ejemplo, en el riñón, la subunidad que más aumenta su expresión mediante este mecanismo, es la  $\alpha$  (Masilamani *et al.*, 1999) (figura 3), mientras que en el colon distal, la aldosterona induce una mayor expresión de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  (Garty, 2000). Además, la aldosterona, a través del aumento de la expresión del SGK1, estimula la actividad de la subunidad  $\alpha$  por medio de fosforilación dependiente del SGK1, y adicionalmente, activa la expresión de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  mediante un mecanismo de transcripción que estaría regulado por el SGK1 y que aún no ha sido caracterizado completamente (Boyd y Naray-Fejes-Toth, 2005; Lang *et al.*, 2006).

### 1.3.1.3 Canal de potasio medular exterior renal, ROMK

En las células epiteliales del TCC (también denominadas células principales), la salida de potasio hacia el lumen tubular se produce por medio de la proteína integral de membrana ROMK (Welling y Ho, 2009) (figura 2). El ROMK es considerado el canal más importante implicado en la excreción renal de potasio (Palmer, 2015) y su expresión está estimulada, entre otros factores, por la aldosterona (Beesley *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2006). Además de en el riñón, el ROMK se expresa también en el corazón, tanto en las aurículas como en los ventrículos, así como en el músculo esquelético, páncreas, pulmón, placenta, cerebelo, glía, retina y cerebro (Spector *et al.*, 2008). Así mismo, y al igual que sucede con el ENaC, el SGK1 también estimula la actividad del canal ROMK por medio de fosforilación (Lang *et al.*, 2006).

También llamado Kir1.1 (*inwardly rectifying potassium channel member 1*), el canal ROMK, al igual que el resto de canales de la familia Kir estudiados tradicionalmente en el corazón, solo permite la salida de potasio cuando la célula se encuentra al final de la fase de repolarización o está polarizada (en reposo), permaneciendo cerrados durante la fase de despolarización y de meseta (Han *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). De esta manera, los canales Kir cardíacos contribuyen a recuperar y mantener el potencial de membrana de reposo (Dhamoon y Jalife, 2005; Han *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

#### 1.3.1.4 Bomba de sodio-potasio dependiente de ATP, $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa es una proteína transmembrana heterodimérica compuesta por dos subunidades  $\alpha$  (función catalítica) y dos subunidades  $\beta$  (estabilizan a las subunidades  $\alpha$ ) que, mediante la hidrólisis de una molécula de ATP, intercambia 3 iones sodio, que son expulsados fuera de la célula, por 2 iones potasio, que son introducidos en el citoplasma (Kaplan, 2002; Xie *et al.*, 2013a) (figura 2). En el riñón, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa está implicada en la reabsorción de sodio a lo largo de prácticamente toda la nefrona (Katz, 1982; Xie *et al.*, 2013a).

Existen cuatro isoformas de la subunidad alfa ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ) y tres de la beta ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ). A diferencia del resto de subunidades alfa, la  $\alpha 1$  está presente en la mayoría de tejidos, siendo su expresión especialmente elevada en el riñón, cerebro y corazón (Li y Langhans, 2015). A nivel renal, la aldosterona aumenta la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, incrementando así la reabsorción de sodio (Rossier *et al.*, 2015; Seok *et al.*, 1999) estimulando además su actividad a través de fosforilación por medio del SGK1 (Lang *et al.*, 2006). La aldosterona también induce la expresión *in vitro* de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en cardiomiocitos aislados (Hegyvary, 1977; Ikeda *et al.*, 1991; Mihailidou *et al.*, 1998; Suhail, 2010). En el corazón, esta bomba iónica juega un papel fundamental en la regulación de las concentraciones de sodio y potasio en la fase final del ciclo de contracción-relajación, contribuyendo así al restablecimiento del potencial de reposo (Cooper, 2002; Shattock *et al.*, 2015).

### 1.3.1.5 Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1, NHE1

La familia de intercambiadores de sodio e hidrógeno NHE son un tipo de proteínas transmembrana que están involucradas en la homeostasis del sodio y la regulación del pH y del volumen celular intercambiando un ion sodio, que entra en la célula a la vez que expulsa un protón (Parker *et al.*, 2015; Slepkov y Fliegel, 2002). Existen seis isoformas del NHE numeradas de la 1 a la 6 (NHE1-NHE6), siendo la expresión de las isoformas de la 2 a la 6 localizada casi exclusivamente en las distintas secciones de la nefrona, a diferencia de la isoforma 1 o NHE1, que es ubicua, siendo por tanto ésta la única isoforma que se expresa a nivel cardíaco (Burckhardt *et al.*, 2002; Odunewu-Aderibigbe y Fliegel, 2014). Se ha demostrado que la expresión del NHE1 está inducida, entre otros factores, por la aldosterona mediante mecanismo genómico y que el SGK1 aumenta su actividad mediante fosforilación (Karmazyn *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009) (figura 4).

A diferencia del resto de isoformas encontradas en el riñón, el NHE1 no ejerce un papel relevante en el manejo de sodio en este órgano (Burckhardt *et al.*, 2002). La función fisiológica de esta isoforma ha sido asociada al restablecimiento del pH celular ante los cambios del mismo, protegiendo a las células del organismo frente a la acidosis (Odunewu-Aderibigbe y Fliegel, 2014; Sundset *et al.*, 2003).

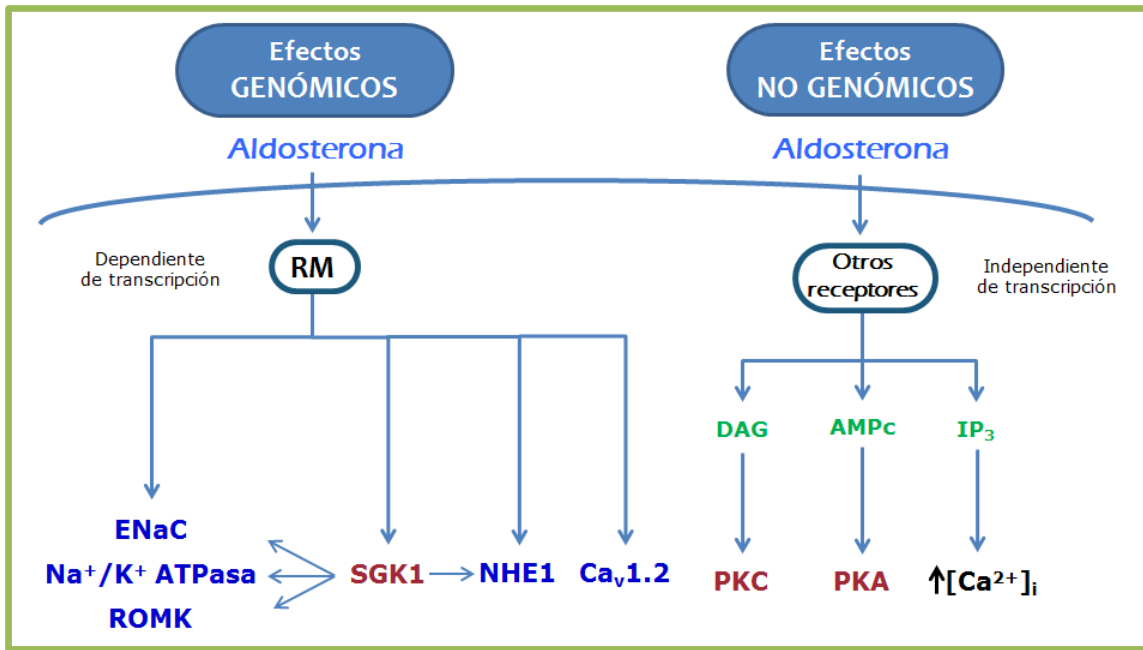
### 1.3.1.6 Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, Ca<sub>v</sub>1.2

Los canales de tipo L (canales de calcio de apertura lenta) se activan por despolarizaciones intensas, mediando el flujo prolongado de calcio al interior de una gran variedad de tipos celulares (Buset Rios *et al.*, 2011). Suponen la principal vía de entrada de calcio en los cardiomiocitos tras su excitación, lo que aumenta la concentración intracelular del ion produciendo la contracción del músculo cardíaco en el denominado acoplamiento excitación-contracción (EC) (Tanaka y Shigenobu, 2005). La aldosterona, mediante mecanismo de acción genómico, estimula la expresión de la subunidad  $\alpha$ 1C del canal de calcio cardíaco dependiente de voltaje tipo L (Ca<sub>v</sub>1.2) (Auguste *et al.*, 2014; Martin-Fernandez *et al.*, 2009) (figura 4). La subunidad  $\alpha$ 1C es la responsable de las principales características de estos canales, ya que está implicada en la conductividad y selectividad iónica y en la sensibilidad de voltaje (Tiwari *et al.*, 2006). Dicho canal se encuentra intercalado en la membrana de células excitables, como los cardiomiocitos y las neuronas (Yamakage y Namiki, 2002). Los canales de calcio dependientes de voltaje median el flujo de calcio en respuesta a la despolarización de la membrana y regulan procesos intracelulares tales como la contracción, neurotransmisión o expresión génica, en los que el ion calcio actúa como segundo mensajero (Buset Rios *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Acciones no genómicas de la aldosterona

Las acciones no genómicas de la aldosterona son llevadas a cabo mediante respuestas celulares rápidas, en segundos o pocos minutos, que implican la activación de sistemas de segundos mensajeros y la señalización intracelular mediada por sistemas de quinasas. Por tanto, y a diferencia de las acciones genómicas, son independientes de transcripción, es decir, no requieren la activación de genes ni la síntesis de nuevas proteínas, sin embargo, se sabe que existen efectos sinérgicos entre las acciones genómicas y no genómicas (Dooley *et al.*, 2012; Meinel *et al.*, 2014). En las acciones no genómicas, están implicados receptores de membrana específicos para la aldosterona diferentes al RM (Falkenstein *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2011; Grossmann *et al.*, 2005). Actualmente, los más estudiados son el GPR30 (De Giusti *et al.*, 2015) y el GPER (Ferreira *et al.*, 2015), ambos receptores acoplados a proteínas G. Las acciones no genómicas implican la formación de mensajeros secundarios como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y, a través de la enzima fosfolipasa C (PLC), la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (figura 4). Como consecuencia ante el aumento de los mensajeros secundarios citados, se estimulan: la proteína quinasa A (PKA) por el aumento de AMPc (Bollag, 2014; Good, 2007; Koppel *et al.*, 2003), aunque dicho efecto no genómico de la aldosterona solo ha sido demostrado parcialmente; la proteína quinasa C (PKC) (Bollag, 2014; Hermidorff *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2007), activada por el DAG; y un aumento en la concentración de calcio intracelular mediado por el IP3, que estimula al retículo endoplasmático para liberar calcio al citosol (Bollag, 2014; Estrada *et al.*, 2000; Petzel *et al.*, 1992; Wojczuk y Gniot-Szulzycka, 2004).

En la siguiente figura (figura 4) se resumen en un esquema los efectos genómicos y no genómicos de la aldosterona:



**Figura 4.** Efectos genómicos y no genómicos de la aldosterona implicados en la regulación del transporte iónico. RM, receptor de mineralocorticoides; ENaC, canal epitelial de sodio; Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, bomba de sodio-potasio dependiente de ATP; ROMK, canal de potasio medular exterior renal; SGK1, quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1; NHE1, intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1; Ca<sub>v</sub>1.2, canal de calcio dependiente de voltaje tipo L; DAG, diacilglicerol; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; PKC, proteína quinasa C; PKA, proteína quinasa A; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, concentración intracelular de calcio. En azul intenso, se señalan proteínas implicadas en el transporte iónico; en rojo, proteínas quinasas; en verde, mensajeros secundarios.

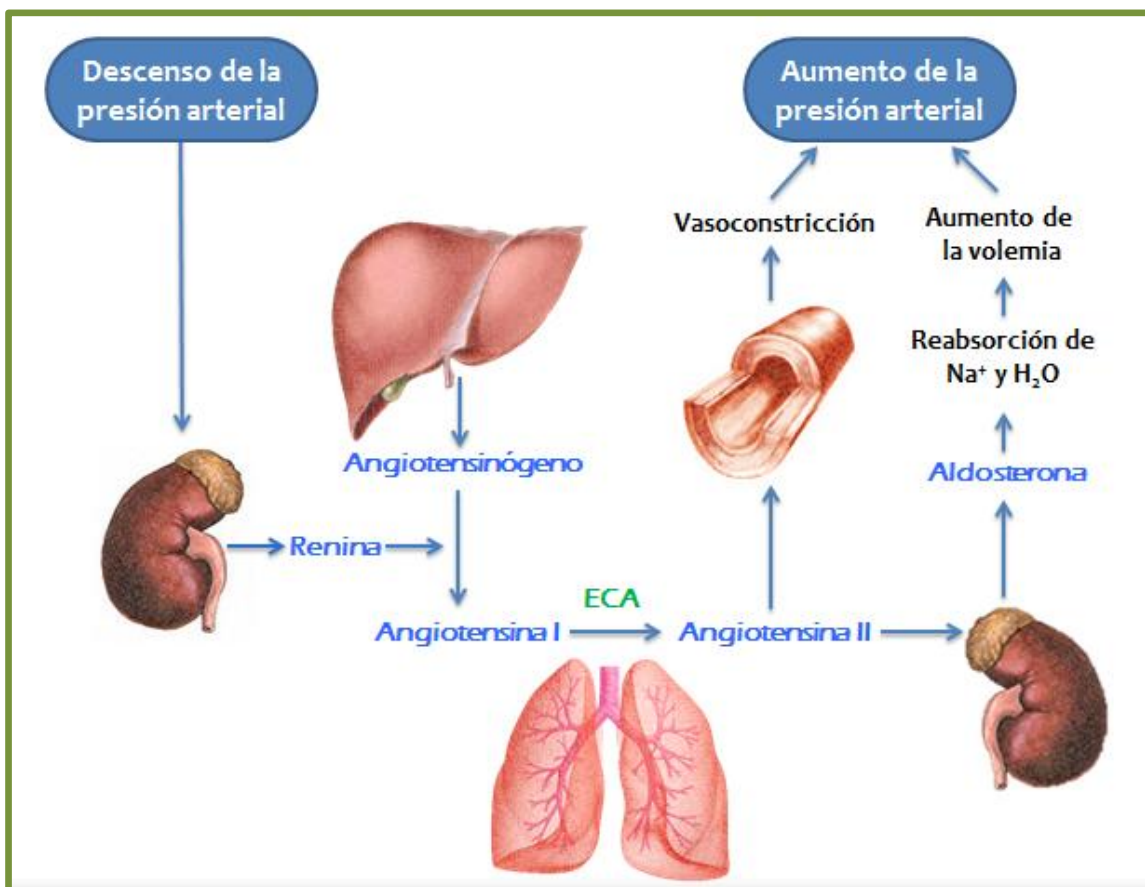
## 1.4 Regulación de la secreción de la aldosterona

La secreción de la aldosterona está regulada por factores relacionados con el control de la concentración de sodio en el líquido extracelular y la volemia. Entre los principales estímulos de la síntesis de la aldosterona se encuentran la AII, la ACTH, la disminución de los niveles plasmáticos de sodio y el incremento de los niveles plasmáticos de potasio (Bollag, 2014; Marney y Brown, 2007). Por otro lado, entre los inhibidores más importantes de la secreción de la hormona, destaca el péptido natriurético auricular (PNA) (Miura *et al.*, 2015; Nakajima *et al.*, 1987).

### 1.4.1 Angiotensina II

La AII es parte fundamental del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (figura 5). Este sistema se activa como respuesta ante una bajada de la presión arterial (PA) para restablecer los valores de presión mediante vasoconstricción y aumento de la volemia (Brewster y Perazella, 2004; Sparks *et al.*, 2014). Ante una bajada en la perfusión renal, las células granulares del aparato yuxtaglomerular secretan renina al torrente sanguíneo. La renina cataliza la conversión del angiotensinógeno (producido en el hígado) en angiotensina I, que es a su vez transformada en AII en el endotelio pulmonar y renal por acción de la enzima convertidora de angiotensina (Rafikov *et al.*). La AII, mediante su unión a los receptores AT1, estimula por un lado la vasoconstricción y por otro la expresión de las enzimas CYP11A1 y aldosterona sintasa, activando por tanto la síntesis de aldosterona al comienzo y al final de su ruta de

síntesis (Funder, 2010; Sparks *et al.*, 2014). También favorece la reabsorción de sodio, fundamentalmente, en el túbulo proximal y en el asa de Henle, al aumentar los canales de sodio en la membrana apical, y estimular la bomba de sodio-potasio dependiente de ATP en la membrana basolateral (Mamenko *et al.*, 2012). Por último, la aldosterona se une al RM de las células epiteliales del TCD y de las células principales del TCC favoreciendo la reabsorción de sodio y agua y la excreción de potasio (Brewster y Perazella, 2004; Muto, 1995; Waanders *et al.*, 2011). El aumento en la concentración de sodio plasmático conlleva a su vez un aumento de la osmolaridad, lo que induce una reabsorción indirecta de agua hacia el plasma, aumentando la volemia y por tanto, la PA (Brown, 1993; Sam y Feizi, 2012).



**Figura 5.** Sistema renina-angiotensina-aldosterona, órganos, enzimas y factores implicados. ECA, enzima convertidora de angiotensina.

### 1.4.2 Hormona adrenocorticotropa

La ACTH aumenta la síntesis de mineralocorticoides, incrementando la conversión del colesterol a pregnenolona, efecto mediado por un aumento del AMPc (Funder, 2010; Sonoyama *et al.*, 2014). La unión de la ACTH a su receptor de membrana produce un aumento de los niveles de AMPc y la activación de la PKA, activando el paso de colesterol a pregnenolona. Al ser esta la reacción limitante, una vez que se ha sintetizado la pregnenolona los pasos restantes pueden realizarse sin la intervención de la ACTH. Sin embargo, este estímulo es mucho menos potente que la estimulación por la AII o por el  $K^+$  (Funder, 2010).

### 1.4.3 Sodio

La aldosterona favorece la absorción de sodio aumentando así su concentración en el líquido extracelular, por lo que la disminución de sus niveles plasmáticos estimula la secreción de la hormona (Funder, 2010).

Aunque la aldosterona es muy eficaz en la reabsorción de sodio, cuando hay una producción excesiva de aldosterona o una hiper-secreción, el aumento de la reabsorción y la disminución en la excreción de sodio en los riñones son transitorios. Tras 1-3 días de retención de sodio y agua, el volumen del líquido extracelular aumenta alrededor de un 10-15% y se produce un incremento simultáneo de la PA. Cuando la PA aumenta lo suficiente, los riñones sufren el denominado fenómeno de “escape” de modo que retienen menos sodio y agua, excretando por tanto, cantidades de sodio

iguales a la ingestión diaria, a pesar de la presencia continua de concentraciones altas de aldosterona. La principal razón de escape es la natriuresis y diuresis por presión, que aparecen cuando la presión arterial se eleva. (Prakash, 2005).

#### 1.4.4 Potasio

El aumento de potasio en el líquido extracelular es el principal estímulo para la secreción de aldosterona (Bollag, 2014; Palmer y Frindt, 2000). La aldosterona favorece la secreción de potasio por las células epiteliales de los túbulos renales a través del canal ROMK, estimulando a su vez la secreción de aldosterona (Palmer y Frindt, 2000; Yoo *et al.*, 2003). Además de este efecto directo, el potasio también modula la respuesta de la aldosterona a otros estímulos; por ejemplo, la depleción de potasio reduce la respuesta de la aldosterona a la AII (Funder, 2010).

El mecanismo de acción del potasio está mediado también por los cambios en el metabolismo de los fosfoinosítoles. A diferencia de lo que ocurre con la AII, el potasio produce una despolarización de la membrana celular, facilitando la entrada de calcio extracelular al interior de la célula. Como resultado aumenta la síntesis de enzimas implicadas en la síntesis de aldosterona, la aldosterona sintasa, y de las que intervienen en los pasos iniciales de la síntesis, como la CYP11A1 (Bassett *et al.*, 2004).

#### **1.4.5 Péptido natriurético auricular**

El PNA se produce en respuesta a cambios en el volumen circulante de los cardiomiocitos auriculares. Este factor disminuye la reabsorción de sodio en el túbulo colector ya que inhiben la bomba sodio-potasio de la membrana basolateral y cierran los canales de sodio de la membrana apical (Woodard y Rosado, 2008).

Así mismo, el PNA inhibe tanto la secreción de renina en el aparato yuxtaglomerular como la secreción de aldosterona por las células de la glomerulosa. Esta inhibición de la secreción de aldosterona se produce en las primeras etapas de la esteroidogénesis y en menor grado inhibiendo la conversión de corticosterona en aldosterona (Chopra *et al.*, 2013). Este péptido se sintetiza en, además de las células cardíacas, en otras células del organismo, entre ellas las de la médula adrenal (Woodard y Rosado, 2008).

#### **1.5 Degradación de la aldosterona**

La aldosterona tiene una vida media corta, de 15 minutos, y se metaboliza prácticamente toda a su paso por el hígado, donde, a través de reacciones que modifican su estructura, pierde su actividad biológica. Dichas reacciones aumentan su solubilidad en agua, lo que facilita su excreción a través de la orina en forma de aldosterona-18-glucoronato (Hassan-Ali y Witzgall, 1979).

## 1.6 Hiperaldosteronismo

El hiperaldosteronismo es un trastorno metabólico caracterizado por una producción y secreción de aldosterona por parte de las glándulas adrenales, por encima de los niveles normales (Foo *et al.*, 2001; Schirpenbach y Reincke, 2007). Se pueden distinguir dos tipos, el hiperaldosteronismo primario y el secundario (Vaidya *et al.*, 2000).

El hiperaldosteronismo primario, también llamado síndrome de Conn, es frecuentemente consecuencia de un tumor en la zona glomerulosa que produce niveles anormalmente altos de aldosterona. En otros casos existe una hiperplasia no tumoral y benigna de células productoras de la hormona que se denomina hiperaldosteronismo idiopático o hiperplasia adrenal bilateral. Las consecuencias más importantes son la hipopotasemia, un ligero aumento del volumen extracelular y del volumen sanguíneo, un incremento de la concentración plasmática de sodio y en la mayoría de los casos, hipertensión (Foo *et al.*, 2001; Piaditis *et al.*, 2015; Schirpenbach y Reincke, 2007).

El hiperaldosteronismo secundario cursa con un aumento de la concentración plasmática de aldosterona, secundaria a una sobreactivación del SRAA, debido en general a una mayor secreción de renina por encima de los niveles normales. Puede producirse por la disminución del flujo sanguíneo renal debido al estrechamiento de una o ambas arterias renales por nefroesclerosis o por una vasoconstricción renal

intensa. También puede deberse a un tumor productor de renina (reninismo primario), uso crónico de diuréticos, hipovolemia (vómitos o diarrea), síndrome de Bartter, síndrome paraneoplásico o edemas (Foo *et al.*, 2001; Vaidya *et al.*, 2000).

## **1.7 Alteraciones cardiovasculares asociadas al exceso de aldosterona**

Se ha demostrado ampliamente que el exceso de aldosterona promueve el desarrollo de diversas alteraciones fisiopatológicas estrechamente relacionados entre sí como el daño renal (Brown, 2013), la disfunción endotelial (Whaley-Connell *et al.*, 2010), la hipertensión (Samavat *et al.*, 2011), el desajuste en la homeostasis iónica cardíaca (Auguste *et al.*, 2014; Bénitah *et al.*, 2001; Martin-Fernandez *et al.*, 2009; Martin-Fernandez *et al.*, 2014b) y la aparición de arritmias (Reil *et al.*, 2012), así como el desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC) e insuficiencia cardíaca (IC) (Cannavo *et al.*, 2016; Quinkler *et al.*, 2010; Struthers, 2004). Estos procesos son comunes también en pacientes con hiperaldosteronismo (Piaditis *et al.*, 2015; Vaidya *et al.*, 2000).

## 2. HIPERTROFIA CARDÍACA

La HC se define como un aumento del grosor del músculo cardíaco de la pared ventricular, surgido como respuesta adaptativa ante un incremento del estrés parietal o tensión mecánica sobre uno o los dos ventrículos (Di Lullo *et al.*, 2015; Horstkotte *et al.*, 1993; Prisant, 2005).

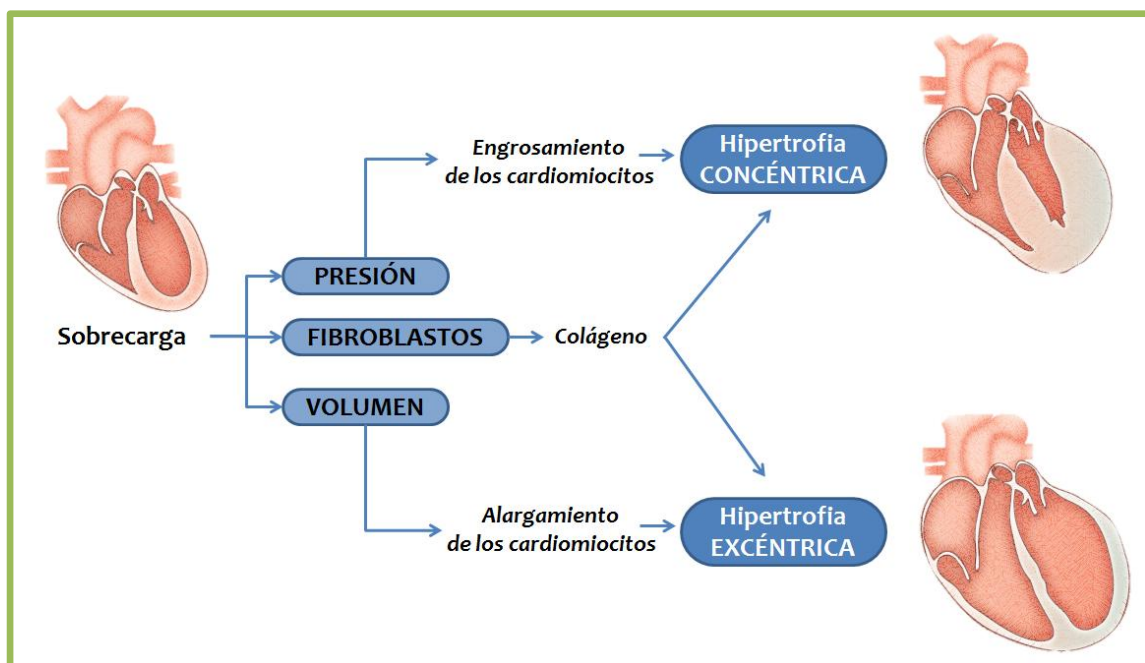
Los factores que determinan el desarrollo de la HC pueden ser tanto hemodinámicos como no hemodinámicos o neuro-humorales. Entre los factores hemodinámicos se encuentran, la hipertensión, un aumento en la precarga (o presión sobre el ventrículo izquierdo justo antes de la contracción, debida a un aumento en el volumen ventricular al final de la relajación o volumen telediastólico), el estrés parietal continuado y el endurecimiento de las arterias o arterioesclerosis (Di Lullo *et al.*, 2015; Frohlich, 1999; Opie *et al.*, 2006). En cuanto a los factores no hemodinámicos, destacan la hiperactividad simpática, la sobreactivación del SRAA y el aumento crónico en la concentración plasmática de algunos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (Di Lullo *et al.*, 2015; Opie *et al.*, 2006; Weber, 1994).

El exceso de aldosterona está estrechamente relacionado con el desarrollo de HC. A través de sus efectos a nivel renal, produce retención de sodio y agua aumentando el volumen plasmático circulante. Como consecuencia ante una mayor volemia, aumenta el volumen plasmático bombeado, el retorno venoso y la PA. De esta manera, la aldosterona contribuye al desarrollo de la HC a través de su efecto hemodinámico (Di

Lullo *et al.*, 2015; Holmer y Schunkert, 1996). Por otro lado, se ha demostrado que la aldosterona es uno de los factores mediadores más importantes en el desarrollo de HC, independientemente de los niveles de PA y sus efectos a nivel renal (Diez, 2008; Holmer y Schunkert, 1996; Okoshi *et al.*, 2004), por lo que estaría promoviendo la HC directamente en el miocardio. Esto se debe fundamentalmente al hecho de que los cardiomiocitos sintetizan aldosterona y expresan el RM (Yasuoka *et al.*, 2013; Jaisser y Farman, 2016); siendo por tanto el corazón, un órgano diana más de la aldosterona. Además, se ha demostrado que ratones genéticamente modificados que no expresan el RM en el corazón, están protegidos frente al desarrollo de HC cuando se les administra deoxicorticosterona (precursor de la aldosterona y agonista del RM) (Bienvenu *et al.*, 2015) lo que evidencia el papel de la aldosterona en la fisiopatología de la HC a través de su efecto directo sobre el corazón (Catena *et al.*, 2015).

Como respuesta a los factores determinantes del desarrollo de HC, se originan cambios en la estructura y composición del miocardio que pasan de ser adaptativos a ser patológicos, llamados en conjunto remodelado cardíaco (Cohn *et al.*, 2000; Reddy y Bernstein, 2015). En dicho remodelado se produce un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos junto con procesos de apoptosis, necrosis y fibrosis intersticial (Lips *et al.*, 2003; Reddy y Bernstein, 2015). Con el tiempo, el remodelado cardíaco, termina por afectar a la función cardíaca, favoreciendo la alteración progresiva de la función diastólica y sistólica, pudiendo agravarse y evolucionar hacia IC, con el consecuente aumento en la morbi-mortalidad (McMullen y Jennings, 2007; Reddy y Bernstein, 2015).

La HC puede presentar diferentes patrones geométricos: concéntrico y excéntrico. Cuando hay una sobrecarga mantenida de presión en el ventrículo, la presión sistólica es mayor y el miocardio responde con un incremento en el grosor de la pared del ventrículo izquierdo, produciéndose la denominada hipertrofia concéntrica (Grossman y Paulus, 2013). Este tipo de hipertrofia está asociada al engrosamiento transversal de los cardiomiocitos, debido a la inserción de nuevos sarcómeros en paralelo, junto con el depósito de colágeno producido por los fibroblastos cardiacos (Lazzeroni *et al.*, 2016) (figura 6). Cuando la sobrecarga que se produce es de volumen, aumenta la presión diastólica (Grossman y Paulus, 2013) que con el tiempo, produce un alargamiento de los cardiomiocitos debido a la inserción en serie de nuevos sarcómeros. Esto da lugar a la llamada hipertrofia excéntrica, donde hay un incremento del diámetro ventricular (Lazzeroni *et al.*, 2016) (figura 6).



**Figura 6.** Patrones geométricos de hipertrofia cardíaca.

Ante una sobrecarga hemodinámica, ya sea de presión o de volumen, el ventrículo responde con un aumento de la masa muscular o hipertrofia, que tiende a mantener la tensión sistólica de la pared ventricular dentro de los límites normales (Lazzeroni *et al.*, 2016). Sin embargo, la HC no se acompaña del correspondiente aumento de la densidad capilar, por lo que a partir de un determinado momento aparece un cierto grado de isquemia, incluso en ausencia de enfermedad coronaria (Lazzeroni *et al.*, 2016; Yilmaz y Sechtem, 2014). Con el tiempo, esto conduce a una pérdida de unidades contráctiles y a un aumento de la fibrosis que deterioran aún más la función cardíaca (Kahan y Bergfeldt, 2005; Yilmaz y Sechtem, 2014). El ventrículo dilatado tiene la desventaja de que debe desarrollar una tensión mucho mayor que un ventrículo normal y, por tanto, para realizar una misma cantidad de trabajo externo, consume más oxígeno que el corazón normal (Yilmaz y Sechtem, 2014).

## 2.1 Alteraciones estructurales

La HC va siempre acompañada de una alteración en la composición y la estructura del corazón, reflejada en la hipertrofia de los cardiomiocitos y el acúmulo de colágeno en la matriz extracelular (MEC) (Catena *et al.*, 2015; Somanna *et al.*, 2015).

### 2.1.1 Hipertrofia de los cardiomiocitos

La hipertrofia de los cardiomiocitos se produce en respuesta a numerosos factores como el estiramiento mecánico, factores neuro-humorales como la aldosterona (Catena *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2003), la endotelina-1 (Fujioka *et al.*, 2006; Rebic *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 1991) o la norepinefrina (Samson *et al.*, 2015; Waspe *et al.*, 1990), y citoquinas como la cardiotrofina-1 (Lopez-Andres *et al.*, 2011; Pennica *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2015). Estos factores activan numerosas vías intracelulares entre las que destacan: las proteínas Ras, Raf y Rho, activadas por proteínas G, quinasas dependientes de calcio-calmodulina (CaMK), la vía de la calcineurina, la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), las tirosinas quinasas Janus (JAK) y los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) (Honsho *et al.*, 2009; Lips *et al.*, 2003; Somanna *et al.*, 2015; Unsold *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2016).

La activación de estas vías intracelulares da lugar a cambios en la expresión génica de proteínas contráctiles y al aumento de la síntesis proteica intracelular que estimula la hipertrofia del cardiomiocito. De este modo, los cardiomiocitos incrementan su tamaño formando nuevos sarcómeros. Sin embargo, los mecanismos que determinan una inserción u otra no se conocen con exactitud. Probablemente, tanto los cambios en la expresión génica como la activación de ciertas vías intracelulares, determinen el tipo de inserción favoreciendo la unión de los sarcómeros en una u otra dirección (Anversa *et al.*, 1986; Calderone *et al.*, 1995; Kahan y Bergfeldt, 2005; Lazzeroni *et al.*, 2016).

### 2.1.2 Matriz extracelular y acumulación de colágeno

La MEC del corazón es una estructura continua con una arquitectura compleja, compuesta por proteínas estructurales (principalmente colágeno, elastina, fibronectina y laminina) y proteínas no estructurales (como trombospondina, tenascina, osteopontina y periostina, entre otras) (Rienks *et al.*, 2014).

Las proteínas estructurales más abundantes de la MEC cardíaca son el colágeno tipo I y el colágeno tipo III (Horn y Trafford, 2015; Weber *et al.*, 1988). Las fibras tipo I y III son muy resistentes a las enzimas proteolíticas y pueden soportar mucha tensión. A su vez, las fibras de colágeno de la MEC están entrecruzadas entre sí. Estos entrecruzamientos junto con la red formada por fibronectina, favorecen la inserción de las fibras tipo I y III para la formación de la red extracelular de colágeno (Horn y Trafford, 2015) (Velling *et al.*, 2002).

El aumento del contenido de colágeno juega un papel determinante en el desarrollo de HC (Brilla *et al.*, 1990; Horn y Trafford, 2015; Travers *et al.*, 2016). Como consecuencia del remodelado cardíaco acontecido en la HC, se producen alteraciones estructurales que desajustan el equilibrio entre la síntesis y la degradación de las moléculas de colágeno tipo I y III en el espacio intersticial y perivascular del miocardio (López Salazar *et al.*, 2006). Se ha demostrado que existe una relación estrecha entre la HC y el contenido de colágeno miocárdico valorado mediante diagnóstico histológico tanto en modelos animales como en pacientes con HC (Jiménez-Navarro *et al.*, 2005).

Uno de los factores que estimulan la síntesis de colágeno cardíaco es la aldosterona, siendo una de las características principales de la HC producida por el hiperaldosteronismo (Brilla *et al.*, 1993; Brilla *et al.*, 1990; Martin-Fernandez *et al.*, 2014b). La aldosterona estimula directamente la síntesis de colágeno en el miocardio, principalmente a través de la activación de los fibroblastos cardíacos (Cohn y Colucci, 2006). Éstos proliferan ante dicho estímulo y alteran su patrón de expresión génica convirtiéndose en células tipo musculares lisas con capacidad contráctil, llamadas mio-fibroblastos (Lighthouse y Small, 2016). Los mio-fibroblastos secretan una gran cantidad de proteínas de MEC como colágeno tipo I y III, resultando en un aumento desproporcionado de la cantidad de colágeno intersticial y perivascular (Lighthouse y Small, 2016). La proliferación de los fibroblastos cardíacos estimulada por la aldosterona puede ser bloqueada por los antagonistas del RM, como la espironolactona, lo que corrobora el papel de la aldosterona en la activación patológica de los fibroblastos y su relación con el desarrollo de HC (Xie *et al.*, 2013b).

La red de colágeno de la MEC es una estructura dinámica en la que interactúan procesos tanto de síntesis como de degradación en cuya regulación participan diversas proteínas. Estas proteínas son las denominadas metaloproteasas de matriz (MMPs), una familia de endopeptidasas extracelulares que, una vez activadas, son capaces de degradar completamente la MEC contribuyendo al desarrollo de la fibrosis y el remodelado cardíaco (Castro y Tanus-Santos, 2013; Padmanabhan Iyer *et al.*, 2016). Se ha comprobado que la aldosterona estimula la expresión de las MMPs tipo 2 y 9 tanto *in vitro* como *in vivo* mediante la activación del M y de la PKC, y la estimulación de la vía de las MAPK/ERK, estando dicho mecanismo directamente relacionado con el

remodelado cardíaco y el aumento de la fibrosis (Castro y Tanus-Santos, 2013; Martin-Fernandez *et al.*, 2014a; Somanna *et al.*, 2015).

## 2.2 Alteraciones funcionales

### 2.2.1 Disfunción sistólica y diastólica

La prolongación mantenida en el tiempo de la HC, favorece la alteración progresiva de la función sistólica y diastólica del corazón, llegando a ser patológica si el corazón no es capaz de satisfacer las demandas metabólicas del organismo (Carreno *et al.*, 2006).

La disfunción sistólica se produce por el deterioro de la capacidad contráctil del ventrículo izquierdo por efecto inotrópico negativo (Hobbs *et al.*, 2002). Está condicionada por el desacoplamiento de los mecanismos de excitación y contracción, principalmente a cambios patológicos en los mecanismos de transducción de señales, lo que produce una disminución de la fuerza contráctil del miocardio. La reducción en la contractilidad produce una disminución en la fracción de eyección por un vaciado ventricular incompleto, lo que lleva a un aumento compensatorio en el volumen de llenado y en la presión diastólica final, para mantener el gasto cardíaco. Sin embargo, a la larga estos mecanismos compensatorios no son suficientes y el gasto cardíaco disminuye (Cleland *et al.*, 2005). En términos generales, la disfunción sistólica se diagnostica cuando la fracción de eyección es menor al 45% (Diller *et al.*, 1999).

La disfunción diastólica comprende un comportamiento mecánico anormal del ventrículo izquierdo debido a una disminución en la distensibilidad y a una relajación incompleta, más lenta de lo normal (Borlaug y Kass, 2006). En la disfunción diastólica se eleva excesivamente la presión diastólica final sin aumento en el volumen diastólico, por tanto, dicho efecto sobre la precarga es debido exclusivamente a la rigidez o disminución de la distensibilidad del ventrículo (Vasan y Levy, 2000). Inicialmente, esta alteración puede cursar sin manifestaciones clínicas aparentes y sin afectación de la fracción de eyección, sin embargo, está asociada con una gran morbilidad (Mandinov *et al.*, 2000).

### **.2.2.2 Insuficiencia cardíaca**

La IC se define como la incapacidad del corazón para mantener una funcionalidad adecuada que permita hacer frente a las demandas metabólicas periféricas (Francis y Tang, 2003). Cuando hay un aumento de las demandas metabólicas de los tejidos periféricos, el corazón se adapta mediante variaciones en la precarga, la postcarga y la contractilidad para poder hacer frente a dichos requerimientos. Sin embargo, algunas patologías producen un aumento continuado de la precarga o la postcarga, así como el deterioro en la distensibilidad o contractilidad ventricular, lo que termina con el tiempo, en un descenso en la capacidad de la función cardíaca y en la aparición de la IC.

En la IC se dan numerosas alteraciones relacionadas entre sí, aunque las más características son la fibrosis y el remodelado cardíaco; la disfunción diastólica y sistólica; las modificaciones en la concentración de las hormonas circulantes responsables de la vasoconstricción; la retención de líquidos y  $\text{Na}^+$ ; la disfunción endotelial y la inflamación (Lazzeroni *et al.*, 2016; Pazos-López *et al.*, 2011; Ter Maaten *et al.*, 2016). A su vez, el descenso del flujo sanguíneo que se produce en la IC como resultado de un menor gasto cardíaco estimula el aumento de la concentración plasmática de varias hormonas vasoactivas, principalmente catecolaminas, angiotensina, aldosterona, vasopresina y endotelina (Parker y Thiessen, 2004; Ter Maaten *et al.*, 2016; Viquerat *et al.*, 1985; Zannad, 1995). La acción de estas hormonas consiste en mantener la presión de perfusión periférica, pero sus efectos, mantenidos de manera crónica, pueden llegar a ser perjudiciales para la estructura y la función del corazón, contribuyendo al empeoramiento de la IC (Francis y Tang, 2003; Heymes *et al.*, 2004; Ter Maaten *et al.*, 2016).

La IC afecta aproximadamente al 1% de la población mayor de 40 años, doblándose su prevalencia con cada década de edad y situándose alrededor del 10% en los mayores de 70 años. Es la tercera causa de muerte cardiovascular y pese a las mejoras en el tratamiento disponibles, sigue presentando una alta mortalidad y un mal pronóstico, con una supervivencia de alrededor del 50% en los cinco años siguientes al diagnóstico (Jimenez Navarro *et al.*, 2006).

La relación entre la concentración plasmática de aldosterona y la mortalidad en pacientes con IC fue demostrada en el estudio CONSENSUS (*Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study*) (1987). La alta prevalencia de la IC asociada con el hiperaldosteronismo primario y secundario, avalan el papel del exceso de aldosterona en el daño cardiovascular y la importancia del bloqueo de sus acciones. En el estudio RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*), el antagonista del RM espironolactona, junto con el tratamiento estándar con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA),  $\beta$  bloqueantes, digoxina y diuréticos, demostró su efecto favorable en el manejo clínico de la IC (Pitt *et al.*, 1999). Después de un seguimiento de 24 meses, el estudio RALES demostró una reducción de la mortalidad en un 30%, tanto por progresión de la enfermedad como por muerte súbita. Este efecto fue adicional a los ya probados de los IECA y de los  $\beta$  bloqueantes, como determinantes de la mejoría del pronóstico de la IC. A su vez, el estudio EPHEUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*), demostró en 6.632 pacientes con disfunción sistólica tras infarto agudo de miocardio (IAM), que el bloqueo temprano de la aldosterona con eplerenona, otro antagonista del RM, acompañada de la terapia convencional, disminuía, tras seguimiento de 16 meses, un 15% la mortalidad global, un 17% la mortalidad cardiovascular y un 21% la muerte súbita (Hunt, 2005; Pitt *et al.*, 2003). A los 30 días, se demostró que la eplerenona reducía la mortalidad por todas las causas en un 32% y el riesgo de muerte súbita en un 37% (Pitt *et al.*, 2005).

## 2.3 Mecanismos y factores implicados en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca

### 2.3.1 Fibrosis miocárdica

Inicialmente, la fibrosis forma parte de un proceso reparador que surge como respuesta a la pérdida de tejido, siendo crucial para prevenir la destrucción de la estructura tisular cardíaca frente a un daño en la misma (Travers *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 1995). No obstante, una vez el proceso de fibrosis avanza, existe un reemplazo progresivo de la arquitectura normal del tejido por lesiones fibróticas o cicatrización, que pueden llegar a comprometer la funcionalidad del órgano (Lazzeroni *et al.*, 2016; Leask *et al.*, 2002). Por lo tanto, a la larga, la fibrosis puede considerarse como una alteración en el mecanismo normal de reparación donde en lugar del reemplazo del tejido afectado por células funcionales, se depositan proteínas fibrosas de relleno que llevan a una pérdida de función en la zona afectada (Lazzeroni *et al.*, 2016; Leask *et al.*, 2002).

En la fibrosis destaca el exceso en la producción y la consecuente acumulación de proteínas de MEC llevada a cabo principalmente por los fibroblastos activados (Krenning *et al.*, 2010; Lighthouse y Small, 2016; Travers *et al.*, 2016). En la HC, es muy frecuente el desarrollo de una MEC desorganizada y especialmente fibrótica (Travers *et al.*, 2016; Tyagi, 1998) que causa un aumento en la rigidez tisular e induce cambios

patológicos en la señalización molecular de los cardiomiocitos, lo que progresa generalmente al desarrollo de IC (Krenning *et al.*, 2010; Lazzeroni *et al.*, 2016). Además, el exceso de MEC desajusta el acoplamiento mecano-eléctrico de los cardiomiocitos y aumenta el riesgo de arritmias (de Bakker *et al.*, 1996; Pellman *et al.*, 2016).

En el proceso de fibrosis miocárdica, aparte del aumento en la síntesis de proteínas de MEC, también está implicada una alteración en la producción y señalización de diversos factores de crecimiento (Lighthouse y Small, 2016). Los factores de crecimiento son moléculas peptídicas que actúan de manera local, aisladamente o en combinación, promoviendo la síntesis de proteínas y la supervivencia celular a través de la interacción con receptores específicos de membrana y la activación de proto-oncogenes (Bhattacharyya *et al.*, 1994; Lighthouse y Small, 2016). Entre los diversos factores de crecimiento descritos en la literatura, destacan por su capacidad de inducir fibrosis cardíaca: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); el factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb); el factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF1); la endotelina tipo 1 (ET1); el factor de crecimiento transformante beta ( $TGF\beta$ ) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (Krenning *et al.*, 2010; Leask, 2015).

### 2.3.1.1 Factor de crecimiento de tejido conectivo, CTGF

El CTGF es producido y secretado en multitud de órganos como en el corazón, cerebro, placenta, hígado, pulmón, músculo, endotelio, riñón y páncreas, siendo más abundante en el riñón (Kubota y Takigawa, 2015; Oemar y Luscher, 1997). Las funciones del CTGF comprenden la proliferación y diferenciación celular, la adhesión celular, la angiogénesis y la síntesis de proteínas de MEC como la fibronectina y diferentes tipos de colágenos (Kubota y Takigawa, 2015; Oemar y Luscher, 1997).

El TGF $\beta$  es el principal inductor del CTGF (Lee *et al.*, 2015), pero también se ha observado que otros factores como el estrés mecánico, la AII y la aldosterona estimulan la expresión del CTGF cardíaco (Lee *et al.*, 2015; Martin-Fernandez *et al.*, 2014a). Por otro lado, se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentan su expresión (Liu *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2015) y por tanto, los antioxidantes pueden bloquear dicho efecto en la producción del CTGF (Yu y Welge-Lussen, 2013). En las alteraciones cardíacas que cursan con una marcada fibrosis intersticial, generalmente hay un aumento en la expresión del CTGF y por tanto, en la producción de proteínas de MEC (Daniels *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). La sobreexpresión del CTGF está mediada por una red compleja de interacciones moleculares, donde participan las proteínas Smad, la PKC, y la vía MAPK/ERK (Leask, 2015; Leask *et al.*, 2003).

### 2.3.2 Inflamación miocárdica

La respuesta inflamatoria está mediada por las citoquinas. Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño que median la activación, proliferación y migración celular a través de la unión a sus receptores de membrana. Entre otras funciones, intervienen en los procesos de reparación tisular, sin embargo, la excesiva producción de citoquinas puede conducir a situaciones patológicas. Dentro de este grupo de mediadores de la inflamación se incluyen: las interleuquinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN) y los factores estimuladores de colonias (Colombo *et al.*, 2012; Masiha *et al.*, 2013; Neri *et al.*, 2015; Smeets *et al.*, 2008; Van der Meide y Schellekens, 1996). Las citoquinas se producen en múltiples tipos celulares como los cardiomiocitos, macrófagos, mastocitos, fibroblastos, hepatocitos, adipocitos, células endoteliales y células de músculo liso vascular (CMLV) entre otros (Colombo *et al.*, 2012; Galkina y Ley, 2009; Neri *et al.*, 2015).

La aldosterona está asociada con un proceso inflamatorio donde las citoquinas juegan un papel muy importante. Así, en situaciones donde existe un exceso de aldosterona, hay un aumento de linfocitos T activados y de macrófagos. Estos tipos celulares van a generar gran cantidad de citoquinas, siendo el TNF $\alpha$ , la IL6 o el IFN $\gamma$  las más representativas (Gilbert y Brown, 2010; Munoz-Durango *et al.*, 2015). Numerosos estudios relacionan la sobreactivación del RM con el aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y con el infiltrado y adhesión de células del sistema inmune, como los macrófagos, implicados también en el desarrollo de los procesos de

fibrosis (Gilbert y Brown, 2010; Munoz-Durango *et al.*, 2015). La aldosterona es un potente activador del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF $\kappa$ B), un importante factor de transcripción pro-inflamatorio (Johar *et al.*, 2006). La activación de NF $\kappa$ B por la aldosterona induce la producción de moléculas de adhesión como la proteína quimio-atrayente de monocitos tipo 1 (MCP1) y citoquinas pro-inflamatorias como IL6, entre otras (Gilbert y Brown, 2010; Pacurari *et al.*, 2014).

#### 2.3.2.1 Cluster de diferenciación 68, CD68

El CD68 es una glucoproteína que se expresa específicamente en la membrana plasmática de los macrófagos, siendo uno de los marcadores más utilizados a la hora de valorar la presencia de estas células del sistema inmune, fundamentales en el proceso de inflamación (Di Gregorio *et al.*, 2005; Fink *et al.*, 2014; Paulsen *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que un exceso de aldosterona está relacionado con el desarrollo de lesiones de origen inflamatorio en el miocardio hipertrófico, donde existe un aumento en la infiltración de macrófagos en el tejido (Yoshida *et al.*, 2005). Además, los macrófagos son células efectoras indispensables en el proceso de remodelado y fibrosis. Por un lado, suponen la principal fuente de muchos tipos de MMPs y por otro lado, son células muy importantes en la producción de TGF $\beta$  y por tanto, activan a través de éste, la expresión local de genes pro-fibróticos como el CTGF (Van Linthout *et al.*, 2014).

### 2.3.2.2 Factor de necrosis tumoral alfa, TNF $\alpha$

El TNF $\alpha$  es una citoquina que posee múltiples efectos, como la activación del factor NF $\kappa$ B, formando parte de la respuesta inflamatoria (Parameswaran y Patial, 2010; Warren *et al.*, 1988). Se ha demostrado un incremento de la expresión cardíaca del TNF $\alpha$  en situaciones patológicas como la HC, la disfunción del ventrículo izquierdo y el edema pulmonar, donde se ha relacionado con un efecto inotrópico negativo y la apoptosis de los cardiomiocitos (Madonna *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 1997). Todo ello hace suponer que la sobreexpresión de esta citoquina en el miocardio está asociada a la infiltración de macrófagos y está contribuyendo al remodelado cardíaco y la disfunción progresiva del ventrículo izquierdo que tienen lugar en la IC. Así mismo, se ha comprobado que la elevación de los niveles circulantes del TNF $\alpha$ , junto con niveles altos de aldosterona en plasma, son característicos en el desarrollo de la IC (Deswal *et al.*, 2001; Madonna *et al.*, 2014; Pacurari *et al.*, 2014).

### 2.3.2.3 Óxido nítrico sintasa inducible, iNOS

El óxido nítrico (NO) participa en una amplia variedad de procesos, entre los que destacan la vasodilatación, el control de la presión sanguínea y la neurotransmisión (Zamora *et al.*, 2000). Además, está implicado en los mecanismos inmunes de daño tisular, actuando como mediador pro-inflamatorio y apoptótico, fundamentalmente por sus características como radical libre (Moncada, 1999; Pham-Huy *et al.*, 2008). El NO es producido en las células por un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico

sintasas (NOS), entre las cuales se encuentra la NOS inducible o iNOS. La iNOS es la enzima responsable del papel del NO en los procesos inflamatorios, mientras que el resto de NOS son consideradas protectoras o antiinflamatorias como la NOS endotelial o eNOS. En el corazón, la eNOS está relacionada con el mantenimiento de la perfusión coronaria y la regulación de la contractilidad cardíaca (Kojda y Kottenberg, 1999; Rafikov *et al.*, 2011), mientras que la iNOS ha sido implicada en la inhibición de la contractilidad (Kojda y Kottenberg, 1999; Rafikov *et al.*, 2011; Zaragoza *et al.*, 1998). Todas las NOS producen NO, sin embargo, el efecto es diferente según el tipo de enzima implicada debido a la cantidad de NO que son capaces de producir. Así, en el caso de la eNOS, la concentración de NO liberado es del orden nanomolar, lo que está dentro del rango fisiológico; sin embargo, en el caso de la iNOS, puede llegar a alcanzar concentraciones micromolares, lo que está asociado a procesos patológicos, como la disminución en la síntesis de ATP y la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Gonzalez-Cadavid y Rajfer, 2005; Hu *et al.*, 1997; Kojda y Kottenberg, 1999; Soskic *et al.*, 2011). Los cardiomiocitos expresan normalmente tanto la eNOS como la iNOS, sin embargo, la expresión de la iNOS en este tipo celular está asociada a un proceso inflamatorio, ya que está fuertemente estimulada por las citoquinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$ , IL6 e IFN $\gamma$  (Rastaldo *et al.*, 2007) lo que acentúa el papel de la inflamación, también en el desarrollo de efectos inotrópicos negativos por sobreproducción de NO.

El papel de la aldosterona en la producción de NO a través de la iNOS aún no está claro, existiendo datos contradictorios. Así, algunos autores han observado *in vitro* que la aldosterona es un factor inhibidor de la iNOS en los cardiomiocitos (Chun *et al.*, 2003), mientras que otros investigadores han demostrado un aumento de la expresión de la iNOS cardíaca en modelos animales de HC (Somers *et al.*, 2008). Así mismo, se ha demostrado que el bloqueo *in vivo* del RM disminuye la expresión de la iNOS cardíaca en modelos de HC (Kobayashi *et al.*, 2006) y en los riñones de ratas con hiperaldosteronismo (Martin-Fernandez *et al.*, 2016).

### 2.3.3 Alteraciones iónicas en el miocardio

El desarrollo de HC viene acompañado con frecuencia del desajuste en la homeostasis iónica de sodio, potasio y calcio principalmente, viéndose alteradas las corrientes iónicas necesarias para el correcto funcionamiento del ciclo de relajación-contracción, lo que contribuye a la disfunción ventricular y a la aparición de arritmias (Menick *et al.*, 2007; Mraiche *et al.*, 2011). Dicho desajuste en la homeostasis iónica es consecuencia de cambios en la expresión y actividad de proteínas clave en el transporte iónico del cardiomiocito como el NHE1, el  $Ca_v1.2$ , la bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa y el intercambiador de sodio-calcio tipo 1 (NCX1) (Frey *et al.*, 2004; Grant, 2009).

### 2.3.3.1 Intercambiador de sodio-calcio tipo 1, NCX1

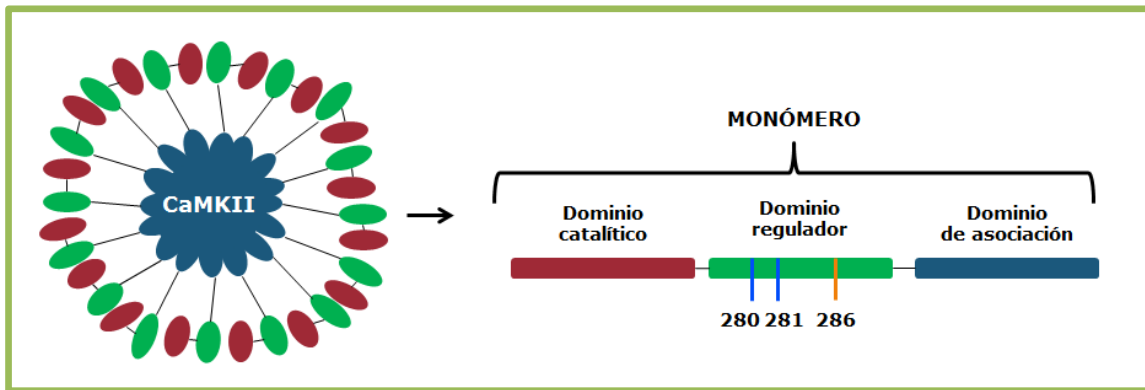
El NCX1 es una proteína integral de membrana implicada en el restablecimiento de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) tras cada contracción. Transporta 3 iones sodio hacia el interior de la célula intercambiándolos por 1 ion calcio, que sale fuera de ella. De esta manera, una vez se ha producido la contracción, la célula expulsa el exceso de calcio intracelular residual que no ha sido recaptado por el retículo endoplasmático (Bers *et al.*, 2003). Además, el NCX1 puede actuar en modo reverso, expulsando sodio e introduciendo calcio, dependiendo del potencial de membrana y las concentraciones intracelulares y extracelulares de sodio y de calcio. Así, una  $[Ca^{2+}]_i$  elevada favorece el modo normal y por tanto la salida de calcio y la entrada de sodio, mientras que una alta concentración de sodio intracelular ( $[Na^+]_i$ ) favorece el modo reverso, expulsando sodio a cambio de la entrada de calcio (Bers, Barry *et al.* 2003). Esta propiedad hace del NCX1 una proteína fundamental en el mantenimiento de la homeostasis iónica, pudiendo adaptar su modo de acción según las necesidades. En el ciclo de contracción-relajación, el NCX1 expulsa exactamente la misma cantidad de calcio que entra al cardiomiocito a través de los canales de calcio  $Ca_v1.2$ ; alrededor de  $8 \mu\text{mol/L}$  por citosol (Bers, 2001). Por lo tanto, pequeños cambios en la actividad del NCX1 alteran significativamente la homeostasis del calcio (Bers, 2001; Menick *et al.*, 2007; Roos *et al.*, 2007).

Numerosas evidencias muestran un aumento en la expresión del NCX1 cardíaco en diferentes modelos animales y en pacientes con HC (Hasenfuss *et al.*, 1994; He *et al.*, 2015; Hobai y O'Rourke, 2001; Menick *et al.*, 2007; Pogwizd *et al.*, 1999). Dicha sobreexpresión podría tener un efecto en las corrientes de calcio que contribuyan a la disfunción diastólica y aumenten el riesgo de arritmias (He *et al.*, 2015; Menick *et al.*, 2007). Además, el hecho de que la homeostasis iónica esté alterada, afecta a la actividad de enzimas muy importantes en la fisiología cardíaca que regulan a su vez proteínas transportadoras de iones y factores de transcripción, favoreciendo aún más el desequilibrio iónico y sus consecuencias patológicas. Entre estas enzimas, destaca la quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2 (CaMKII).

#### 2.3.3.2 Quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2, CaMKII

La CaMKII es una serina-treonina quinasa compuesta por doce monómeros, cada uno de los cuales están formados a su vez por tres dominios: catalítico, regulador y de asociación (figura 7). Esta quinasa está implicada en la regulación de la actividad de numerosos canales iónicos y proteínas transportadoras de sodio, potasio y calcio (como el Ca<sub>v</sub>1.2) por medio de fosforilación, siendo clave en la electrofisiología cardíaca y el acoplamiento EC (Anderson *et al.*, 1994; Cipolletta *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2006). La CaMKII es extremadamente sensible a los cambios en la concentración de calcio, actuando como un sensor indirecto de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; al unir la proteína calmodulina únicamente cuando ésta ha unido a su vez Ca<sup>2+</sup> (formando calcio-calmodulina) (Anderson *et al.*, 2011). En condiciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> basal, la actividad de CaMKII es

prácticamente nula ya que los dominios catalíticos permanecen auto-inhibidos por unión a los dominios reguladores del monómero adyacente, permaneciendo plegados unos sobre otros (Anderson *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Calcio-calmodulina quinasa tipo 2, CaMKII. Esquema de la estructura formada por sus 12 monómeros. Detalle de uno de los monómeros, mostrando sus tres dominios y la posición relativa de los residuos susceptibles a la oxidación (280-281) y auto-fosforilación (286).

La actividad de la CaMKII puede ser modificada por cambios en el equilibrio iónico y redox celular (Erickson, 2014). Así, por ejemplo, una  $[Ca^{2+}]_i$  anormalmente alta, sobreactiva a su vez a la calcio-calmodulina que permanece anclada más tiempo y en más monómeros a la CaMKII, lo que promueve su auto-fosforilación en el residuo treonina 286 de los dominios reguladores (Erickson, 2014) (figura 7). Esta auto-fosforilación de la CaMKII hace que la actividad de la misma aumente en gran medida (Anderson *et al.*, 2011; Erickson, 2014). Por otro lado, un ambiente celular prooxidante sostenido promueve la oxidación de las metioninas 280 y 281 del dominio regulador, aumentando la actividad de la CaMKII (Erickson *et al.*, 2008; Luczak y Anderson, 2014) (figura 7). Entre los factores que alteran la actividad de la CaMKII mediante oxidación se encuentra la aldosterona, que promueve de esta manera la sobreactivación de la quinasa, resultando en un aumento de la apoptosis, la aparición de arritmias y la disfunción cardíaca (He *et al.*, 2011; Velez Rueda *et al.*, 2012).

El aumento en la actividad de la CaMKII promovido por el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  está directamente relacionado con el desarrollo de HC e IC (Anderson *et al.*, 2011). La sobreactivación de la CaMKII promueve a su vez la activación de diversos factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en el desarrollo de la HC mediante el denominado acoplamiento excitación-transcripción (ET) (Bers, 2011). Estudios previos realizados en animales que sobreexpresaron CaMKII en el corazón y desarrollaron HC demostraron que la inhibición de la quinasa por medio de drogas, péptidos o delección génica, frenó el avance de la HC (Anderson *et al.*, 2011; Cipolletta *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha observado que la CaMKII está aumentada en el miocardio hipertrofiado de pacientes con esta patología (Anderson *et al.*, 2011; Cipolletta *et al.*, 2015).

#### **2.3.4 Oxidación miocárdica**

El proceso de oxidación se produce por un aumento exacerbado de los mediadores de oxidación, que llevan al denominado estrés oxidativo. Existen numerosas evidencias que apuntan al estrés oxidativo como uno de los mecanismos más importantes acontecido durante el proceso de remodelado que da lugar al desarrollo de HC e IC (Sawyer *et al.*, 2002; Takimoto y Kass, 2007).

#### 2.3.4.1 Radicales libres

Químicamente, la oxidación se define como la pérdida de uno o más electrones de una molécula. Los radicales libres son especies químicas que han perdido al menos un electrón, dejando desapareado o libre, otro. El electrón desapareado tiene la propiedad de ser extremadamente inestable y por tanto hace que la molécula sea muy reactiva. Este electrón libre tiende a aparearse rápidamente con otro electrón de cualquier otra molécula para estabilizarse, alterando así, la estructura y función de dicha molécula (Pham-Huy *et al.*, 2008). A pesar de su reducida vida media, estas reacciones se producen frecuentemente en cadena, lo que supone una amplificación del daño (Pham-Huy *et al.*, 2008).

#### 2.3.4.2 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

En su gran mayoría, los radicales libres provienen del oxígeno, tomando la denominación genérica de especies reactivas de oxígeno o ROS por sus siglas en inglés. El oxígeno molecular tiene dos electrones desapareados en los orbitales moleculares más externos, sin embargo, químicamente es bastante estable. El oxígeno puede ser reducido por cuatro transferencias sucesivas de un electrón, dando lugar a los radicales libres anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e hidroxilo, así como a la especie no radical, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Este proceso se denomina reducción univalente del oxígeno (Bers, 2001) (figura 8).

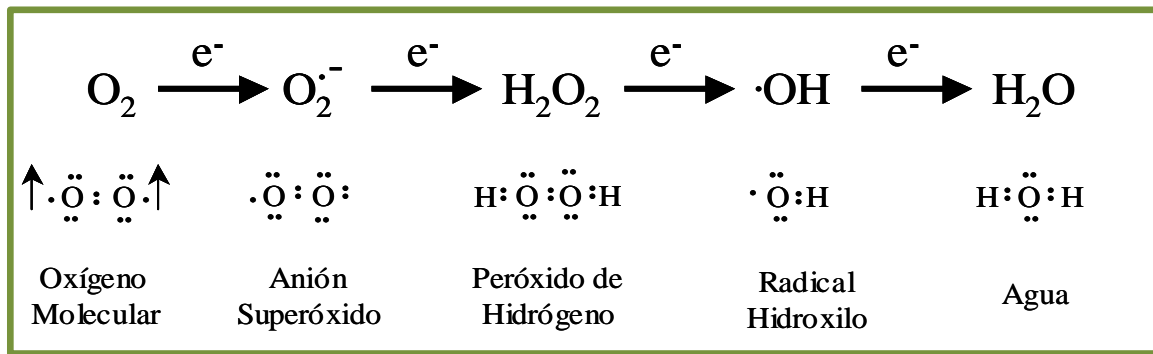


Figura 8. Reducción univalente del oxígeno.

Una de las ROS más importantes por sus acciones biológicas es el NO. El NO es un radical libre que a concentraciones elevadas (por ejemplo, en la sobreestimulación de la iNOS), está implicado en procesos de daño celular relacionados con la inflamación. Sin embargo, dicha acción patológica no puede ser atribuida exclusivamente a la molécula de NO, ya que su capacidad reactiva es mucho menor que, por ejemplo, la de  $\cdot O_2^-$  (Beckman y Koppenol, 1996). Sin embargo, el NO puede combinarse con el  $\cdot O_2^-$  formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Este compuesto, aunque no es un radical libre, es mucho más reactivo que el anión superóxido y que el NO por separado y ha sido señalado como el verdadero responsable de la acción perjudicial del exceso de NO (Beckman y Koppenol, 1996). El peroxinitrito, por medio de reacciones oxidativas, altera la estructura y por tanto la función de lípidos, ADN y proteínas, lo que lleva a cambios patológicos en la señalización celular, agravando el daño oxidativo y produciendo necrosis y apoptosis. La generación de peroxinitritos representa un mecanismo patogénico crucial en condiciones como el IAM, la HC, la IC, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas (Pacher *et al.*, 2007).

A continuación se describen brevemente las principales ROS que se encuentran en los sistemas biológicos (tabla 1).

<b>RADICALES LIBRES</b>		
<i>ESPECIES REACTIVAS</i>	<i>FÓRMULA</i>	<i>FORMACIÓN</i>
<b>Radical superóxido</b>	$\cdot\text{O}_2^-$	Reducción de un electrón del $\text{O}_2$ en estado basal
<b>Radical hidroperoxilo</b>	$\text{HOO}\cdot$	Protonación del radical superóxido
<b>Radical hidroxilo</b>	$\cdot\text{OH}$	Reducción de un electrón del peróxido de hidrógeno y reducción de 3 electrones del $\text{O}_2$ en estado basal
<b>Óxido nítrico o monóxido de nitrógeno</b>	$\text{NO}$	Reducción de un electrón del nitrito
<b>Radical alcoxilo</b>	$\text{RO}\cdot$	Reducción de un electrón del hidroperoxilo
<b>Radical peroxilo</b>	$\text{ROO}\cdot$	Oxidación de un electrón del hidroperoxilo
<b>ESPECIES NO RADICALES</b>		
<i>ESPECIES REACTIVAS</i>	<i>FÓRMULA</i>	<i>FORMACIÓN</i>
<b>Peróxido de hidrógeno</b>	$\text{H}_2\text{O}_2$	Reducción de 2 electrones del $\text{O}_2$ en estado basal, seguida de protonación del ión peróxido
<b>Peroxinitrito</b>	$\text{ONOO}^-$	Reacción del $\text{NO}$ con $\cdot\text{O}_2^-$
<b>Hidroperoxilo</b>	$\text{ROOH}$	Autooxidación y oxigenación con $\text{O}_2$ de compuestos insaturados
<b>Ácido hipocloroso</b>	$\text{HClO}$	Hidrólisis del cloro molecular
<b>Ozono</b>	$\text{O}_3$	Oxidación de $\text{O}_2$ en estado basal con oxígeno atómico formado por fotólisis del oxígeno molecular en estado basal

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno más representativas de los sistemas biológicos.

El estrés oxidativo se produce cuando el exceso de especies reactivas oxidantes generado supera la capacidad celular de neutralizar este tipo de moléculas inestables y altamente reactivas, por medio de los sistemas antioxidantes endógenos. La generación de especies reactivas forma parte de procesos fisiológicos, como por ejemplo la fosforilación oxidativa, donde alrededor de un 2% del oxígeno empleado por la mitocondria no es reducido completamente, y se escapa del sistema en forma de  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , siendo además importante en el control redox normal de algunas rutas de señalización molecular (Sawyer *et al.*, 2002). Sin embargo, el exceso de especies reactivas resulta en disfunción celular, déficit energético, peroxidación lipídica y mutagénesis en el ADN, que pueden llevar a daños irreversibles e incluso a la muerte celular (Murdoch *et al.*, 2006).

#### **2.3.4.3 Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, NADPHox**

La NADPHox cataliza la reacción de transferencia de un electrón desde el cofactor NADPH hasta el oxígeno para generar  $\bullet\text{O}_2^-$  durante el proceso de defensa activa del organismo frente a la infección por bacterias y hongos (Montezano y Touyz, 2012). Esta enzima también está presente en diversos tipos celulares como el endotelio, las plaquetas, los fibroblastos, los cardiomiocitos, las células mesangiales y el cuerpo carotídeo, siendo considerada actualmente como la principal fuente de  $\bullet\text{O}_2^-$  en el sistema cardiovascular (Jones *et al.*, 1996; Meier *et al.*, 1991; Montezano y Touyz, 2012; Seno *et al.*, 2001).

Cada NADPHox contiene una subunidad catalítica transmembrana denominada gp91phox o Nox, existiendo 5 isoformas descritas (Nox 1-5), que son codificadas por genes distintos (Lambeth, 2004). Cada subunidad Nox forma un heterodímero con la subunidad transmembrana p22phox, constituyendo un núcleo catalítico heterodimérico (o citocromo b558) donde ocurre la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno resultando, como se ha indicado, en la formación de  $\bullet\text{O}_2^-$ . La subunidad p22phox es importante ya que sin su participación, la actividad de la NADPHox se ve anulada (Sardina *et al.*, 2010; Ushio-Fukai *et al.*, 1996). La función principal de esta subunidad es la de estabilizar la subunidad Nox y favorecer las uniones entre la subunidad Nox y las subunidades citosólicas p47phox y p67phox (Dahan *et al.*, 2002). Esta subunidad se expresa a bajos niveles en situaciones fisiológicas pero en condiciones fisiopatológicas como en la HTA, la arterioesclerosis, la HC y la IC se produce un aumento de expresión inducido por factores tanto hemodinámicos como humorales, jugando un papel fundamental en la generación de ROS asociado a enfermedad (Li *et al.*, 2002). Por ejemplo, se ha demostrado que la tensión por estiramiento de la pared vascular es capaz de aumentar la expresión de la p22phox (Birukov, 2009). Respecto a los factores humorales hay diversas sustancias implicadas en el aumento de la expresión de esta subunidad como la AII (Cediel *et al.*, 2003; Sardina *et al.*, 2010) o la aldosterona, que activa su transcripción directamente una vez unida al RM (Bayorh *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2002).

### 3. ANTIOXIDANTES NATURALES

El exceso de especies reactivas produce una serie de cambios en la estructura y propiedades químicas de las distintas macromoléculas alterando su función, siendo por tanto, altamente perjudiciales (Ahmad *et al.*, 2013). A nivel celular, existe una batería de mecanismos de defensa para protegerse de la acción de dichas especies, generalmente conocidos como enzimas antioxidantes. Dichas enzimas actúan evitando la formación de las ROS, neutralizándolas o facilitando la reparación del daño inducido. Entre las más importantes destacan la superóxido dismutasa tipo 1 (SOD1), que constituye la primera línea de defensa enzimática frente a la producción de anión superóxido, catalizando la dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular; la glutatión peroxidasa, que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a agua junto con la oxidación del glutatión, y la catalasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua (Ahmad *et al.*, 2013; Douiri *et al.*, 2016).

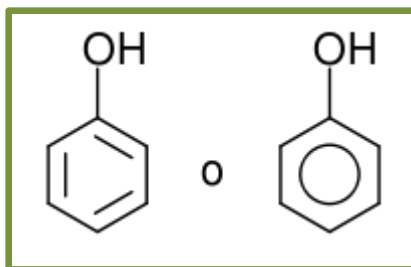
Además de los sistemas antioxidantes endógenos, existen compuestos naturales con un alto poder antioxidante que son aportados al organismo mediante la ingesta de, sobre todo, vegetales y sus productos derivados. Entre los antioxidantes naturales más importantes destacan, tanto por su ubicuidad como por sus propiedades beneficiosas, los polifenoles, un tipo de metabolito secundario de las plantas (Landete, 2012).

## 3.1 Polifenoles

Los polifenoles son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta y se les han atribuido efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Quinones *et al.*, 2013; Scalbert *et al.*, 2005), por lo que han despertado un gran interés desde el punto de vista científico y nutricional.

### 3.1.1 Estructura y propiedades químicas del fenol

Las propiedades como antioxidantes de los polifenoles se deben a su estructura química fundamental, el fenol (Flora, 2009). Éste está formado por un anillo de benceno unido a un grupo hidroxilo (OH) (figura 9). El anillo de benceno está constituido por seis átomos de carbono unidos entre sí mediante enlaces dobles y simples alternos, configurándose en un plano. Sin embargo, los electrones de los dobles enlaces del anillo de benceno no son estáticos, ya que pueden moverse libremente alrededor de un enlace a otro: se dice que están deslocalizados, y se representan como un círculo dentro del esqueleto de carbono (figura 9). Esta propiedad hace que dichos electrones puedan donarse con facilidad, pero a la vez, sean estables debido al fenómeno de deslocalización electrónica (Beecher, 2003; Teixeira *et al.*, 2005).



**Figura 9.** Estructura química del fenol.

Gracias a la deslocalización electrónica del anillo de benceno y al grupo hidroxilo, los polifenoles tienen una acción antioxidante potente, que se da mediante dos mecanismos: reacción SET (*single electron transfer*) y reacción HAT (*hydrogen atom transfer*). En la reacción SET, debido a la gran reactividad como donante de electrones desde el anillo de benceno, los polifenoles ceden electrones a los radicales libres con electrones desapareados. De esta manera, al haber ganado un electrón, el radical libre pasa a tener todos sus electrones apareados y se estabiliza, perdiendo su capacidad reactiva. En la reacción HAT, los polifenoles ceden un átomo de hidrógeno (esto es, un electrón con su protón) desde sus grupos hidroxilo, con lo cual el radical libre se estabiliza de igual manera que en la reacción SET, pero ganando un átomo de hidrógeno (Choe y Min, 2006). Como resultado de ambas reacciones, el polifenol se oxida formando a su vez un radical que, a diferencia de los radicales libres prooxidantes y reactivos, son estables, debido fundamentalmente a que el electrón desapareado queda deslocalizado gracias a la resonancia del anillo de benceno (Choe y Min, 2006; Hotta *et al.*, 2002).

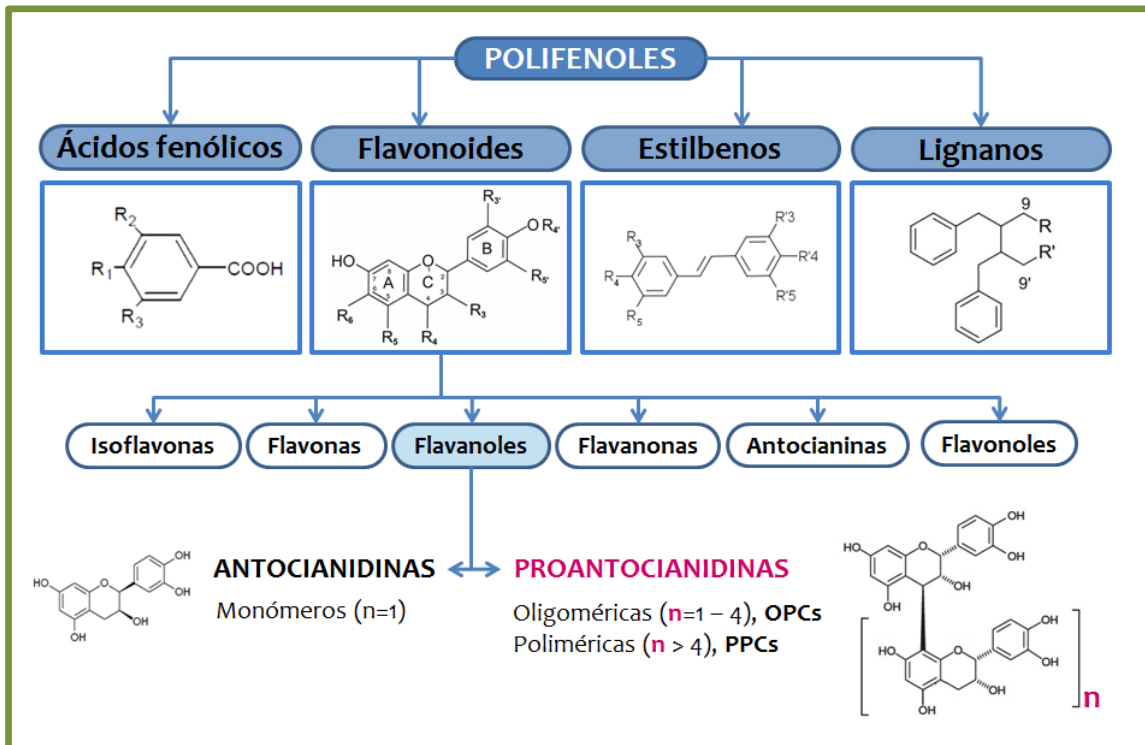
### 3.1.2 Tipos de polifenoles

Se han descrito más de 8.000 polifenoles distintos que pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de grupos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a ellos. Las principales clases de polifenoles, por ser los más ampliamente distribuidos en los alimentos son: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Manach *et al.*, 2004) (figura 10). Los polifenoles también pueden aparecer en formas conjugadas con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático, aunque también pueden encontrarse asociados a otros compuestos (Manach y Donovan, 2004).

El tipo de polifenoles más abundante en los vegetales son los flavonoides, habiéndose identificado más de 4.000 compuestos diferentes (Birt y Jeffery, 2013). Su principal característica estructural es la de poseer 2 anillos de benceno que están ligados entre sí formando generalmente un heterociclo oxigenado (figura 10). En función de sus características estructurales, los flavonoides pueden dividirse en isoflavonas, flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas y flavanoles (Manach *et al.*, 2005) (figura 10).

A su vez, los flavanoles (también llamados flavan-3-oles) han destacado en los últimos años debido a la relación entre su consumo y una mejor salud cardiovascular (Basu *et al.*, 2010; Vogiatzoglou *et al.*, 2014). Dentro del grupo de los flavanoles, se distinguen dos clases: monómeros, llamados antocianidinas (o catequinas, de manera

genérica, al ser ésta la antocianidina más abundante), y sus polímeros, denominados proantocianidinas (figura 10).



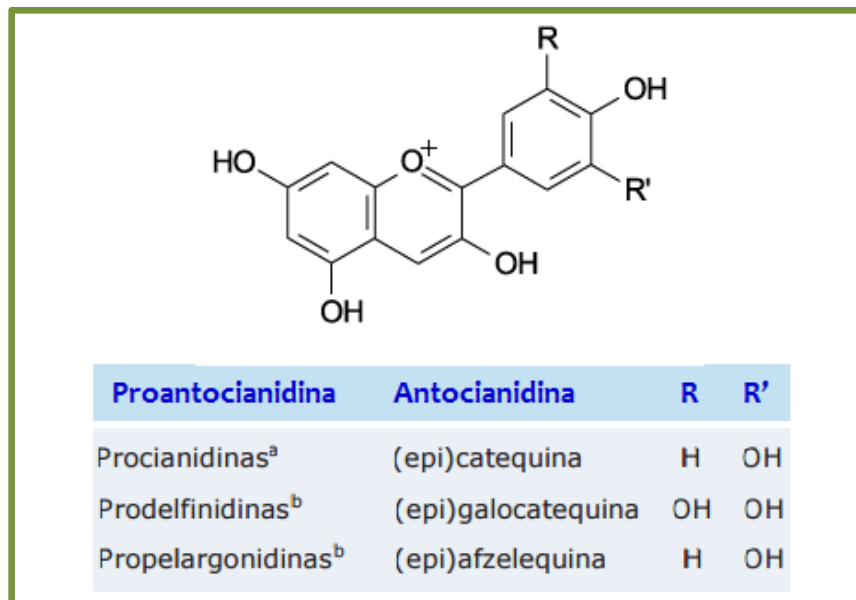
**Figura 10.** Clasificación y estructura de los polifenoles. Tipos de flavonoides y estructura de los flavanoles. OPCs, proantocianidinas oligoméricas; PPCs, proantocianidinas poliméricas.

## 3.2 Proantocianidinas

### 3.2.1 Clasificación de las proantocianidinas

Las proantocianidinas son un tipo de flavanol polimérico constituido por unidades de antocianidinas. Se clasifican a su vez en proantocianidinas oligoméricas u OPCs, (dímeros, trímeros, tetrámeros o pentámeros de la correspondiente antocianidina), y

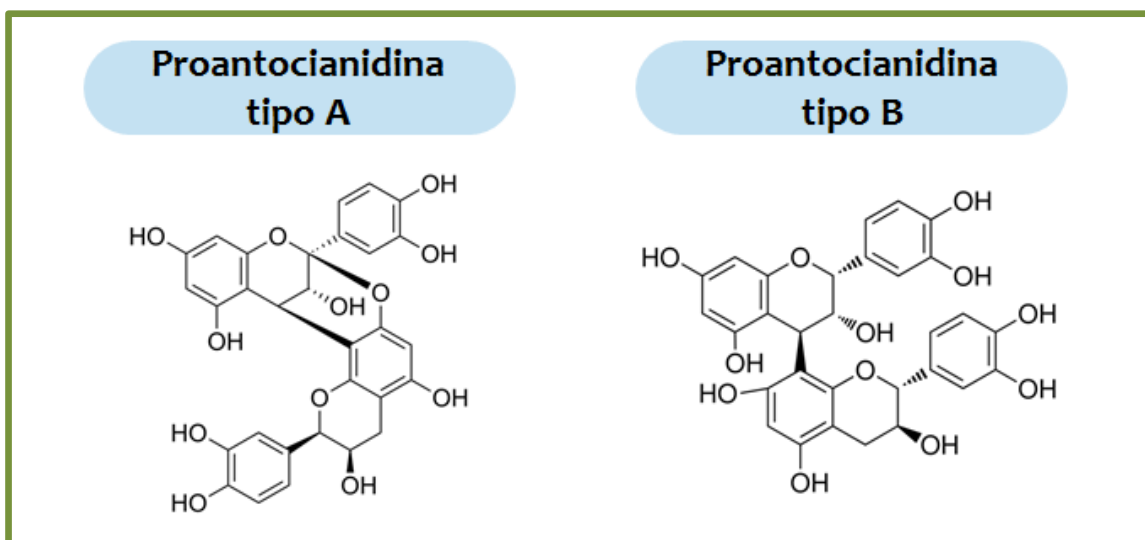
proantocianidinas poliméricas o PPCs, también llamadas taninos condensados (formados por seis o más antocianidinas) (de la Iglesia *et al.*, 2010). Las proantocianidinas pueden presentar una estructura homogénea, constituida por unidades de una única antocianidina, o ser mixto; sin embargo, por ser las más comunes en todos los vegetales, destacan ampliamente las procianidinas, un tipo de proantocianidina cuya unidad monomérica o antocianidina recibe el nombre de catequina o epi-catequina, según su isomería (Prior y Gu, 2005) (figura 11).



**Figura 11.** Estructura genérica de las antocianidinas y tipos más comunes de proantocianidinas y sus antocianidinas constitutivas, según el sustituyente en R y R'. a, sólo formadas por unidades de (epi)catequina; b, formadas por al menos una unidad diferente a (epi)catequina.

Dentro de las OPCs con mayor actividad biológica, destacan las proantocianidinas diméricas. Éstas pueden ser de tipo A o B, según el tipo de unión entre los monómeros de antocianidinas. En las de tipo B, las antocianidinas se encuentran unidas por el enlace carbono-carbono C4-C6 o C4-C8, siendo éste último el más común. En las de

tipo A, además de encontrarse el anterior enlace, existe una unión adicional entre el C2 y el hidroxilo del C7, principalmente (figura 12) (Hummer y Schreier, 2008). Las proantocianidinas de tipo B se encuentran en muchas especies de plantas, como semillas de uva, manzana, cacao, corteza de pino, etc., mientras que son escasas las fuentes naturales en las que se han identificado proantocianidinas de tipo A. Las proantocianidinas de tipo A son más resistentes a la despolimerización que las de tipo B, por lo que su acción biológica como dímero es más duradera (Gu *et al.*, 2003). A su vez, según el tipo de isómeros constituyentes, las proantocianidinas tipo A se clasifican en A1 (epi-catequina-(2-O-7, 4-8)-catequina) y A2 (epi-catequina-(2-O-7, 4-8)-epi-catequina), habiendo hasta ocho tipos distintos de proantocianidinas tipo B, siendo la B1 (epi-catequina-(4-8)-catequina) y la B2 ((-)-epi-catequina-(4-8)-(-)-epi-catequina), las más representativas (Ou *et al.*, 2012).



**Figura 12.** Estructura representativa de las proantocianidinas según el tipo de enlace, A o B.

### 3.2.2 Efectos beneficiosos de las proantocianidinas

La capacidad de las proantocianidinas para disminuir el estrés oxidativo y la inflamación ha sido estudiada extensamente. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que estos polifenoles reducen la concentración de ROS y la producción de NO (Kruger *et al.*, 2014), teniendo una capacidad antioxidante superior a la vitamina C y E (Joshi *et al.*, 2001). Este efecto viene acompañado de un aumento en la actividad de enzimas clave en la respuesta frente al estrés oxidativo, como son la SOD1 y la catalasa (Chiang *et al.*, 2006) teniendo además, un efecto inhibitor de enzimas pro-oxidantes como la NADPHox (Alvarez *et al.*, 2012). Así mismo, las proantocianidinas han mostrado tener un efecto inmuno-regulador, disminuyendo los niveles séricos del MCP1, así como del TNF $\alpha$  y la IL-10, en modelos de inflamación crónica y de obesidad (Prior *et al.*, 2009).

Se ha demostrado tanto en modelos animales como en humanos, que las proantocianidinas ejercen múltiples efectos beneficiosos más allá de sus características como antioxidantes (comunes a todos los polifenoles), como por ejemplo, propiedades anticancerígenas, antimicrobianas (como la inhibición de la adhesión bacteriana al tracto urinario), antivirales y neuroprotectoras (Bagchi *et al.*, 2000; Foo *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002). Igualmente, numerosos estudios epidemiológicos apuntan a que las proantocianidinas tienen importantes efectos beneficiosos tanto en la prevención como en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Bagchi *et al.*, 2003). En este sentido, a nivel vascular se ha demostrado que las proantocianidinas inhiben la producción de mediadores pro-inflamatorios y fibróticos, tienen capacidad

antitrombótica, mejoran la vasodilatación, previenen la disfunción endotelial y disminuyen la PA (Cassidy *et al.*, 2011; Kruger *et al.*, 2014). Así mismo, mejoran el perfil lipídico y reducen el riesgo de aterosclerosis al disminuir los niveles de LDL y aumentar los niveles de HDL, además de reducir la absorción lipídica intestinal y los niveles de VLDL, tanto en humanos como en animales (Blade *et al.*, 2010).

La suplementación de extractos ricos en proantocianidinas han demostrado ser beneficiosos en modelos de IAM, mejorando la función cardíaca, reduciendo el tamaño de la zona infartada y disminuyendo la fibrilación ventricular y taquicardia post-infarto (Bagchi *et al.*, 2003). En modelos animales de HC, dichos extractos mejoraron los parámetros hemodinámicos, disminuyeron la hipertrofia, la expresión de MMPs, el remodelado cardíaco así como la fibrosis y la apoptosis miocárdica (Zuo *et al.*, 2011). Los datos recogidos en la literatura sugieren un papel cardioprotector de las proantocianidinas que podría estar relacionado directamente con una menor incidencia de enfermedad cardiovascular (Kruger *et al.*, 2014).

### **3.2.3 Mecanismos de acción de las proantocianidinas**

Varios estudios han demostrado que las proantocianidinas interactúan con un amplio espectro de dianas moleculares claves en el funcionamiento de la célula, que explicarían los efectos beneficiosos comentados anteriormente. Entre dichas dianas, destacan la modulación de vías moleculares como la vía MAPK/ERK; la actividad de algunas quinasas, como la PKC; la activación de factores de transcripción como los

PPARs o el Nrf2, implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y la respuesta antioxidante respectivamente, o la inhibición de factores relacionados con la inflamación crónica y la enfermedad cardiovascular, como el caso de NFκβ (Fraga y Oteiza, 2011; Williams *et al.*, 2004). Además, las proantocianidinas tienen la capacidad de modular la expresión de importantes genes implicados en la supervivencia celular, como Bax, Bcl2, p53 y c-myc (Fraga y Oteiza, 2011; Williams *et al.*, 2004).

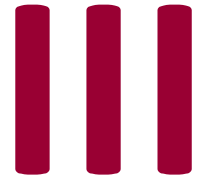
### **Bloqueo del receptor de mineralocorticoides**

Uno de los mecanismos de acción descritos para los efectos beneficiosos cardiacos de las proantocianidinas es el bloqueo del RM.

En un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación realizado en un modelo de HC producido por aldosterona en ratas, se observó que el tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas procedente de la piel de almendras mejoraba la función cardíaca y disminuía la expresión del SGK1 así como la expresión del RM en células estimuladas con aldosterona (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a). Así mismo, los efectos beneficiosos encontrados fueron comparables a los obtenidos con el tratamiento con el antagonista del RM clásico, espironolactona. Dichas evidencias sugieren que los efectos beneficiosos cardiacos podrían deberse a una probable actuación de las proantocianidinas como antagonista del RM.







# **Justificación, Hipótesis y Objetivos**

---







## 1. JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios han demostrado que los niveles elevados de aldosterona están relacionados con el desarrollo de hipertensión arterial, hipertrofia e insuficiencia cardíaca, promoviendo mecanismos como el estrés oxidativo, la inflamación, la fibrosis y el desequilibrio iónico. En el riñón, la aldosterona activa el RM induciendo la expresión del factor SGK1, de los transportadores de sodio y potasio, ENaC y ROMK, y de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ , estimulando en consecuencia la reabsorción renal de sodio y la excreción de potasio. Se ha demostrado que la aldosterona estimula la expresión cardíaca del SGK1, sin embargo sus efectos sobre los transportadores iónicos cardíacos demostrados a nivel renal no han sido estudiados en el corazón. Además, la activación del RM cardíaco por la aldosterona promueve cambios en la expresión y/o actividad de proteínas implicadas en el transporte de sodio y calcio como el NHE1,  $\text{Ca}_v1.2$ , NCX1 y CaMKII, lo que está relacionado con un equilibrio iónico desajustado. En estudios previos se han descrito los efectos cardioprotectores de las proantocianidinas, sin embargo los mecanismos moleculares implicados en sus efectos beneficiosos no son bien conocidos. En un estudio previo realizado en ratas a las que se les administró aldosterona, se propuso un posible papel de las proantocianidinas como antagonistas del RM ya que éstas redujeron la expresión cardíaca del SGK1 y la sobreexpresión del RM en células estimuladas con aldosterona. Por ello, nos propusimos estudiar los posibles efectos beneficiosos de las proantocianidinas sobre la expresión de mediadores cardíacos implicados en el transporte de sodio, potasio y calcio en ratas a las que se les administró aldosterona.

## 2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que la activación del RM cardíaco por la aldosterona induce la expresión del SGK1 promoviendo el desequilibrio iónico en el corazón, y dado que las proantocianidinas podrían tener un efecto antagonista del RM, nos planteamos las siguientes hipótesis:

1. La aldosterona podría alterar la expresión de los principales mediadores implicados en el transporte iónico en el corazón de la rata.
2. Las proantocianidinas podrían prevenir las alteraciones en la expresión de dichos mediadores cardíacos en ratas a las que se les administre aldosterona.

## 3. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de las proantocianidinas sobre la expresión de mediadores cardíacos implicados en el transporte iónico y el consecuente desequilibrio iónico en el corazón de ratas a las que se les administró aldosterona.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar las alteraciones cardíacas estructurales, funcionales y moleculares (oxidación, inflamación y fibrosis) inducidas por la administración de aldosterona en ratas.
2. Estudiar el efecto de las proantocianidinas sobre las alteraciones cardíacas estructurales, funcionales y moleculares mencionadas inducidas por la aldosterona en ratas.
3. Estudiar la expresión de mediadores cardíacos implicados en el transporte de sodio, potasio y calcio en ratas a las que se les administró aldosterona.
4. Estudiar el efecto de las proantocianidinas sobre la expresión de los mediadores cardíacos mencionados en ratas a las que se les administró aldosterona.
5. Estudiar y comparar los efectos de la co-incubación con proantocianidinas y espironolactona en células cardíacas estimuladas con aldosterona.







**IV**

**Material y Métodos**

---







## 1. MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

El estudio se llevó a cabo en ratas macho Wistar (Harlan Ibérica, Barcelona, España) con un peso inicial medio de 250g. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas de la Universidad Complutense de Madrid y de la Unión Europea para el tratamiento ético de los animales de experimentación siguiendo el Real Decreto 53/2013. Los animales utilizados en el presente trabajo se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, bajo condiciones controladas de temperatura (entre 20 y 22°C), humedad (entre un 50 y un 60%) y con acceso libre a comida y agua. Se utilizaron 32 animales divididos en 4 grupos experimentales (figura 13) con un N=8 por grupo:

- Grupo control (**CONTROL**). Se utilizaron animales a los que se les administró, mediante una inyección subcutánea diaria, 0.1 mL de vehículo (aceite de girasol).
- Grupo aldosterona (**ALDO**). Los animales recibieron una dosis de 1500µg/Kg/día de aldosterona (Sigma Aldrich, Madrid, España) disuelta en 0.1mL de aceite de girasol, mediante inyección subcutánea, recibiendo además NaCl al 1% en el agua de bebida.

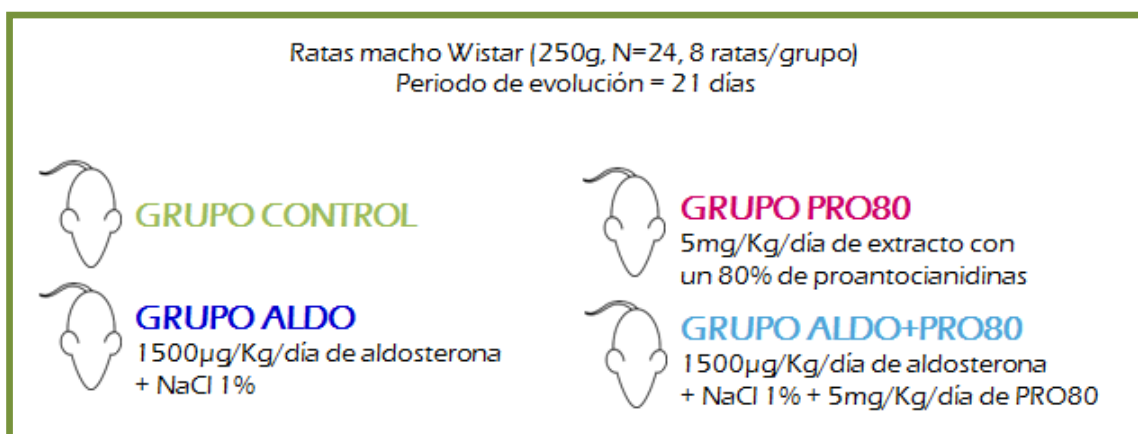
- Grupo proantocianidinas (**PRO80**). Las ratas de este grupo recibieron una dosis de 5mg/Kg/día de un extracto de arándano rojo americano (Natac Biotech, Madrid, España), disuelto en el agua de bebida. La composición del extracto se muestra a continuación (tabla 2).

Composición de PRO80 (%)	
Proantocianidinas	80
Catequinas	6,4
Epicatequinas	4,3
Antocianinas	3,2
Ácidos benzoicos	2,7
Ácidos cinámicos	1,8
Maltodextrina	0,9
Pectinas	0,7

**Tabla 2.** Composición de PRO80 y porcentaje de cada uno de sus compuestos

- Grupo aldosterona más proantocianidinas (**ALDO+PRO80**). Los animales recibieron una inyección subcutánea de aldosterona de 1500µg/Kg/día junto con NaCl al 1% y fueron tratados con el extracto de arándano rojo americano (5mg/kg/día) al 80% de riqueza en proantocianidinas, en el agua de bebida y de manera concomitante.

El periodo de evolución fue de 21 días.



**Figura 13.** Esquema del modelo experimental animal llevado a cabo.

## 2. PRESIÓN ARTERIAL Y HEMODINÁMICA CARDÍACA

### 2.1 Presión arterial indirecta

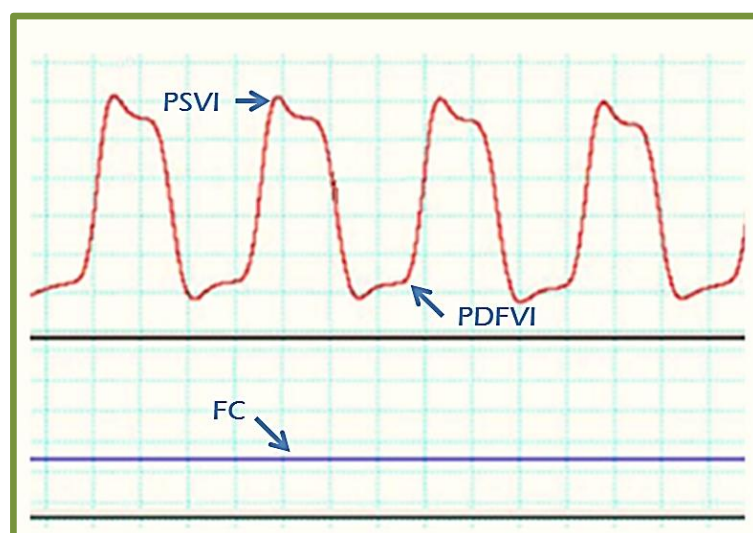
Al inicio del estudio, se determinó la PAS mediante el método indirecto del manguito o “*tail-cuff*” que consiste en la medida de la presión arterial en una arteria periférica en la cola de los animales (arteria caudal) con un electro-esfigmomanómetro (Grieger y Wolter, 1971) de manera que todos los grupos experimentales tuvieran la misma presión inicial media. El método consiste en colocar una goma hinchable alrededor de la cola de la rata y un sensor que permite monitorizar las variaciones de presión provocadas por cambios en el flujo sanguíneo a través del mismo (NARCO Bio-Systems, Houston, Texas, Estados Unidos). El sensor y la goma van conectados a una unidad NIPREM 645 (Cibertec, Madrid, España) que permite hinchar el manguito a distintas intensidades. A su vez, la unidad está conectada a un ordenador, donde, con ayuda del programa informático NIPREM (v1.5, Cibertec, Madrid, España), se registran y analizan las variaciones de la PAS. Se tomaron un mínimo de 10 datos de PAS por rata.

### 2.2 Hemodinámica cardíaca

Los animales se pesaron y anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de Imalgene 1000 (Ketamina 10%) 0.07mg/Kg y Valium (Diazepam) 1mL/Kg (Merial Laboratorios, Madrid, España). A continuación se rasuró el cuello de las ratas, se

desinfectó con alcohol y se realizó una incisión vertical para exponer la carótida derecha. Una vez aislada la arteria, se le realizó un pequeño corte por el cual se introdujo un catéter Sciense FT211B de 1.6F de diámetro (SciSense, Londres, Ontario, Canadá), acoplado a un sistema de adquisición de datos PowerLab800 (ADInstruments, Nueva Gales del Sur, Australia) conectado a un ordenador. Las señales fueron monitorizadas durante 10 minutos a través del programa Chart (v4.2, ADInstruments, Nueva Gales del Sur, Australia).

En primer lugar, se registró la PAS y la presión PAD de la carótida derecha y a continuación se introdujo el catéter avanzando a través de la arteria, hasta alcanzar el interior del ventrículo izquierdo. Una vez allí, se dejó un tiempo de estabilización de 10 minutos. A continuación, se comprobó la integridad de la válvula aórtica retirando el catéter del ventrículo y registrando nuevamente la presión arterial. El registro de las señales (figura 14) quedó almacenado para su posterior análisis.



**Figura 14.** Registro representativo de la cateterización del ventrículo izquierdo. En rojo, se representan las presiones intraventriculares en mmHg y en azul la frecuencia cardíaca en latidos por minuto (lpm). PSVI: presión sistólica del ventrículo izquierdo; PDFVI: presión diastólica final del ventrículo izquierdo; FC: frecuencia cardíaca.

Se valoraron los siguientes parámetros:

- PAS (mmHg)
- PAD (mmHg)
- Frecuencia cardíaca, FC (lpm)
- Presión sistólica del ventrículo izquierdo, PSVI (mmHg)
- Presión diastólica final del ventrículo izquierdo, PDFVI (mmHg)

### 3. PESO RELATIVO DEL CORAZÓN

Una vez medidos los parámetros hemodinámicos, los animales fueron sacrificados. A continuación se extrajeron y pesaron los corazones para realizar el cálculo del peso relativo del corazón (PRC), como medida del índice de HC.

- **PRC** = peso del corazón (g) / 100 g de peso corporal

Posteriormente, los corazones fueron seccionados transversalmente, destinando una de las piezas para estudios histológicos y la otra para estudios de biología molecular.

## 4. HISTOLOGÍA CARDÍACA

Las secciones de tejido destinadas a histología se fijaron en etanol al 70%. A continuación, se incluyeron en parafina formando bloques para su tallado en secciones de 4 micras de grosor con un microtomo de rotación Leitz 1512 (Imeb Inc., San Marcos, California, Estados Unidos). Las secciones se estiraron sobre la superficie de agua previamente calentada a 40º en un baño y fueron adheridas a portaobjetos. Después, se secaron las muestras en estufa durante 15 minutos a 40º, tras lo cual se eliminó la parafina con Xilol (Sigma Aldrich, Madrid, España) y se rehidrataron las muestras con sucesivas inmersiones en etanol al 100%, 96%, 70% y finalmente, con agua destilada.

### 4.1 Contenido de colágeno

Los cortes de corazón se tiñeron con rojo picrosirio (Abcam, Cambridge, Reino Unido), un compuesto que tiñe de rojo las fibras de colágeno. Se realizaron un mínimo de 10 fotos por cada corte teñido con una videocámara conectada a un microscopio óptico con un aumento de 40x (Zeiss, Munich, Alemania). Posteriormente, se valoró la cantidad de colágeno en las imágenes digitales como el área teñida de rojo respecto al área total de tejido con el programa Leica application suite (v4.6, Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como porcentaje del área teñida con rojo sirio respecto al grupo control, al que se le asignó el valor de 100%.

## 4.2 Contenido de calcio

Para determinar el contenido de calcio cardíaco, las secciones histológicas de corazón se tiñeron con rojo de alizarina (Sigma Aldrich, Madrid, España), un compuesto con alta capacidad quelante del ion calcio, que una vez unido a éste, da como resultado una tinción anaranjada. Se realizaron un mínimo de 10 fotos por cada corte teñido con una videocámara conectada a un microscopio óptico con un aumento de 40x (Zeiss, Munich, Alemania). A continuación, se valoró el contenido de calcio como el área teñida anaranjada, respecto al área total de tejido con el programa Leica application suite (v4.6, Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como porcentaje del área teñida con rojo alizarín respecto al grupo control, al que se le asignó el valor de 100%.

## 5. CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron células H9c2 (H9c2(2-1), ATCC CRL-1446, ATCC, Londres, Reino Unido), una línea comercial de células procedentes de miocardio ventricular embrionario de rata que exhibe propiedades de músculo esquelético (Kimes y Brandt, 1976) siendo un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la HC *in vitro* (Watkins *et al.*, 2011).

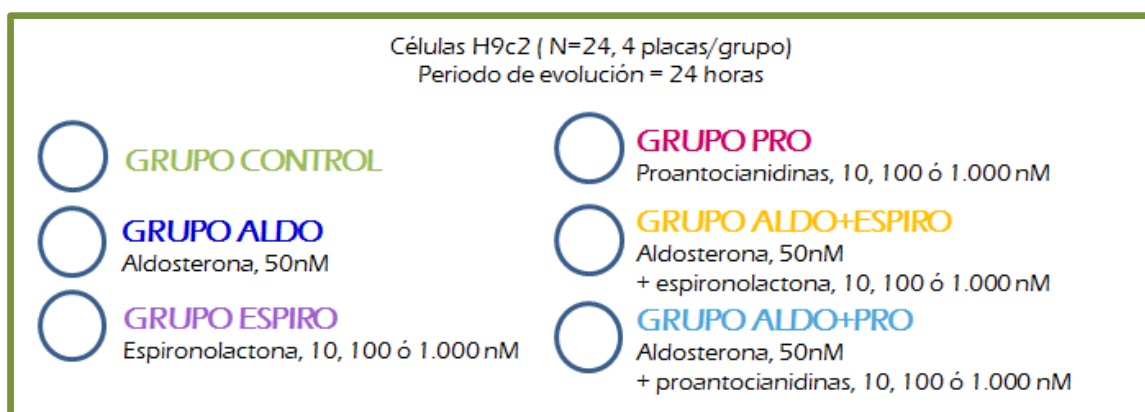
## 5.1 Mantenimiento de la línea celular

Las células H9c2 se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio base Dulbecco *Eagle* modificado (DMEM, Sigma Aldrich, Madrid, España) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Biological Industries, Kibbutz, Israel) inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos, junto con 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina y 2mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, Madrid, España). Cuando las células alcanzaron un 70% de confluencia aproximadamente, fueron subcultivadas cada dos días. Para ello, se incubaron con tripsina-EDTA concentrada al 2X (Gibco, Berlín, Alemania) durante 5 minutos a 37°C. Después se añadió medio completo y se subcultivaron en una proporción 1:3. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre los pases número 20 y 30.

## 5.2 Diseño experimental

Las células se sembraron a una densidad de 12.000 células/cm<sup>2</sup>. Transcurridas 24 horas desde la siembra, el medio de cultivo fue sustituido por medio de cultivo 0% en FBS durante 16 horas, tras las cuales, se añadieron los distintos compuestos a estudiar, con un tiempo de incubación de 24 horas para cada condición. Se trabajó con los siguientes grupos experimentales (N=4 por grupo) (figura 15):

- Grupo **CONTROL**. Células sin tratar.
- Grupo aldosterona (**ALDO**). Las células se estimularon con aldosterona (Sigma Aldrich, Madrid, España) a una concentración final de 50nM.
- Grupo espironolactona (**ESPIRO**), como control positivo del tratamiento con proantocianidinas. Las células se incubaron con espironolactona (Sigma Aldrich, Madrid, España) a concentraciones finales de 10nM, 100nM y 1000nM.
- Grupo con proantocianidinas (**PRO**). Las células se incubaron con un patrón de proantocianidinas puro (Natac Biotech, Madrid, España) a concentraciones finales de 10nM, 100nM y 1000nM.
- Grupo aldosterona más espironolactona (**ALDO+ESPIRO**). Las células se pre-incubaron con espironolactona a concentraciones finales de 10nM, 100nM y 1000nM durante 1 hora, tras lo cual, se añadió aldosterona a una concentración final de 50nM.
- Grupo aldosterona más proantocianidinas (**ALDO+PRO**). Las células se pre-incubaron con el patrón de proantocianidinas puro a concentraciones finales de 10nM, 100nM y 1000nM durante 1 hora, tras lo cual, se añadió aldosterona a una concentración final de 50nM.



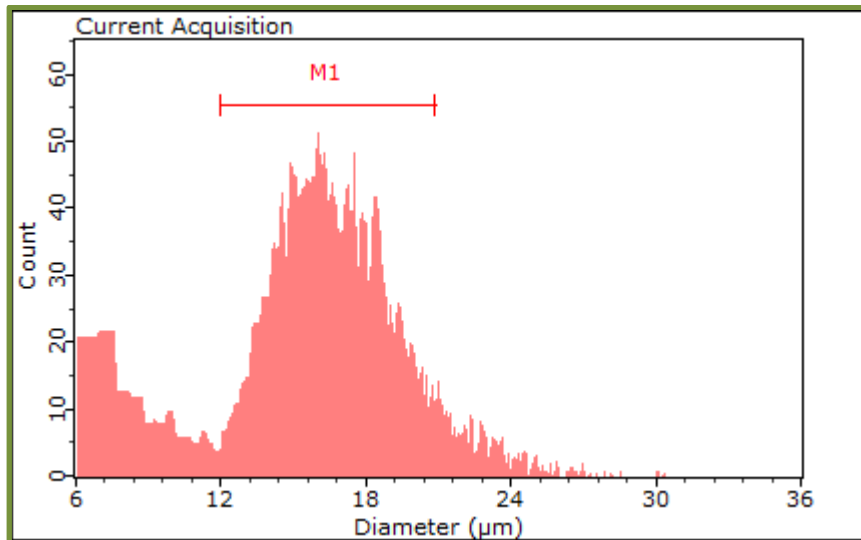
**Figura 15.** Esquema del diseño experimental llevado a cabo en células H9c2.

### 5.3 Supervivencia celular

El porcentaje de supervivencia celular en cada condición experimental se calculó por triplicado 24 horas después de haber estimulado con la aldosterona y co-incubado con los distintos tratamientos en placas de 24 pocillos.

Las células fueron lavadas tres veces con solución de tampón fosfato (PBS) para retirar los restos de células muertas. Posteriormente fueron levantadas con tripsina 2X y homogeneizadas cuidadosamente mediante pipeteo. A continuación se evaluó el número de células vivas mediante el uso de un contador automático (Scepter Handheld Automated Cell Counter, Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) consistente en una micropipeta con puntas que incorporan un chip capaz de cuantificar y clasificar el número de células y su tamaño, en un volumen determinado. Teniendo en cuenta el tipo celular y atendiendo a criterios proporcionados por el fabricante, se consideraron células viables todas aquellas cuyo diámetro se encontraba entre 12 y 20  $\mu\text{m}$ . El grado de supervivencia en cada condición experimental fue expresado en porcentaje respecto al 100% de supervivencia asignado a los controles.

A continuación, se muestra un registro representativo obtenido con el contador automático (figura 16):



**Figura 16.** Registro representativo de un recuento celular con un contador automático. Todas aquellas células cuyo diámetro estuvo comprendido entre el rango de medida M1 (12-18  $\mu\text{m}$ ) fueron consideradas viables, descartando el resto (células muertas y restos).

## 5.4 Cuantificación de anión superóxido

La producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  se valoró mediante el reactivo dihidroetidio (DHE, D2307, Life Technologies, Estados Unidos), un colorante fluorescente sensible al  $\bullet\text{O}_2^-$ . El DHE atraviesa libremente la membrana celular y, mediante reacción con  $\bullet\text{O}_2^-$ , forma etidio, un producto fluorescente rojo que se intercala en el ADN (Vanden Hoek *et al.*, 1997). De esta manera, a mayor cantidad de  $\bullet\text{O}_2^-$  intracelular, más intensa es la señal fluorescente nuclear emitida.

Transcurridas 24 horas después de haber estimulado con la aldosterona y co-incubado con los tratamientos, se añadió DHE a concentración final de  $50\mu\text{M}$  en cada pocillo de una placa p48. A continuación, se incubaron las células durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Cada condición experimental se realizó por cuadruplicado. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con tampón fosfato salino (PBS) y se

tomaron un mínimo de tres imágenes por condición experimental con un microscopio invertido (Leica DM-IL, Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos), con un aumento 40x y acoplado a una unidad de fluorescencia (Leica 106Z, Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos). Debido a que el DHE es sensible a la luz, todos los ensayos se llevaron a cabo en la máxima oscuridad posible. El espectro de excitación del DHE se sitúa en una longitud de onda comprendida entre 500-535 nm (verde en el espectro visible) y el de emisión entre 590-620 nm (rojo visible). Por ello, se aplicó un filtro de excitación en el rango del color verde que permite el paso de energía con una longitud de onda comprendida entre 505 y 535 nm.

Las medias de los valores correspondientes a las intensidades de fluorescencia de cada experimento y condición fueron cuantificadas con el programa Leica application suite (v4.6, Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos). La fluorescencia roja detectada como rojo integrado en cada condición experimental, fue expresada en porcentaje respecto al 100% asignado a los controles.

## 6. EXPRESIÓN PROTEICA

### 6.1 Extracción de proteínas de tejido

Se pesaron 100 mg de corazón procedentes de las secciones destinadas a ensayos de biología molecular y se añadieron 300µL de tampón de lisis. La composición del tampón de lisis incluyó un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, Berlín, Alemania) junto con tampón Tris Base (150mmol/L), cloruro sódico (NaCl, 50mmol/L), tritón X-100 (1% vol/vol), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 3mmol/L) y ditioneitol (DTT, 3mmol/L) (Sigma Aldrich, Madrid, España). Después, se homogeneizó el tejido con la ayuda de un homogeneizador automático (Bullet blender, Next-Advance, Averill Park, Nueva York, Estados Unidos). A continuación se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 13.000 rpm y a 4°C. Tras ello, se recogieron las proteínas totales del sobrenadante y se almacenaron a -80°C.

### 6.2 Extracción de proteínas de células

La extracción de proteínas de las células H9c2, fue realizada en placas p100 con un total de 4 placas por cada grupo experimental. Para ello, transcurridas 24 horas después de haber estimulado con la aldosterona y co-incubado con los tratamientos, se procedió a lavar las células con PBS frío. Después, utilizando un raspador manual o *scraper* (Sigma Aldrich, Madrid, España) se levantaron las células mediante fricción y se recogieron en PBS en tubos *falcon* de 15mL (Thermo Scientific Inc,

Pittsburgh, Pennsylvania, Estados Unidos), trabajando sobre hielo en todo momento. A continuación se centrifugaron a 1.000 rpm y a 4°C tras lo cual se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 85µL de tampón de lisis. La composición del tampón de lisis incluyó un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, Berlín, Alemania) además de tampón Tris Base (20mmol/L), NaCl (150mmol/L), tritón X-100 (1% vol/vol), PMSF (0.3mmol/L) y DTT (3µmol/L) (Sigma Aldrich, Madrid, España). Después, con ayuda de un vórtex, se agitaron las muestras durante 30 segundos y se congelaron a -20°C. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm a 4°C durante 3 minutos, tras lo cual, se recogieron las proteínas totales de los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C.

### 6.3 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por medio de una técnica colorimétrica con azul de Coomassie (Thermo Scientific Inc, Pittsburgh, Pennsylvania Estados Unidos) basada en el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) para la obtención de una recta patrón de concentraciones crecientes conocidas de proteína. La lectura de la concentración de proteínas se realizó en un espectrofotómetro UVM-340 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) a una longitud de onda de 595nm. Una vez valorada la concentración en cada muestra, se utilizó la cantidad de 40µg de proteínas totales en cada uno de los sucesivos experimentos.

## 6.4 Electroforesis y transferencia

Las proteínas presentes en las muestras se desnaturalizaron de forma previa a su separación. Para ello, se añadió a las mismas un tampón de carga que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% (Sigma Aldrich, Madrid, España) como agente desnaturalizante y se calentaron durante 5 minutos a 95°C.

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida-SDS formados a su vez por un gel separador y un gel concentrador. El porcentaje de acrilamida del gel separador varió en función de las necesidades de cada experimento y del tamaño de la proteína a analizar. La electroforesis se llevó a cabo bajo condiciones reductoras. Se utilizó un amperaje constante de 50mA.

Tras la separación de las proteínas presentes en cada muestra, se procedió a la transferencia de las mismas a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF, Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos) mediante el paso de corriente eléctrica. Para ello, se utilizó la técnica de transferencia semiseca a un voltaje constante de 20V con la ayuda del aparato *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos).

Finalizada la transferencia, con el fin de verificar la calidad de las proteínas y la eficacia del proceso, se realizó una tinción no permanente de la membrana con rojo Ponceau.

## 6.5 Western blot

De forma previa a la incubación con los anticuerpos específicos, se realizó el bloqueo o saturación de todos los sitios inespecíficos de unión de proteínas en la membrana. Para ello, se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave en solución de bloqueo, preparada con PBS conteniendo tween-20 (Sigma Aldrich, Madrid, España) al 0,1% (v/v) (PBST) suplementado con leche en polvo desnatada al 7,5% (p/v).

Posteriormente, se cambió la solución de bloqueo por PBST suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) conteniendo el anticuerpo primario disuelto utilizado en cada caso (tabla 3). Las membranas se incubaron durante 18 horas a 4°C en agitación constante.

Finalizada la incubación, se realizaron lavados sucesivos de la membrana en PBST durante 40 minutos y a continuación se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa disuelto en PBST suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v), frente al anticuerpo primario. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario (tabla 3) durante una 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se repitieron los mismos lavados en PBST descritos.

El revelado de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica basada en el método de detección de la peroxidasa, utilizando un kit de detección de quimioluminiscencia (ECL, Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). La detección de quimioluminiscencia y su posterior cuantificación se realizó utilizando el sistema informático GeneGnome5 (Syngene Bio Imaging; Synoptics Ltd., Cambridge, Reino Unido). La proteína de expresión constitutiva gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, Sigma Aldrich, Madrid, España) fue usada como control de carga. Los resultados se expresaron como porcentaje de la expresión relativa respecto al grupo control, asignando a éste último el valor de 100%.

ANTICUERPO	REFERENCIA	DILUCIÓN	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA
<b>anti-CTGF</b>	c4871	1:1000	Implicada en fibrosis
<b>anti-CD68</b>	ab31630	1:200	Marcador de macrófagos. Inflamación
<b>anti-TNF<math>\alpha</math></b>	ab34674	1:1000	Implicada en Inflamación
<b>anti-iNOS</b>	ab3523	1:500	Implicada en inflamación y estrés oxidativo
<b>anti-p22phox NADPHox</b>	sc20781	1:500	Implicada en estrés oxidativo
<b>anti-SGK1</b>	mp07-315	1:500	Mediador de la aldosterona
<b>anti-<math>\alpha</math>ENaC</b>	ab77382	1:1000	Subunidad del ENaC. Introduce Na <sup>+</sup> en la célula
<b>anti-<math>\beta</math>ENaC</b>	ab2906	1:50	Subunidad del ENaC. Introduce Na <sup>+</sup> en la célula
<b>anti-<math>\gamma</math>ENaC</b>	ab3468	1:800	Subunidad del ENaC. Introduce Na <sup>+</sup> en la célula
<b>anti-Nedd4-2</b>	ab46521	1:1000	Marca ENaC para su degradación
<b>anti-pNedd4-2</b>	ab168349	1:1000	Forma inhibida por fosforilación (ser436)
<b>anti-ROMK</b>	ab92285	1:250	Expulsa K <sup>+</sup> de la célula
<b>anti-1<math>\alpha</math> Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa</b>	ab7671	1:1000	Introduce K <sup>+</sup> y expulsa Na <sup>+</sup> en la célula
<b>NHE1</b>	ab67314	1:500	Introduce Na <sup>+</sup> y expulsa H <sup>+</sup> en la célula
<b>anti-<math>\alpha</math>1C Cav1.2</b>	ab58552	1:500	Introduce Ca <sup>2+</sup> en la célula
<b>anti-NCX1</b>	ab6495	1:500	Introduce Na <sup>+</sup> y expulsa Ca <sup>2+</sup> en la célula o viceversa
<b>anti-CaMKII</b>	ab52476	1:500	Implicada en la regulación de canales iónicos
<b>anti-pCaMKII</b>	ab32678	1:500	Forma activada por fosforilación (thr286)
<b>anti-oxCaMKII</b>	mp07-1387	1:500	Forma activada por oxidación (met281-282)
<b>anti-GAPDH</b>	cst5174	1:10000	Implicada en glucólisis. Control de carga
<b>anti-Mouse IgG HRP</b>	ab97023	variable	Anticuerpo secundario conjugado a HRP
<b>anti-Rabbit IgG HRP</b>	ab97051	variable	Anticuerpo secundario conjugado a HRP

**Tabla 3.** Anticuerpos, referencias comerciales (ab: abcam, sc: santa cruz, mp: millipore, c-cst: sigma), diluciones empleadas y breve descripción de la función de las proteínas estudiadas mediante western blot.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Las comparaciones de variables individuales se realizaron mediante un test ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de medias (test de Newman-Keuls). Los resultados se consideraron significativos cuando el valor “p” fue menor de 0,05. Todos los análisis y los gráficos se realizaron utilizando el programa Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos).





**V**

**Resultados**

---



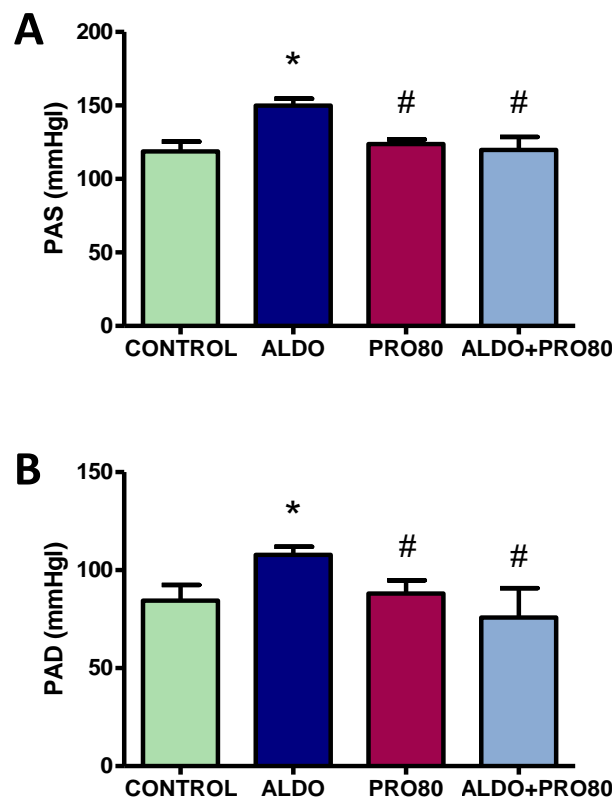




# 1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA HEMODINÁMICA CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

## 1.1 Presión arterial sistólica y diastólica, PAS y PAD

La PAS y la PAD aumentaron en las ratas a las que se les administró aldosterona ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo CONTROL. En el grupo ALDO+PRO80, dichos valores fueron reducidos ( $p < 0.01$ ) en comparación con el grupo ALDO hasta normalizarlos (figura 17).

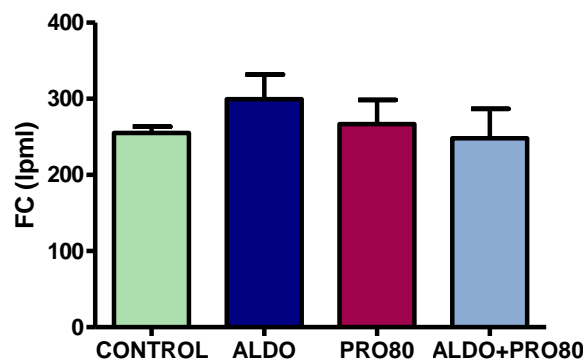


**Figura 17.** PAS (A) y PAD (B) en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

## 1.2 Hemodinámica cardíaca

### 1.2.1 Frecuencia cardíaca, FC

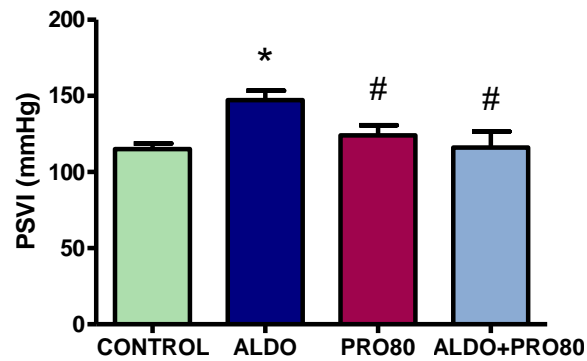
Los valores de FC no variaron significativamente entre grupos (figura 18).



**Figura 18.** FC en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80).

### 1.2.2 Presión sistólica del ventrículo izquierdo, PSVI

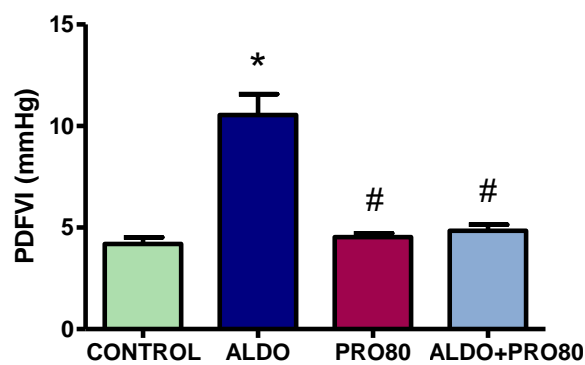
La administración de aldosterona, en comparación con el grupo CONTROL, produjo un aumento de la PSVI ( $p < 0.01$ ). En el grupo ALDO+PRO80, la PSVI comparada con la del grupo ALDO fue menor ( $p < 0.01$ ), alcanzado los valores del grupo CONTROL (figura 19).



**Figura 19.** PSVI en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

### 1.2.3 Presión diastólica final del ventrículo izquierdo, PDFVI

La aldosterona produjo un aumento elevado de la PDFVI ( $p < 0.001$ ) comparado con los valores del grupo CONTROL. Dicho aumento fue prevenido en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.001$ ) comparado con el grupo ALDO (figura 20).



**Figura 20.** PDFVI en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.001$  vs CONTROL, #  $p < 0.001$  vs ALDO.

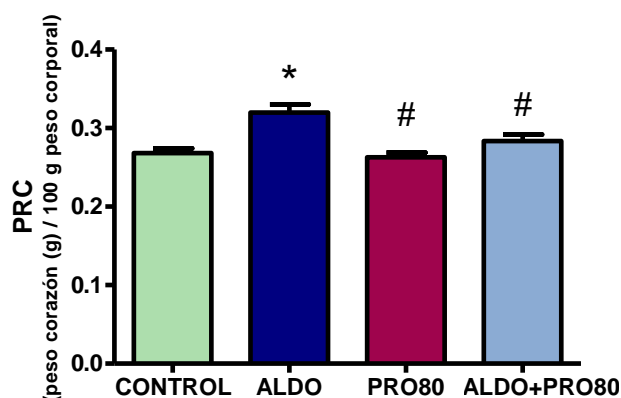
## 2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA HIPERTROFIA CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

### 2.1 Peso relativo del corazón, PRC

La tabla 4 recoge los valores de peso corporal y del corazón de cada grupo de animales. La administración de aldosterona produjo un aumento ( $p < 0.001$ ) del PRC respecto de las ratas del grupo CONTROL, que fue totalmente prevenido en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.01$ ) comparado con el grupo ALDO (figura 21).

	CONTROL	ALDO	PRO80	ALDO+PRO80
<b>Peso corporal (g)</b>	329.16 ± 8.7	290.16 ± 13.3*	335.75 ± 8.8#	292.8 ± 6.8*
<b>Peso del corazón (g)</b>	0.88 ± 0.1	0.93 ± 0.41	0.89 ± 0.12	0.86 ± 0.22#

**Tabla 4.** Peso corporal y peso del corazón en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

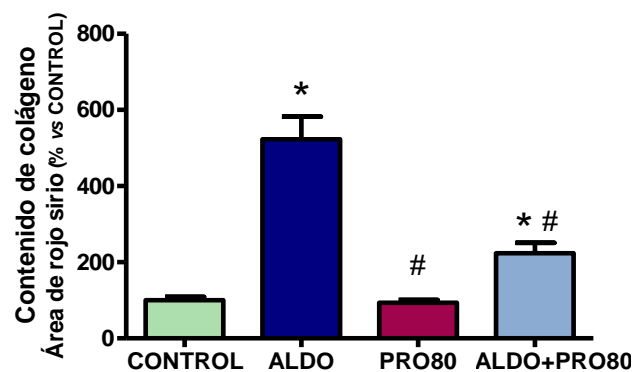


**Figura 21.** PRC en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.001$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

### 3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA FIBROSIS CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

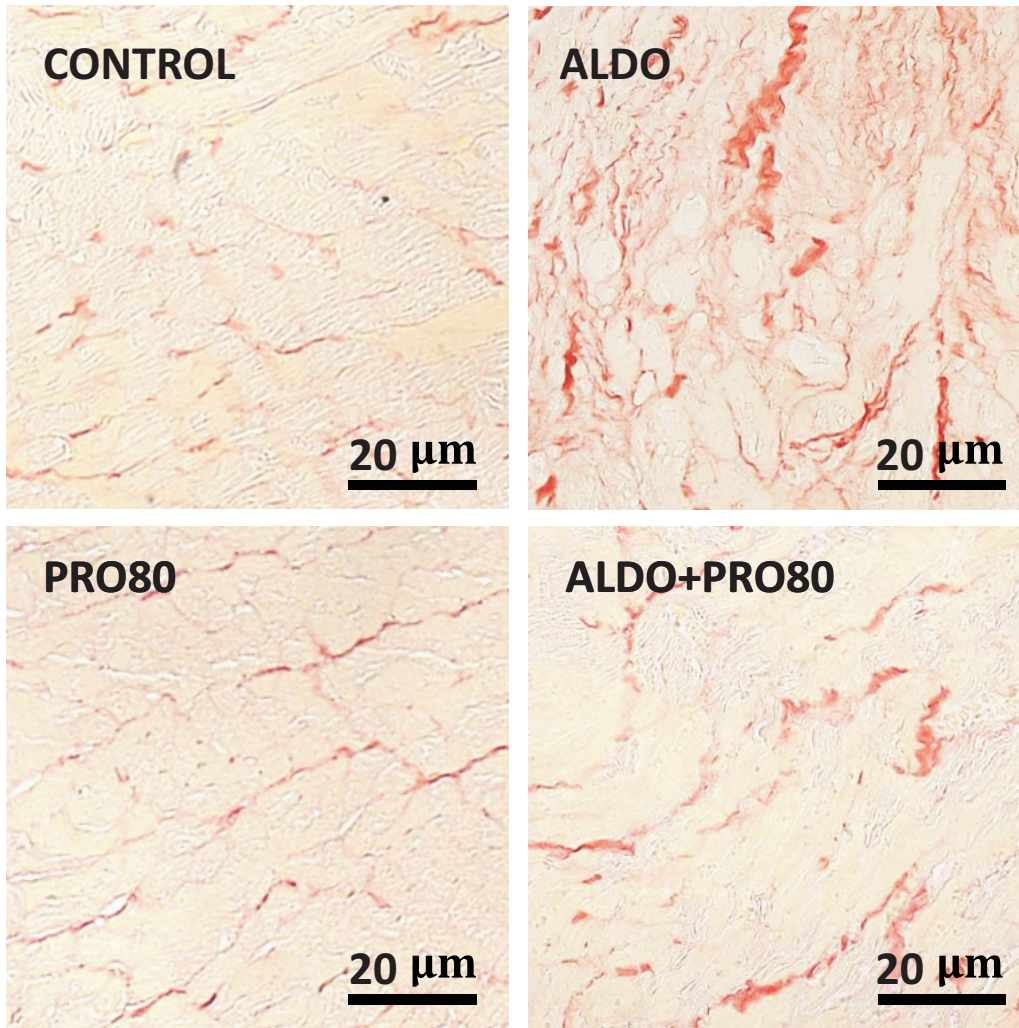
#### 3.1 Contenido de colágeno

El contenido de colágeno cardíaco aumentó en las ratas a las que se les administró aldosterona ( $p < 0.001$ ) en comparación con el grupo CONTROL y fue menor en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo ALDO (figura 22).



**Figura 22.** Contenido de colágeno cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.001$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

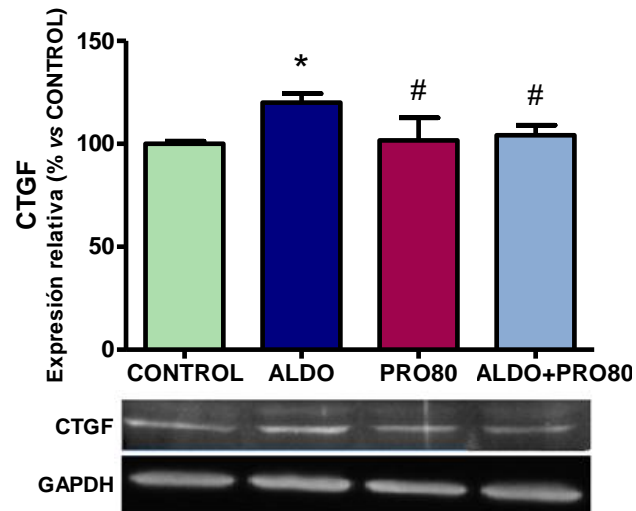
A continuación, se muestran microfotografías representativas de los cortes histológicos de corazón teñidos con rojo sirio, en los cuatro grupos experimentales (figura 23). Se puede apreciar el aumento de fibras de colágeno en rojo en el grupo ALDO comparado con el CONTROL. Así mismo, la microfotografía correspondiente al grupo ALDO+PRO80 muestra una disminución en el contenido de fibras de colágeno teñidas, comparado con el grupo ALDO.



**Figura 23.** Microfotografías representativas del contenido de colágeno en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). Las zonas teñidas de rojo constituyen las fibras de colágeno.

### 3.2 Factor de crecimiento de tejido conectivo, CTGF

La administración de aldosterona aumentó los niveles de expresión proteica de CTGF ( $p < 0.05$ ) en corazón respecto al grupo de ratas CONTROL y disminuyó en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo ALDO (figura 24).

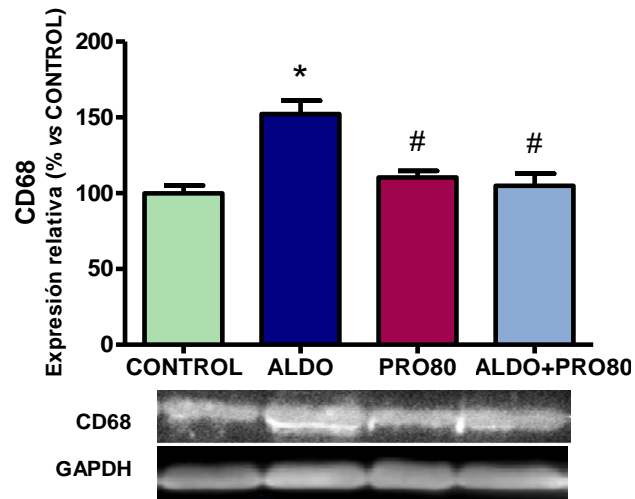


**Figura 24.** Expresión proteica de CTGF cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

## 4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

### 4.1 *Cluster* de diferenciación 68, CD68

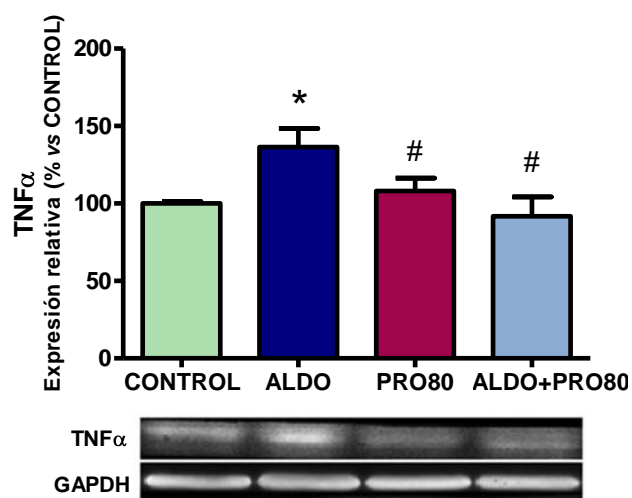
Los niveles de expresión proteica del CD68 cardíaco aumentaron en el grupo de ratas ALDO ( $p < 0.001$ ) en comparación con las ratas CONTROL. En el grupo ALDO+PRO80 dichos niveles fueron disminuidos ( $p < 0.001$ ) respecto al grupo ALDO, hasta normalizarse (figura 25).



**Figura 25.** Expresión proteica del CD68 cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.001$  vs CONTROL, #  $p < 0.001$  vs ALDO.

## 4.2 Factor de necrosis tumoral alfa, $TNF\alpha$

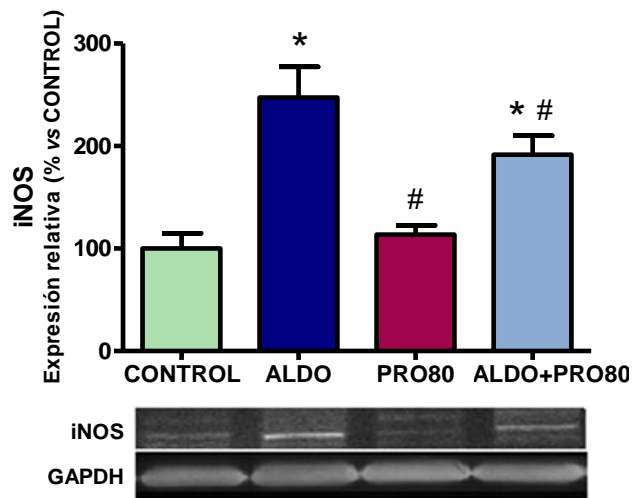
Los niveles de expresión proteica del  $TNF\alpha$  cardíaco aumentaron en el grupo ALDO ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo CONTROL y disminuyeron en las ratas ALDO+PRO80 ( $p < 0.05$ ) en comparación con las ratas ALDO, hasta alcanzar los valores del grupo CONTROL (figura 26).



**Figura 26.** Expresión proteica del  $TNF\alpha$  cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

### 4.3 Óxido nítrico sintasa inducible, iNOS

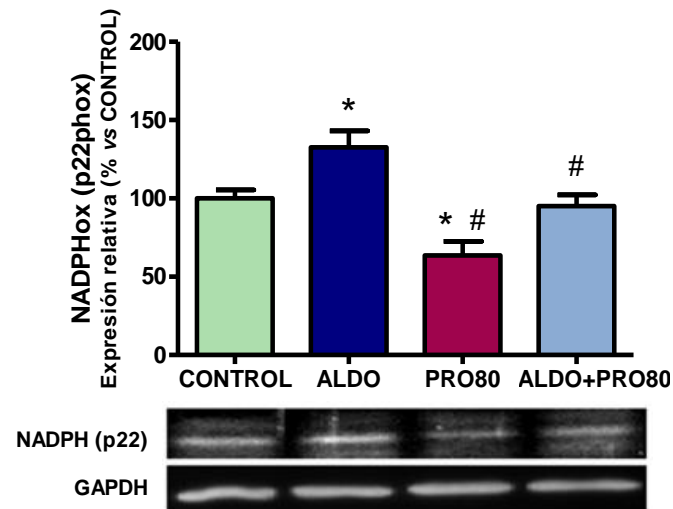
La administración de aldosterona produjo un aumento en el nivel de expresión proteica de la iNOS ( $p < 0.01$ ) cardíaca respecto al grupo CONTROL. Esto fue prevenido en las ratas ALDO+PRO80, cuyos niveles fueron menores respecto de las ratas ALDO ( $p < 0.05$ ) (figura 27).



**Figura 27.** Expresión proteica de la iNOS cardíaca en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.001$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

### 4.4 Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, NADPHox: subunidad p22phox

Los valores de expresión proteica en corazón de la subunidad p22phox de la NADPHox, aumentaron en las ratas con aldosterona ( $p < 0.01$ ) respecto de las ratas CONTROL. En el grupo ALDO+PRO80, dicha expresión disminuyó ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo ALDO, hasta normalizar (figura 28).

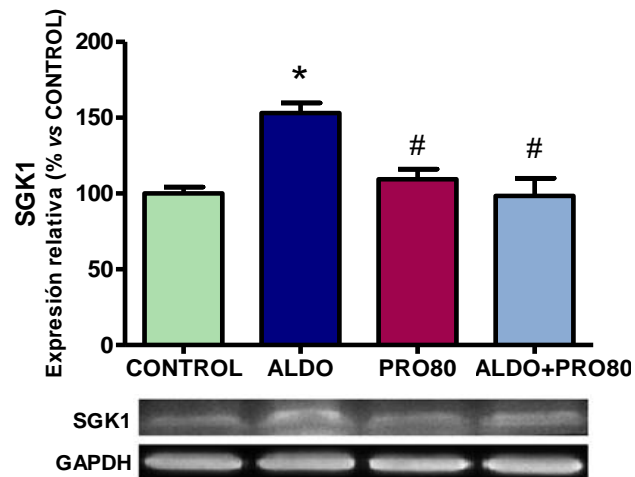


**Figura 28.** Expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa cardíaca en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

## 5. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA CARDÍACA DE SGK1, ENAC, NEDD4-2 Y pNEDD4-2 EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

### 5.1 Quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1, SGK1

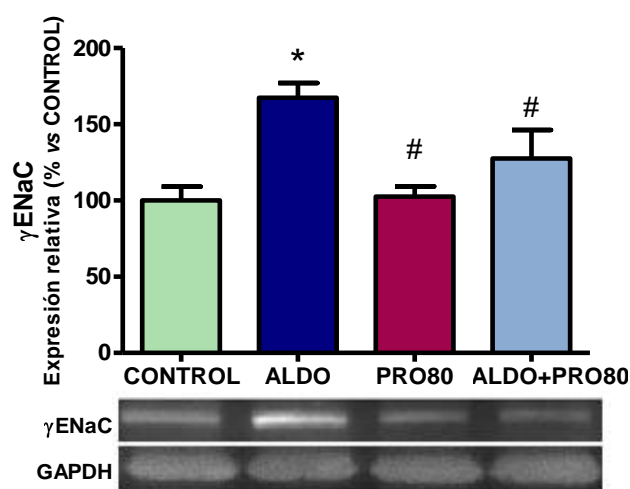
La administración de aldosterona produjo un incremento significativo en la expresión proteica del SGK1 cardíaco ( $p < 0.001$ ) respecto al grupo CONTROL. En el grupo ALDO+PRO80 la expresión disminuyó ( $p < 0.001$ ) respecto al grupo ALDO, alcanzándose valores control (figura 29).



**Figura 29.** Expresión proteica del SGK1 cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.001$  vs CONTROL, #  $p < 0.001$  vs ALDO.

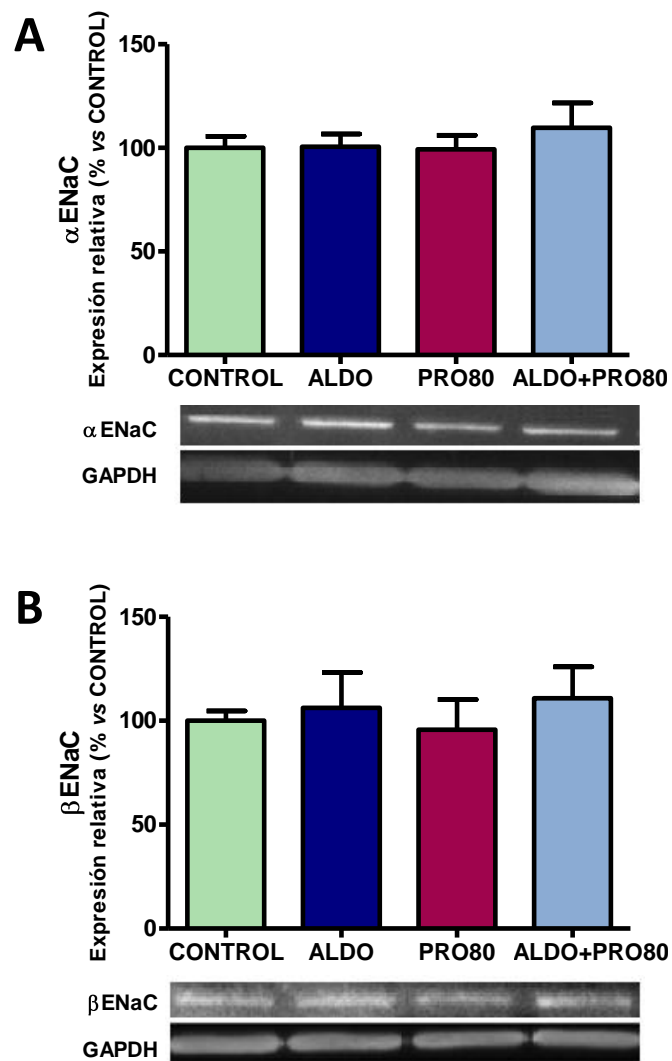
## 5.2 Canal epitelial de sodio, ENaC: subunidades $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$

La expresión proteica en corazón de la subunidad  $\gamma$  del ENaC aumentó ( $p < 0.05$ ) en el grupo ALDO comparado con los controles. Los animales del grupo ALDO+PRO80 presentaron una disminución ( $p < 0.05$ ) de la expresión proteica de dicha subunidad, respecto al grupo ALDO (figura 30).



**Figura 30.** Expresión proteica de la subunidad  $\gamma$  del ENaC cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

No se observaron cambios significativos en la expresión proteica de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del ENaC entre los cuatro grupos estudiados (figura 31).

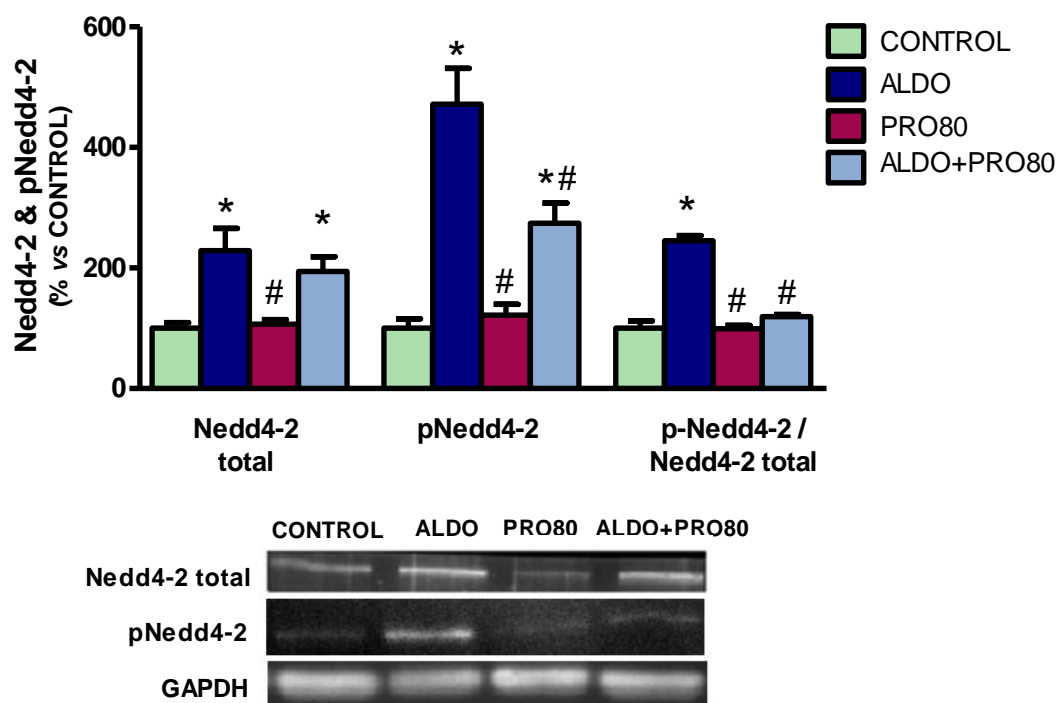


**Figura 31.** Expresión proteica de las subunidades  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) del ENaC cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80).

### 5.3 Ubiquitina ligasa Nedd4-2 y su fosforilación, pNedd4-2

Tanto la expresión proteica total del Nedd4-2 cardíaco como los niveles de fosforilación en la serina 436 de dicha proteína (pNedd4-2), aumentaron en el grupo ALDO y en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo CONTROL (figura 32). Sin embargo, en el grupo ALDO+PRO80, se redujo el nivel de fosforilación en serina 436 ( $p < 0.01$ ) en comparación con el grupo ALDO (figura 32).

La relación pNedd4-2/Nedd4-2 aumentó en el grupo con aldosterona ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo CONTROL, sin embargo, el tratamiento con PRO80 previno dicho aumento en las ratas del grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.01$ , comparado con el grupo ALDO) (figura 32).

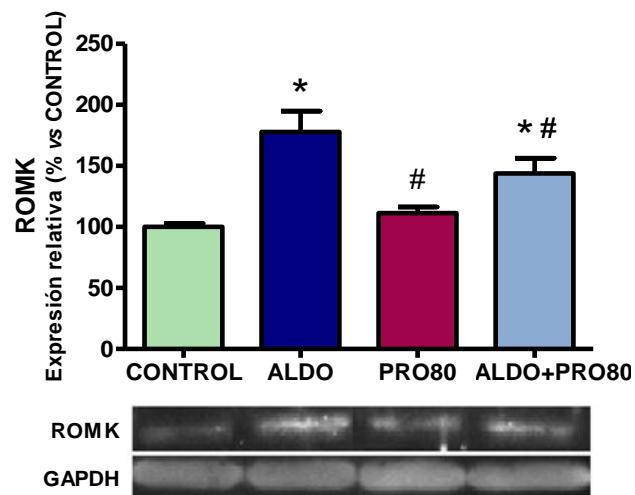


**Figura 32.** Expresión proteica del Nedd4-2 total en corazón, niveles de Nedd4-2 cardíaco fosforilado en la posición serina 436 (pNedd4-2) y relación entre pNedd4-2 y Nedd4-2 total en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

## 6. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA CARDÍACA DE LOS TRANSPORTADORES IÓNICOS ROMK, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa, NHE1, Ca<sub>v</sub>1.2 Y NCX1 EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

### 6.1 Canal de potasio medular exterior renal, ROMK

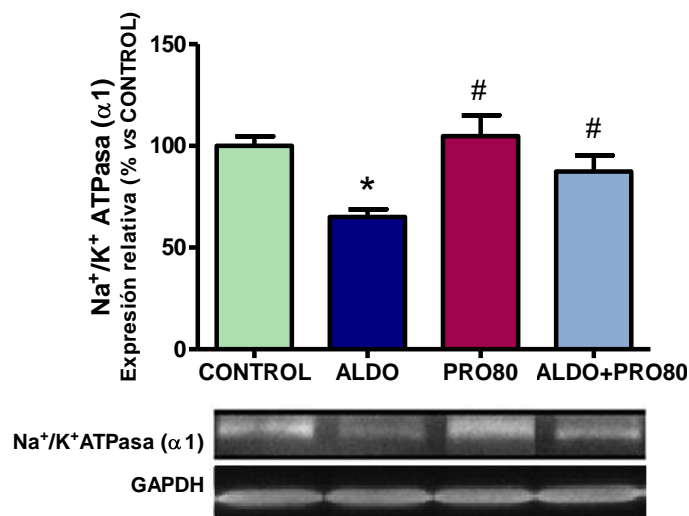
La administración de aldosterona produjo un aumento en los niveles del ROMK cardíaco ( $p < 0.01$ ) en comparación con los de las ratas CONTROL, que disminuyeron en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo ALDO (figura 33).



**Figura 33.** Expresión proteica del ROMK cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

## 6.2 Bomba de sodio potasio dependiente de ATP, $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa: subunidad $\alpha 1$

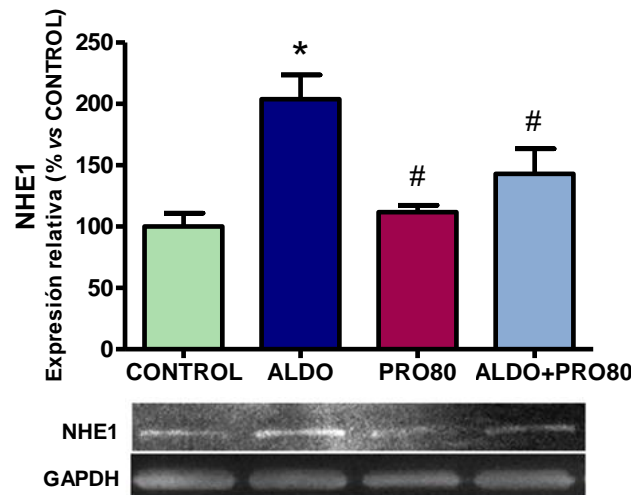
La expresión proteica de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa cardíaca disminuyó ( $p < 0.01$ ) en el grupo ALDO respecto al grupo CONTROL. Los niveles en el grupo ALDO+PRO80 aumentaron ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo ALDO (figura 34).



**Figura 34.** Expresión proteica de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa cardíaca en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

## 6.3 Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1, NHE1

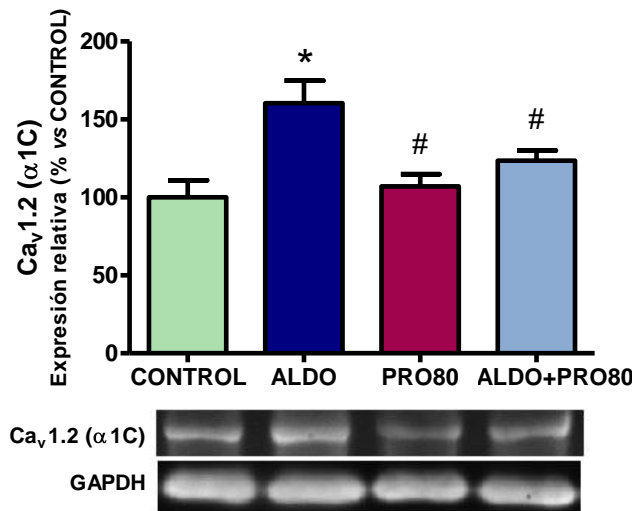
El aumento en la expresión proteica en corazón del NHE1 producido por la administración de aldosterona ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo CONTROL, disminuyó en el grupo de ratas ALDO+PRO80 ( $p < 0.01$ ) comparado con el grupo ALDO (figura 35).



**Figura 35.** Expresión proteica del NHE1 cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

#### 6.4 Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, Cav1.2: subunidad $\alpha 1C$

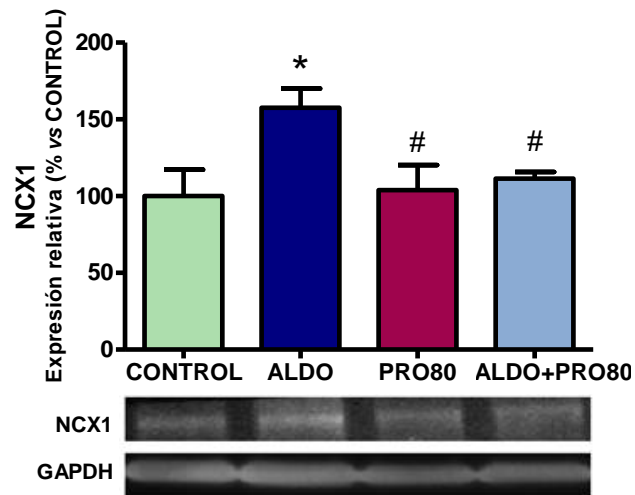
La expresión proteica cardíaca de la subunidad  $\alpha 1C$  del canal  $Ca_v1.2$  aumentó en las ratas con aldosterona ( $p < 0.01$ ) en comparación con las ratas CONTROL y disminuyó en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.01$ ) respecto a los animales del grupo ALDO (figura 36).



**Figura 36.** Expresión proteica cardíaca de la subunidad  $\alpha 1C$  del canal  $Ca_v1.2$  en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

## 6.5 Intercambiador de sodio-calcio tipo 1, NCX1

La administración de aldosterona en ratas aumentó ( $p < 0.05$ ) la expresión proteica cardíaca del NCX1 respecto a los animales control. El tratamiento con PRO80 disminuyó significativamente la expresión del NCX1 en las ratas del grupo ALDO+PRO80, comparado con el grupo ALDO (figura 37).

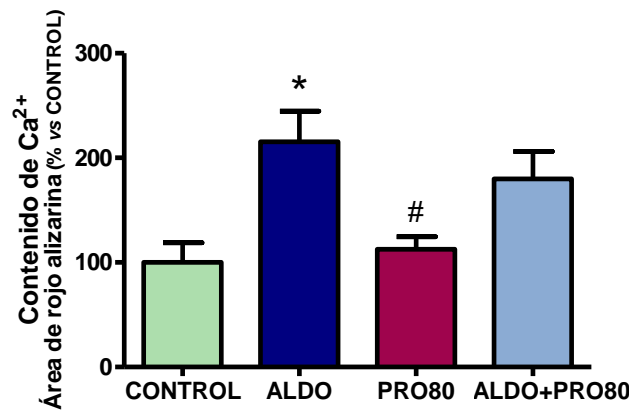


**Figura 37.** Expresión proteica de NCX1 cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

## 7. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE EL CONTENIDO DE CALCIO CARDÍACO Y LA EXPRESIÓN PROTEICA, FOSFORILACIÓN Y OXIDACIÓN DE LA CaMKII CARDÍACA EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

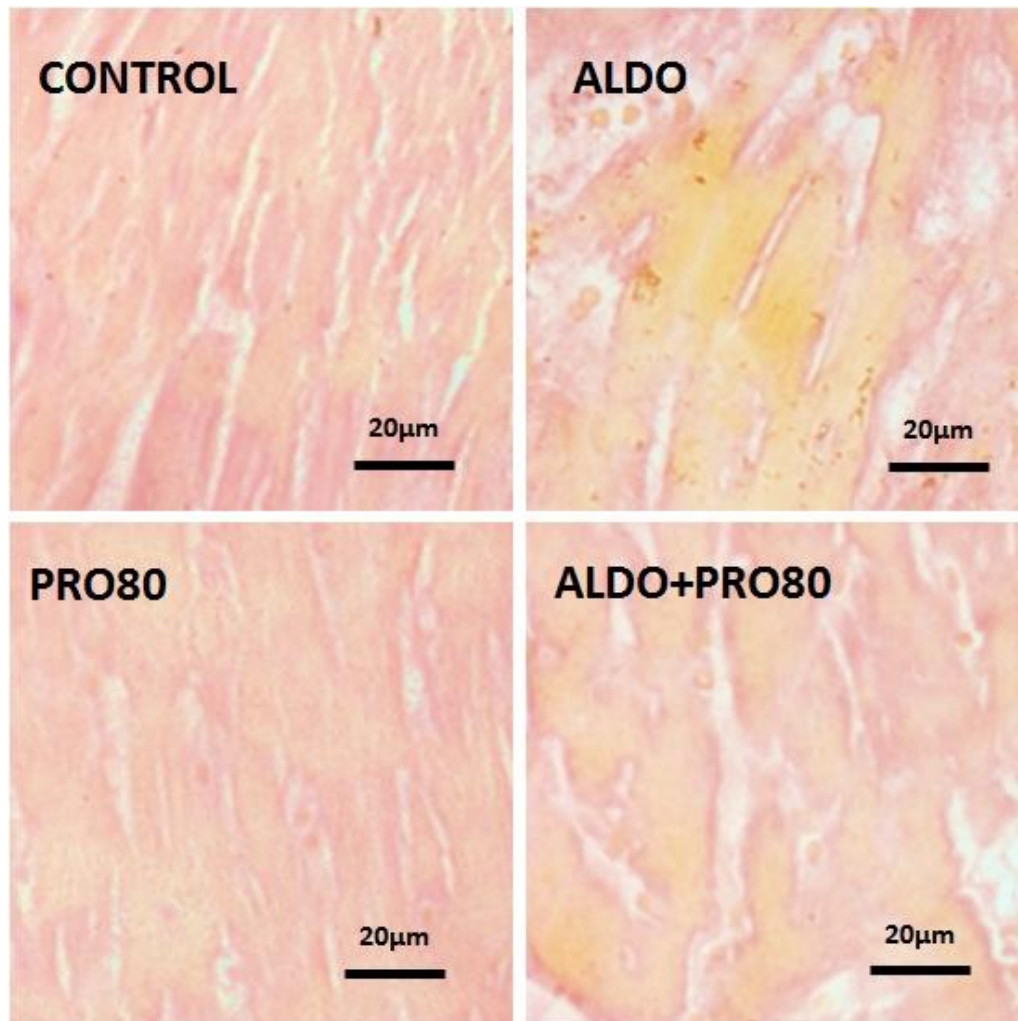
### 7.1 Contenido de calcio

El contenido de calcio aumentó en las ratas a las que se les administró aldosterona ( $p < 0.01$ ) respecto de las ratas CONTROL. El grupo ALDO+PRO80 mostró niveles más bajos de calcio que el grupo ALDO (figura 38).



**Figura 38.** Contenido de calcio cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.01$  vs ALDO.

A continuación, se muestran microfotografías representativas de los cortes histológicos de corazón teñidos con rojo alizarina, en los cuatro grupos experimentales (figura 39). En el grupo ALDO se observa un aumento del contenido de calcio cardíaco, representado por los tonos más anaranjados, comparado con el grupo CONTROL. Respecto al grupo ALDO+PRO80, se puede apreciar en la microfotografía una disminución en el contenido de calcio, comparado con el grupo ALDO.

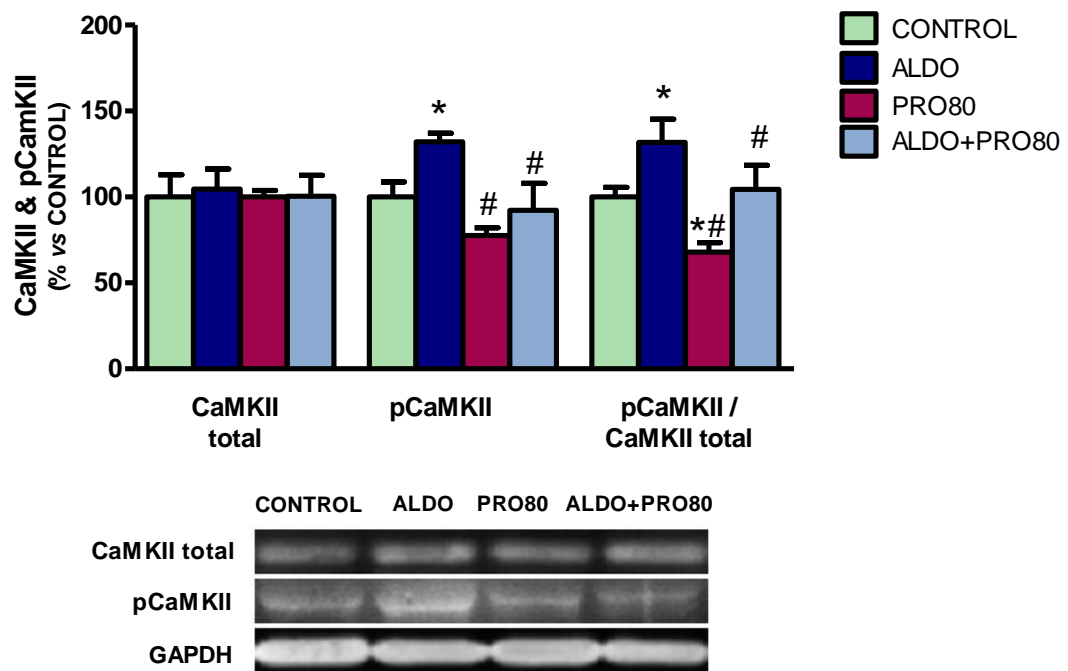


**Figura 39.** Microfotografías representativas del contenido de calcio cardíaco en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). Las zonas teñidas de naranja corresponden a la acumulación de calcio.

## 7.2 Quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2, CaMKII, y su fosforilación, pCaMKII y oxidación, ox-CaMKII

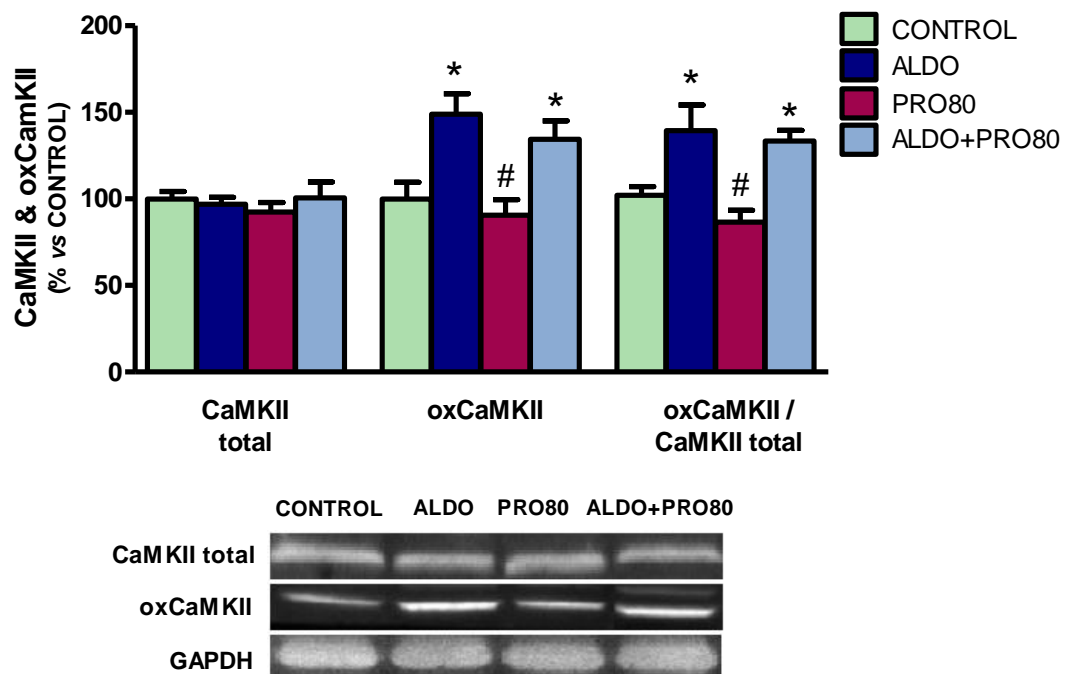
El nivel de expresión proteica en corazón de la CaMKII no varió entre grupos (figura 40). Sin embargo, el nivel de fosforilación en la treonina 286 (pCaMKII) aumentó en las ratas a las que se les administró aldosterona ( $p < 0.05$ ) respecto de las ratas CONTROL. Dicho parámetro disminuyó hasta normalizar en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo ALDO (figura 40).

La relación entre la pCaMKII y la CaMKII total reveló un aumento significativo de dicha proporción en el grupo ALDO ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo CONTROL, así como una disminución en el grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo de ratas a las que se les administró aldosterona (figura 40).



**Figura 40.** Expresión proteica en corazón de la CaMKII total, niveles de la CaMKII cardíaca fosforilada en treonina 286 (pCaMKII) y relación entre la pCaMKII y la CaMKII total en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

Por otra parte, el grado de oxidación de la CaMKII cardíaca en las metioninas 281 y 282 (oxCaMKII), aumentó en las ratas del grupo ALDO y en las del grupo ALDO+PRO80 ( $p < 0.05$ ), respecto al grupo CONTROL (figura 41). La relación entre la oxCaMKII y la CaMKII total, mostró un incremento significativo en los grupos ALDO y ALDO+PRO80 ( $p < 0.05$ ) comparado con las ratas CONTROL (figura 41).



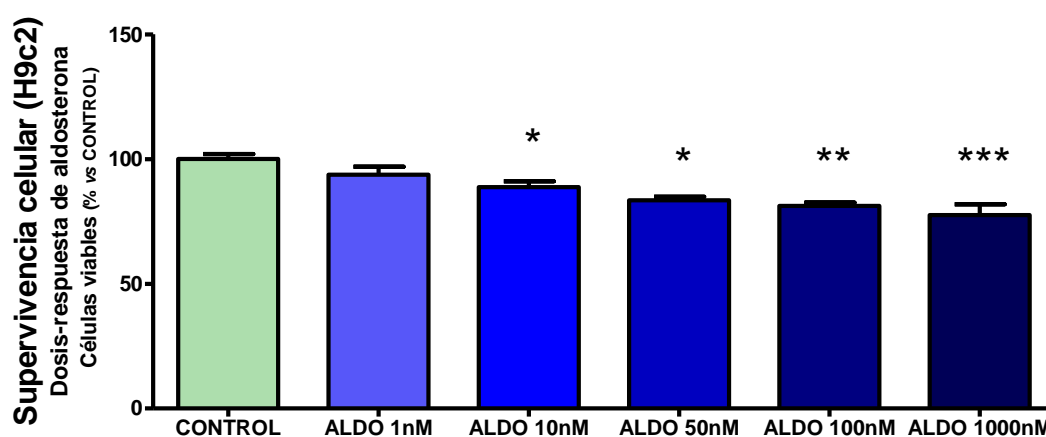
**Figura 41.** Expresión proteica en corazón de la CaMKII total, niveles de la CaMKII oxidada en las metioninas 281 y 282 (oxCaMKII) y relación entre la oxCaMKII y la CaMKII total en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (PRO80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO80). \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO.

## 8. EFECTOS DE LA INCUBACIÓN CON PROANTOCIANIDINAS Y ESPIRONOLACTONA SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN CÉLULAS H9c2 ESTIMULADAS CON ALDOSTERONA

### 8.1 Supervivencia celular en células H9c2

#### 8.1.1 Estudio dosis-respuesta de aldosterona en células H9c2

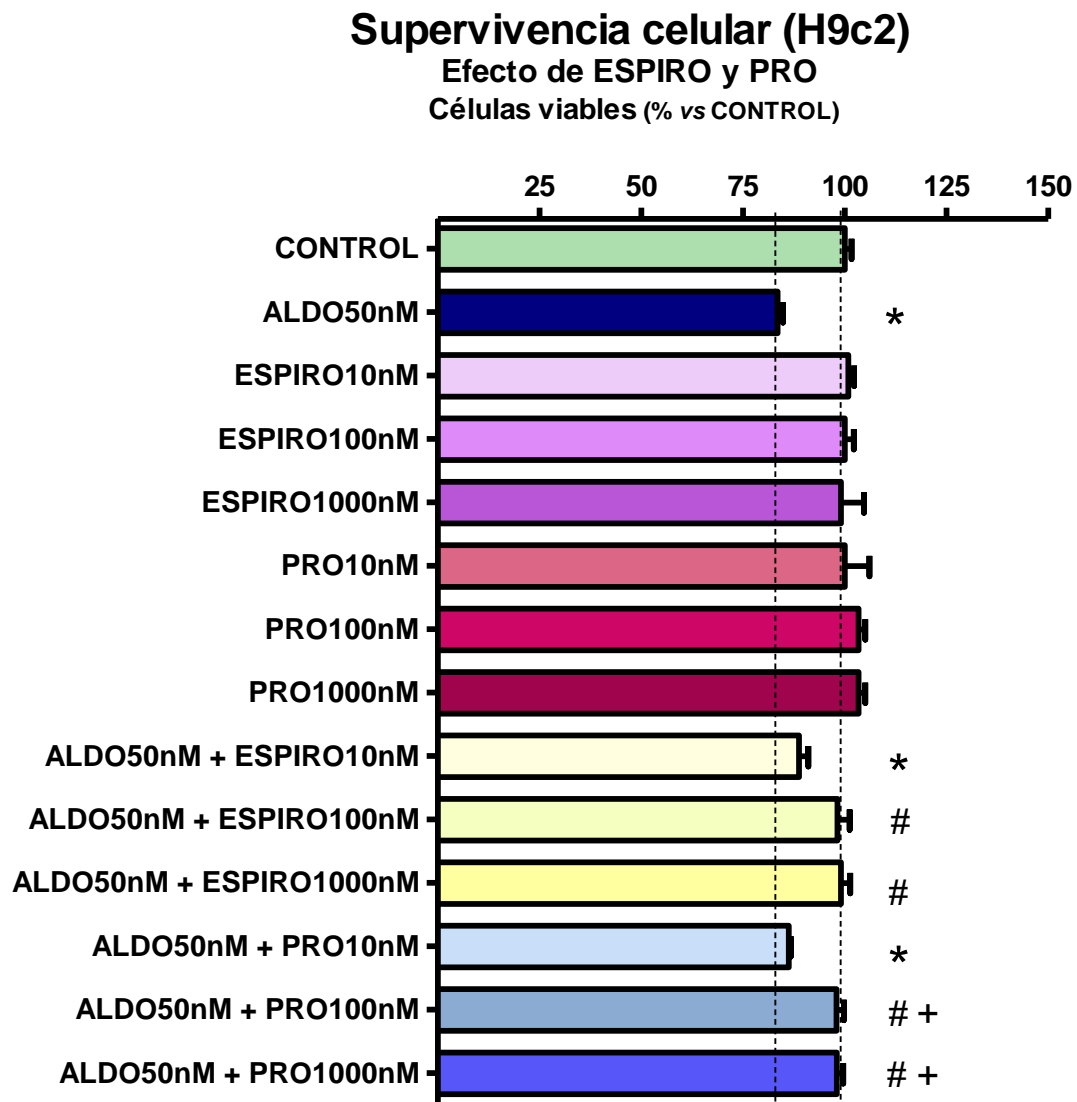
En primer lugar, se realizó un estudio de dosis-respuesta a diferentes concentraciones de aldosterona (1, 10, 50, 100 y 1000nM), con un tiempo de incubación de 24 horas, estableciéndose como más apropiada la dosis de 50nM, que produjo una supervivencia celular del 83% ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo CONTROL (figura 42).



**Figura 42.** Supervivencia celular en células H9c2, estimuladas durante 24 horas con distintas dosis de aldosterona, en los grupos control (CONTROL) y aldosterona (ALDO) a concentraciones crecientes \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs CONTROL.

### **8.1.2 Efecto de la incubación con proantocianidinas y espironolactona sobre la supervivencia celular en células H9c2 estimuladas con aldosterona**

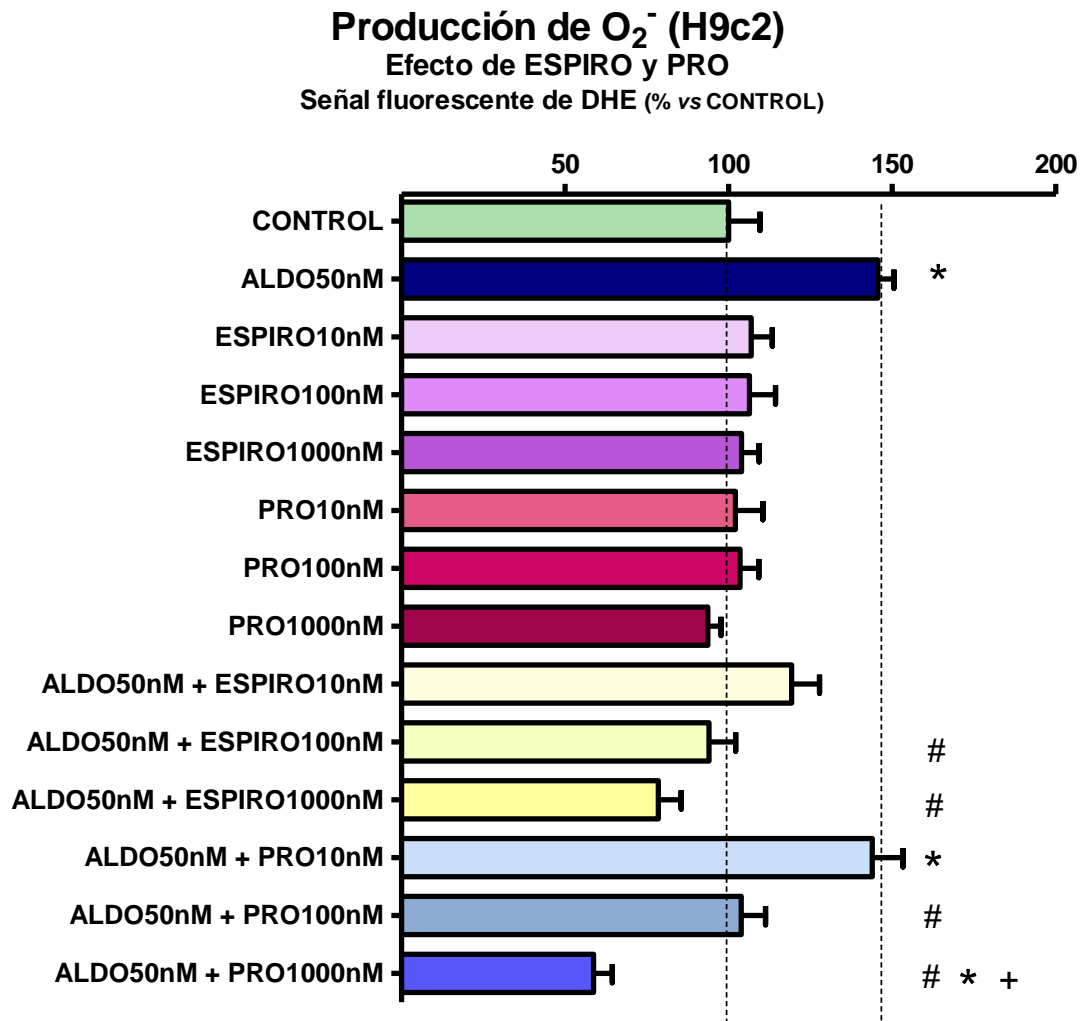
Transcurridas 24 horas de incubación, en las células H9c2 estimuladas con aldosterona a 50nM, se produjo una disminución de la supervivencia celular ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo CONTROL. De igual manera, en el grupo ALDO50nM + ESPIRO10nM, la supervivencia celular disminuyó ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo CONTROL. En cuanto a los grupos ALDO50nM + ESPIRO100nM y ALDO50nM + ESPIRO1000nM, la supervivencia celular aumentó ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo ALDO50nM alcanzándose valores control. En el caso del grupo ALDO50nM + PRO10nM, los valores de supervivencia disminuyeron ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo CONTROL. Sin embargo, en los grupos ALDO50nM + PRO100nM y ALDO50nM + PRO1000nM, se alcanzaron niveles de supervivencia similares al grupo CONTROL, aumentando dicho parámetro ( $p < 0,05$ ) respecto de los grupos ALDO50nM y ALDO50nM + PRO10nM (figura 43).



**Figura 43.** Supervivencia celular en células H9c2 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), espironolactona (ESPIRO), proantocianidinas (PRO), aldosterona más espironolactona (ALDO+ESPIRO) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO) a distintas concentraciones y tras 24 horas de incubación. \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO50nM, +  $p < 0.05$  vs ALDO50nM + PRO10nM.

## 8.2 Efecto de la incubación con proantocianidinas y espironolactona sobre la producción de anión superóxido en células H9c2 estimuladas con aldosterona

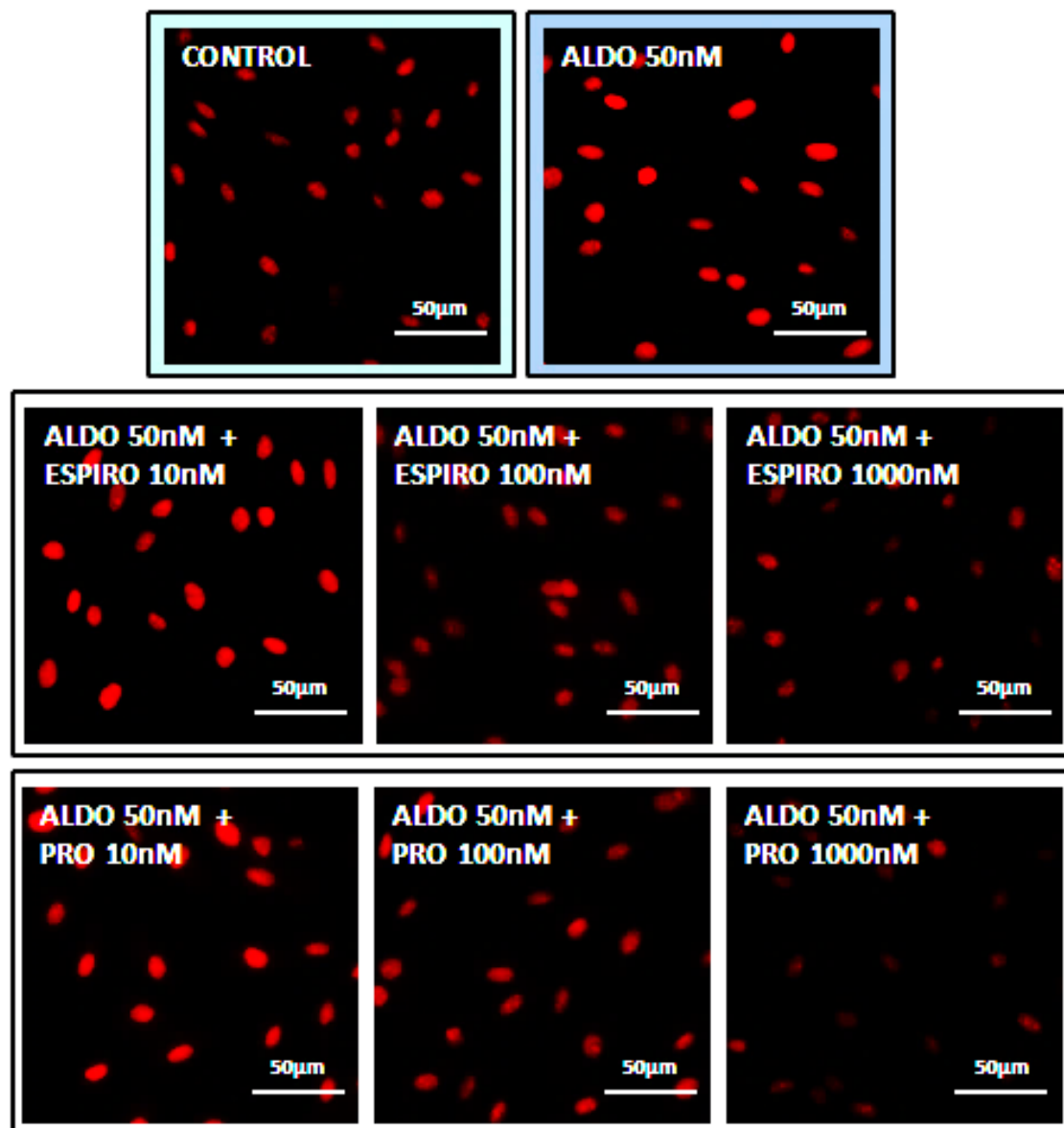
Después de 24 horas de incubación, se observó un aumento en la producción de  $O_2^-$  en el grupo estimulado con aldosterona a 50nM ( $p < 0.01$ ) respecto al grupo CONTROL. Por el contrario, en las células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con espironolactona, la producción de  $O_2^-$  disminuyó, alcanzándose valores por debajo del grupo CONTROL en el caso de los grupos ALDO50nM + ESPIRO100nM y ALDO50nM + ESPIRO1000nM ( $p < 0,001$ ). En el grupo ALDO50nM + PRO10nM los niveles de  $O_2^-$  fueron superiores ( $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo CONTROL. La producción de  $O_2^-$  en el grupo ALDO50nM + PRO100nM disminuyó ( $p < 0.001$ ) y fue comparable a los niveles del grupo CONTROL. Por último, el grupo ALDO50nM + PRO1000nM presentó una disminución de la producción de  $O_2^-$  por debajo de los valores del grupo CONTROL ( $p < 0,01$ ) y del grupo ESPIRO1000nM + ALDO50nM ( $p < 0,05$ ) (figura 44).



**Figura 44.** Producción de  $O_2^-$  en células H9c2 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), espironolactona (ESPIRO), proantocianidinas (PRO), aldosterona más espironolactona (ALDO+ESPIRO) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO) a distintas concentraciones y tras 24 horas de incubación. \*  $p < 0.01$  vs CONTROL, #  $p < 0.001$  vs ALDO50nM, +  $p < 0.05$  vs ALDO50nM + ESPIRO1000nM.

A continuación, se muestran microfotografías de fluorescencia representativas de la producción de  $O_2^-$  en las células H9c2, en los distintos grupos experimentales (figura 45). En el grupo ALDO se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia, debido a una mayor presencia de  $O_2^-$ , en comparación con el grupo CONTROL. En los grupos ALDO+ESPIRO y ALDO+PRO, se puede apreciar cómo, a medida que aumenta la

concentración de ESPIRO o PRO, la fluorescencia es menos intensa indicando una menor producción de  $O_2^-$ .

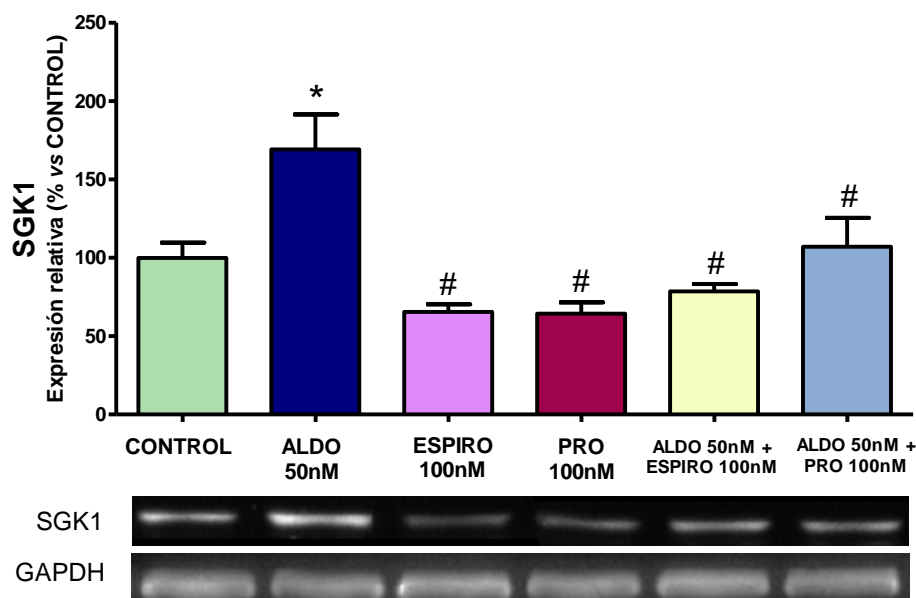


**Figura 45.** Microfotografías de fluorescencia representativas de la producción de  $O_2^-$  en células H9c2 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), aldosterona más espironolactona (ALDO+ESPIRO) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO) a distintas concentraciones y tras 24 horas de incubación.

## 9. EFECTOS DE LA INCUBACIÓN CON PROANTOCIANIDINAS Y ESPIRONOLACTONA SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL SGK1 Y LA SUBUNIDAD P22PHOX DE LA NADPHox EN CÉLULAS H9c2 ESTIMULADAS CON ALDOSTERONA

### 9.1 Quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1, SGK1

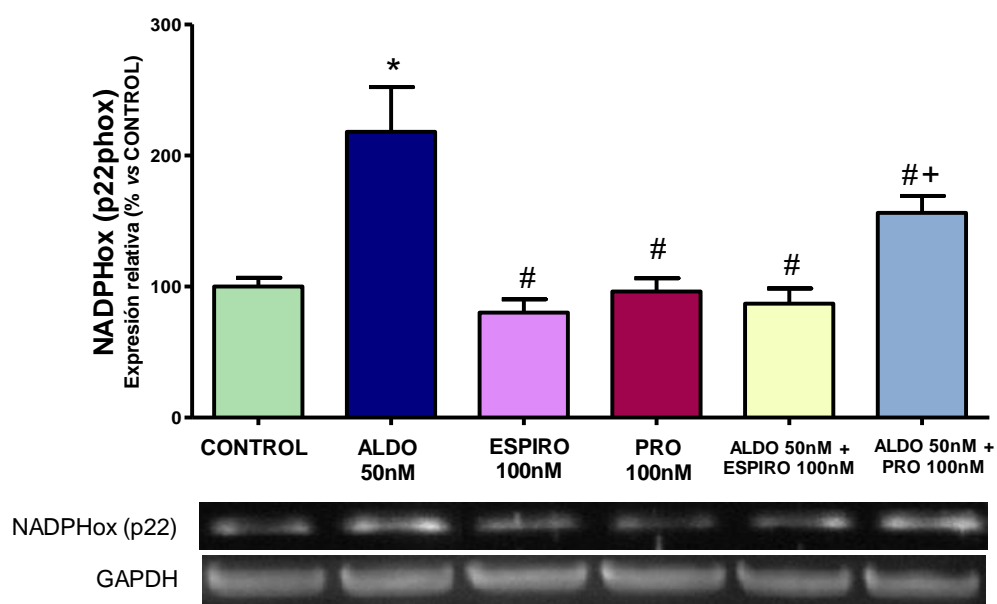
Transcurridas 24 horas, la aldosterona produjo un aumento en la expresión proteica del SGK1 ( $p < 0.05$ ) en las células H9c2 en comparación con el grupo CONTROL. La co-incubación de espironolactona a 100nM o proantocianidinas a 100nM más aldosterona a 50nM, redujo la expresión de SGK1 ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo ALDO50nM. (figura 46).



**Figura 46.** Expresión proteica de SGK1 en células H9c2 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), espironolactona (ESPIRO), proantocianidinas (PRO), aldosterona más espironolactona (ALDO+ESPIRO) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO), tras 24 horas de incubación. \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.05$  vs ALDO50nM.

## 9.2 Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, NADPHox: subunidad p22phox

Los niveles de expresión proteica de la subunidad p22phox de NADPHox aumentaron con aldosterona a 50nM ( $p < 0.01$ ) tras 24 horas de incubación, respecto al grupo CONTROL. Dicho aumento fue prevenido en los grupos ALDO50nM + ESPIRO100nM ( $p < 0.01$ ) y ALDO50nM + PRO100nM ( $p < 0.01$ ) en comparación con el grupo ALDO50nM. En el grupo ALDO50 + PRO100nM, la expresión proteica de dicha subunidad fue mayor comparado con el grupo ALDO50 + ESPIRO100nM ( $p < 0,05$ ) (figura 47).



**Figura 47.** Expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa en células H9c2 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), espironolactona (ESPIRO), proantocianidinas (PRO), aldosterona más espironolactona (ALDO+ESPIRO) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+PRO), tras 24 horas de incubación. \*  $p < 0.05$  vs CONTROL, #  $p < 0.001$  vs ALDO50nM, +  $p < 0.05$  vs ALDO50nM + ESPIRO100nM.





**VI**

**Discusión**

---







# 1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LAS ALTERACIONES CARDÍACAS PRODUCIDAS POR LA ALDOSTERONA EN RATAS

## 1.1 Presión arterial y hemodinámica cardíaca

En el presente trabajo, la aldosterona produjo un aumento significativo de la PAS y la PAD en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. La aldosterona participa en el desarrollo de numerosas enfermedades cardiovasculares como la HTA y la disfunción diastólica entre otras (Cannavo *et al.*, 2016; Quinkler *et al.*, 2010; Struthers, 2004). Uno de los efectos más estudiados de la aldosterona más sal es el desarrollo de HTA (Catena *et al.*, 2015; Martin-Fernandez *et al.*, 2014a; Young y Rickard, 2012). La aldosterona incrementa la PA aumentando la volemia al estimular la retención de sodio y agua en el riñón (Samavat *et al.*, 2011) e induciendo remodelado vascular, lo que altera la estructura del vaso haciéndolo rígido y disfuncional (Briet y Schiffrin, 2013). Por tanto, el aumento significativo de la PAS y la PAD observados en el grupo ALDO de nuestro estudio en comparación con el grupo CONTROL, podría deberse a la suma de los efectos de la aldosterona tanto a nivel renal como vascular señalados.

La HTA observada en el grupo ALDO estuvo acompañada también de un deterioro de la función cardíaca como indican el aumento en la PDFVI y en la PSVI observadas. En concreto, la elevada PDFVI fue indicativa del desarrollo de disfunción diastólica por

parte de los animales del grupo ALDO. El aumento sostenido de la PA y la consecuente sobrecarga de presión en el miocardio llevan a cambios en la hemodinámica cardíaca, como ocurre en el modelo en rata de aldosterona más sal (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a; Young y Rickard, 2012). Así mismo, la aldosterona promueve directamente el remodelado cardíaco, lo que altera la estructura del corazón y lleva al desarrollo de HC, cuyo agravamiento y mantenimiento en el tiempo, conduce a la reducción de la elasticidad cardíaca y la disfunción diastólica (Cannavo *et al.*, 2016; Catena *et al.*, 2014; Gradman y Alfayoumi, 2006).

Por otra parte, la mejora tanto en la PAS y la PAD así como en la PDFVI y en la PSVI observadas en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO, mostraron un efecto regulador de la PA inducido por las proantocianidinas. Estudios realizados en modelos animales de HTA (Huang *et al.*, 2015; Kawakami *et al.*, 2011; Lan *et al.*, 2015) así como en pacientes hipertensos han demostrado los potenciales efectos beneficiosos de las proantocianidinas en la regulación de la PA, asociando dichos efectos fundamentalmente a la mejora de la función endotelial como consecuencia de una menor producción de ROS, al aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, al aumento en la vasodilatación endotelio-dependiente y a la supresión de factores vasoconstrictores y pro-fibróticos (Draijer *et al.*, 2015; Habauzit y Morand, 2012; Hugel *et al.*, 2016). Así mismo, el efecto beneficioso del consumo de proantocianidinas sobre la función cardíaca en modelos de HTA, hiperaldosteronismo y daño cardíaco por isquemia-reperfusión ha sido ampliamente demostrado (Dong *et al.*, 2012; Habauzit y Morand, 2012; Pataki *et al.*, 2002; Seymour *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2010).

## 1.2 Hipertrofia y fibrosis

En el presente trabajo, se observó un aumento significativo del PRC en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL, lo que es indicativo del desarrollo de HC en las ratas a las que se les administró aldosterona. Independientemente de los niveles de PA, se ha demostrado la aldosterona es uno de los factores mediadores en el desarrollo de HC y en el proceso de fibrosis asociado (Diez, 2008; Holmer y Schunkert, 1996; Okoshi et al., 2004). La aldosterona activa mediante mecanismo no genómico la vía de señalización de las quinasas activadas por mitógenos y señales extracelulares MAPK/ERK, a través de los mensajeros secundarios DAG, AMPc e IP3, lo que promueve la proliferación de los fibroblastos cardíacos y su diferenciación a mio-fibroblastos (Cohn y Colucci, 2006). Este tipo celular secreta grandes cantidades de proteínas de la MEC, como colágeno, que se deposita alterando la estructura y la función de las fibras contráctiles adyacentes, afectando al funcionamiento cardíaco (Lighthouse y Small, 2016). En el presente trabajo, el grupo de ratas ALDO mostró un aumento significativo del contenido de colágeno cardíaco en comparación con las ratas CONTROL, lo que contribuiría al desarrollo de HC y a la alteración en la hemodinámica cardíaca observados en dicho grupo.

En las ratas del grupo ALDO de nuestro estudio, en comparación con las del grupo CONTROL, el aumento en la cantidad de colágeno cardíaco estuvo acompañado de la sobreexpresión cardíaca del CTGF. Se ha señalado que el efecto pro-fibrótico de la aldosterona es debido en parte a su acción directa sobre la expresión de varias

moléculas implicadas en el proceso de fibrosis que contribuyen a su vez al remodelado cardíaco, como por ejemplo el CTGF (Messaoudi *et al.*, 2013). Se ha observado, en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, que la aldosterona incrementa la expresión del CTGF cardíaco mediante un mecanismo dependiente de la activación del RM (Lee *et al.*, 2004; Martin-Fernandez *et al.*, 2014b; Messaoudi *et al.*, 2013). La sobreexpresión de este factor de crecimiento está asociada a una acumulación de proteínas de MEC, como el colágeno, según se ha descrito en lesiones ateroscleróticas humanas, tras infarto de miocardio y en tejidos vasculares y cardíacos en modelos de HTA (Kubota y Takigawa, 2015).

Por otra parte, nuestros resultados mostraron en el grupo de ratas ALDO+PRO80 en comparación con el grupo ALDO, una disminución significativa del PRC así como del contenido de colágeno cardíaco, que estuvieron acompañados a su vez de una menor expresión del CTGF cardíaco. Diversos estudios han mostrado la capacidad de las proantocianidinas de reducir la hipertrofia del corazón y la fibrosis asociada en modelos animales de HC (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a; Zuo *et al.*, 2010; Zuo *et al.*, 2011). En dichos estudios, el tratamiento con proantocianidinas disminuyó el peso relativo del corazón y el depósito de colágeno de aquellos animales que desarrollaron HC, disminuyendo además, la expresión de marcadores de fibrosis como el TGF $\beta$  y el CTGF.

### 1.3 Inflamación y oxidación

Junto con el desarrollo de fibrosis, también se observó un aumento en los niveles del CD68 en los corazones de las ratas del grupo ALDO en comparación con los del grupo CONTROL. Este dato parece sugerir la existencia de una mayor población de macrófagos inducida por la aldosterona, que estaría a su vez relacionada con el elevado grado de fibrosis encontrada en el grupo ALDO. Estudios previos demuestran que la aldosterona produce inflamación tisular, un proceso que acelera el desarrollo de fibrosis y remodelado (Aoyagi y Matsui, 2011; Gilbert y Brown, 2010). En el corazón, la aldosterona produce inflamación tanto en los cardiomiocitos como en los fibroblastos cardíacos a través de la activación de factores de transcripción implicados en procesos pro-inflamatorios, entre los que destaca el  $\text{NF}\kappa\beta$  (Aoyagi y Matsui, 2011; Gilbert y Brown, 2010; Queisser y Schupp, 2012). La producción de quimiocinas a través del  $\text{NF}\kappa\beta$  estimula el reclutamiento de monocitos, que una vez han infiltrado el tejido, se diferencian en macrófagos productores de citoquinas pro-inflamatorias (Kolattukudy y Niu, 2012). El aumento en la población de macrófagos (y por tanto de su marcador de superficie, el CD68) inducido por la aldosterona, viene acompañado de un aumento del proceso de fibrosis, como se ha demostrado en el modelo en ratón de hiperaldosteronismo intra-cardíaco (Azibani *et al.*, 2012) y en los riñones de las ratas en el modelo de aldosterona más sal (Doi *et al.*, 2014; Martin-Fernandez *et al.*, 2016).

En el presente trabajo, el aumento en los niveles del marcador de macrófagos CD68 estuvo acompañado de una mayor expresión cardíaca del  $\text{TNF}\alpha$  en el grupo ALDO comparado con el grupo CONTROL, lo que demuestra que la aldosterona indujo

el desarrollo de inflamación cardíaca. Se ha demostrado que tanto los macrófagos activados, como los cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos, están implicados en la producción local de  $\text{TNF}\alpha$ , y que dicha producción ocurre por medio de la activación del factor  $\text{NF}\kappa\beta$  (Aoyagi y Matsui, 2011; Hohensinner *et al.*, 2007; Kolattukudy y Niu, 2012). Además, se sabe que tanto los cardiomiocitos como los fibroblastos cardíacos, una vez estimulados por el  $\text{TNF}\alpha$ , aumentan a su vez la expresión de factores estimulantes de macrófagos, favoreciendo la proliferación y supervivencia de estas células del sistema inmune, induciendo así la producción de más citoquinas pro-inflamatorias (Hohensinner *et al.*, 2007). Así mismo, se ha demostrado que la sobreexpresión cardíaca del  $\text{TNF}\alpha$  conduce al desarrollo de HC (Funakoshi *et al.*, 2002) y que la expresión de esta citoquina está aumentada en modelos animales de HC y en pacientes con IC (Hori y Yamaguchi, 2013; Sun *et al.*, 2007) mostrando sus efectos deletéreos sobre la estructura y función del cardíaca a través del aumento en la inflamación y el remodelado cardíaco.

Al igual que ocurre en el caso del  $\text{TNF}\alpha$ , en nuestro estudio el nivel de expresión proteica de la iNOS cardíaca estuvo aumentado significativamente respecto al grupo CONTROL. La iNOS es una de las enzimas implicadas en los mecanismos de daño celular asociados al proceso de inflamación, debido principalmente a que tanto el  $\text{TNF}\alpha$  como el  $\text{NF}\kappa\beta$  inducen su expresión (Aktan, 2004; Funakoshi *et al.*, 2002; Rastaldo *et al.*, 2007). La sobreexpresión de la iNOS cardíaca aumenta en gran medida la síntesis de NO, que una vez reacciona con el radical  $\bullet\text{O}_2^-$  produce peroxinitrito, una ROS especialmente dañina que ha sido asociada con una mayor inflamación cardíaca,

el infiltrado de macrófagos, la fibrosis y el desarrollo de HC (Mungrue *et al.*, 2002; Pacher *et al.*, 2007).

Así mismo, la expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPHox aumentó en los corazones de las ratas que recibieron aldosterona y en las células H9c2 estimuladas con aldosterona en comparación con los grupos CONTROL. Adicionalmente, en las células H9c2 estimuladas con aldosterona, la sobreexpresión de p22phox estuvo acompañada del aumento en producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  y de la disminución de la supervivencia celular, ambas de manera significativa respecto al grupo CONTROL. Por el contrario, el bloqueo del RM mediante la co-incubación con espironolactona de las células estimuladas con aldosterona, previno la sobreexpresión proteica de p22phox y el aumento en la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  y mejoró la supervivencia celular respecto al grupo ALDO. La aldosterona es uno de los factores que promueven el aumento en la producción de ROS (Bayorh *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2002). Numerosos grupos de investigación han demostrado que la aldosterona, a través del RM, induce la expresión de la subunidad p22phox tanto a nivel renal, como vascular y cardíaco (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a; Park *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2002), aumentando el estrés oxidativo e induciendo una mayor inflamación y fibrosis. Así mismo, estudios *in vitro*, entre los que se incluyen ensayos con cardiomiocitos, han demostrado que la estimulación con aldosterona produce un aumento de la muerte celular a través del incremento en la generación de ROS (Ding *et al.*, 2012; Patni *et al.*, 2007) y de la activación de moléculas pro-apoptóticas (Chen *et al.*, 2009; Kitada *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2013). En cardiomiocitos de rata estimulados con aldosterona se demostró que la muerte celular inducida por la acumulación de ROS es consecuencia

de la sobreactivación de la NADPHox. El uso de antagonistas del RM o de antioxidantes como la N-acetilcisteína o el tempol redujo la actividad de la NADPHox y la sobreproducción de ROS, previniendo la muerte celular (Hayashi *et al.*, 2008; Rude *et al.*, 2005). Por tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados *in vivo* e *in vitro* y los antecedentes citados, la aldosterona estaría aumentando la expresión proteica cardíaca de p22phox mediante la activación del RM. Una mayor expresión de p22phox estaría induciendo el daño oxidativo a través del aumento en la producción de ROS. Esto contribuiría al desarrollo de la mayor inflamación y fibrosis cardíaca observada en las ratas del grupo ALDO y de la menor supervivencia celular obtenida en las células estimuladas con aldosterona.

Por otra parte, en el grupo ALDO+PRO80 se observó que el CD68 estaba disminuido significativamente comparado con el grupo ALDO. Este resultado demuestra una menor presencia de macrófagos y por tanto sugiere un menor grado de inflamación promovido por las proantocianidinas. Recientemente se ha demostrado que uno de los efectos antiinflamatorios de la proantocianidinas radica en su propiedad para bloquear la diferenciación de los monocitos a macrófagos, reduciéndose así el infiltrado de éstos, acompañado de una menor expresión de sus marcadores de membrana, como el CD68, y de una menor respuesta inflamatoria (Mohana *et al.*, 2015).

A su vez, las proantocianidinas redujeron los niveles cardíacos de expresión proteica del TNF $\alpha$  y de la iNOS en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO. Estos resultados indican que PRO80 disminuyó la inflamación y la oxidación cardíaca producida por la aldosterona. Estudios realizados tanto *in vitro* e *in vivo* en modelos

animales así como en humanos, han revelado que las proantocianidinas son capaces de modular directamente la expresión de factores clave implicados en los mecanismos de inflamación y oxidación (Cos *et al.*, 2004). Se ha demostrado en linfocitos T humanos que las proantocianidinas reducen tanto la expresión del NFκβ como su actividad, uniéndose directamente a él y bloqueando su acción (Mackenzie *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado en células humanas de intestino que las proantocianidinas bloquean la unión del TNFα a su receptor uniéndose a éste, impidiendo en consecuencia la activación del NFκβ dependiente del TNFα (Erlejman *et al.*, 2008). De esta manera, la expresión de aquellas proteínas cuya transcripción está regulada por el NFκβ, como son el TNFα y la iNOS, disminuye, lo que se traduce en un menor estrés oxidativo e inflamación (Cos *et al.*, 2004; Nandakumar *et al.*, 2008). El efecto de las proantocianidinas sobre la disminución en la expresión de la iNOS observado en nuestro estudio, ha sido documentado también en macrófagos activados de ratón donde la administración de un extracto rico en proantocianidinas procedente de semilla de uva, mostró la capacidad de disminuir la actividad transcripcional del factor NFκβ en un 40% y de bloquear en consecuencia la expresión de la iNOS (Terra *et al.*, 2007).

El tratamiento con proantocianidinas también logró disminuir la expresión cardíaca de p22phox en el grupo ALDO+PRO80 en comparación con el grupo ALDO. Así mismo, en las células H9c2 estimuladas con aldosterona, la expresión proteica de p22phox disminuyó significativamente con la co-incubación con proantocianidinas respecto al grupo ALDO. Se ha sugerido que este efecto de las proantocianidinas sobre la NADPHox estaría mediado por el bloqueo del RM (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a). En

nuestro estudio, dicho efecto fue similar al obtenido con la co-incubación con el antagonista del RM espironolactona, lo que apoya la teoría de que las proantocianidinas estén bloqueando el RM. Adicionalmente, la co-incubación con proantocianidinas de las células H9c2 estimuladas con aldosterona previno por completo el aumento en la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  y la disminución de la supervivencia celular. Nuevamente, este efecto fue comparable al obtenido con la co-incubación con espironolactona. En el caso de la co-incubación a dosis máximas, los niveles de producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  en las células fueron incluso significativamente menores con las proantocianidinas que con la espironolactona, lo que muestra la mayor capacidad antioxidante de las proantocianidinas. Uno de los mecanismos mediante los cuales las proantocianidinas reducen la cantidad de ROS es a través de la disminución de la expresión y actividad de la NADPHox (Alvarez *et al.*, 2012). Como antioxidantes naturales, se ha demostrado que las proantocianidinas tienen la capacidad de reducir el daño celular producido por las ROS y por tanto de disminuir la respuesta inflamatoria asociada al aumento del estrés oxidativo (Kruger *et al.*, 2014). Además, promueven la expresión de enzimas antioxidantes (Chiang *et al.*, 2006) y reducen la expresión de enzimas pro-oxidantes, como la NADPHox (Alvarez *et al.*, 2012). Al igual que los antagonistas del RM, las proantocianidinas también han demostrado la capacidad de prevenir la muerte celular, lo que ha sido asociado a sus efectos antioxidantes principalmente. En un estudio previo realizado en cardiomiocitos de pollo estimulados con peróxido de hidrógeno, la co-incubación con un extracto de uva rico en proantocianidinas previno la sobreproducción de ROS, mejorando la supervivencia celular (Shao *et al.*, 2003). En otro estudio llevado a cabo en un modelo de isquemia en células H9c2 se demostró que a concentraciones micromolares las

proantocianidinas aumentaron la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD1 resultando en una menor cantidad de ROS y una mayor supervivencia celular (Du *et al.*, 2007).

Tomados en conjunto, nuestros resultados *in vitro* muestran que las proantocianidinas protegen frente a la muerte celular, la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  y el aumento en la expresión proteica de p22phox inducidas por la aldosterona. Estos resultados, similares a los obtenidos con el antagonista del RM espironolactona, apoyan la teoría de que las proantocianidinas estén actuando a través del bloqueo del RM.

## 2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA CARDÍACA DE SGK1, ENAC, NEDD4-2 Y pNEDD4-2 EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA

En el presente estudio, la expresión proteica del SGK1 cardíaco aumentó significativamente en el grupo de ratas ALDO respecto al grupo CONTROL. Así mismo, la estimulación de células H9c2 con aldosterona produjo un aumento significativo de la expresión proteica del SGK1 respecto al grupo CONTROL. La activación del RM por parte de la aldosterona estaría dando lugar al aumento de la expresión proteica del SGK1 observado. Estudios previos han demostrado que la expresión del SGK1 aumenta con la activación del RM (Lang *et al.*, 2009; Pearce, 2001), estando inhibida por los antagonistas del mismo (Lang *et al.*, 2006; Lang y Stournaras, 2013; Martin-Fernandez *et al.*, 2014b). La aldosterona induce la transcripción del SGK1 a los 30 minutos de ser añadida en células del TCC en cultivo y no requiere la síntesis de nuevas proteínas, lo que indica que el SGK1 es un gen activado como respuesta temprana a la aldosterona (Naray-Fejes-Toth y Fejes-Toth, 2000). En el anterior estudio, el bloqueo del RM inhibió los efectos de la aldosterona sobre la transcripción del SGK1. En ensayos realizados en ratas a las que se les administró aldosterona, el aumento en la transcripción del SGK1 fue detectado al cabo de 1 hora en el riñón y el colon (Bhargava *et al.*, 2001). Así mismo, en el corazón de ratas a las que se les administró aldosterona más sal, la expresión génica del SGK1 cardíaco aumentó, mientras que el bloqueo del RM por la espironolactona previno su sobreexpresión (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a).

Los niveles cardíacos elevados de SGK1 estuvieron acompañados de la sobreexpresión proteica cardíaca del CTGF, el TNF $\alpha$  y la iNOS en los corazones de las ratas ALDO en comparación con las ratas CONTROL. El SGK1 podría ser uno de los factores clave que esté mediando el aumento en la expresión de dichas proteínas, contribuyendo a través de ellas al desarrollo de la fibrosis, la inflamación y la oxidación cardíaca. Como se ha demostrado en investigaciones previas, el SGK1 media la activación de importantes factores de transcripción implicados en fibrosis, inflamación y oxidación, entre los que destaca el NF $\kappa$ B (Tai *et al.*, 2009; Terada *et al.*, 2012). El NF $\kappa$ B permanece normalmente inhibido en el citoplasma por la unión a su represor I $\kappa$ B. Sin embargo, el SGK1 activa por fosforilación a la quinasa IKK $\beta$ , que fosforila a su vez al I $\kappa$ B, liberando de esta manera al NF $\kappa$ B (Lang *et al.*, 2006; Tai *et al.*, 2009; Terada *et al.*, 2012). El SGK1, a través de la activación del NF $\kappa$ B, promueve la expresión del CTGF (Terada *et al.*, 2012), del TNF $\alpha$  (Kolattukudy y Niu, 2012) y de la iNOS (Aktan, 2004), contribuyendo al desarrollo de la fibrosis, la inflamación y la sobreproducción de ROS como el NO y el peroxinitrito.

Por otra parte, nuestros resultados muestran por primera vez que las tres subunidades del ENaC se expresan en el corazón y que además la aldosterona estimula la sobreexpresión proteica cardíaca de la subunidad  $\gamma$ ENaC. Estudios previos han descrito que este canal se expresa fundamentalmente en el pulmón (Matsushita *et al.*, 1996), riñón (Ciampolillo *et al.*, 1996; Duc *et al.*, 1994) y colon (Duc *et al.*, 1994) y que la aldosterona, dependiendo del tejido, aumenta la expresión de una u otra de sus subunidades estimulado así la captación de sodio (Garty, 2000; Masilamani *et al.*, 1999). Sin embargo, no existen datos acerca de su expresión a nivel cardíaco. La

sobreexpresión del  $\gamma$ ENaC que observamos en el grupo ALDO, podría deberse tanto al aumento de la activación del RM cardíaco por parte de la aldosterona como a la sobreexpresión del SGK1 cardíaco. El RM, una vez activado por la aldosterona, se transloca al núcleo para inducir directamente la transcripción del ENaC (Garty, 2000; Lang *et al.*, 2009; Masilamani *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha señalado que el SGK1 también podría inducir por sí mismo, independientemente del grado de activación del RM, la expresión del ENaC mediante la fosforilación de determinados factores de transcripción implicados en la regulación de la transcripción del ENaC (Boyd y Naray-Fejes-Toth, 2005; Lang *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2014). En nuestro estudio, la sobreexpresión proteica del  $\gamma$ ENaC cardíaco observada en el grupo ALDO respecto al grupo CONTROL, sugiere que la aldosterona estaría promoviendo un aumento en la captación cardíaca de sodio a través del ENaC. Un estudio previo demostró que la aldosterona indujo la sobreexpresión del  $\gamma$ ENaC sin alterar la expresión basal del  $\alpha$ ENaC ni del  $\beta$ ENaC, en células del epitelio endometrial murino (Tsang *et al.*, 2001). En dicho estudio, la corriente de entrada de sodio debida al ENaC aumentó en gran medida por la aldosterona, mientras que el silenciamiento génico del  $\gamma$ ENaC con ARN antisentido redujo drásticamente dicha corriente. Otro estudio realizado en oocitos de *xenopus laevis* concluyó que la subunidad  $\gamma$ ENaC es fundamental para que el ENaC alcance su capacidad máxima en la captación del sodio extracelular, estabilizando el trímero  $\alpha\beta\gamma$  (Konstas y Korbmacher, 2003). Por tanto, la sobreexpresión del  $\gamma$ ENaC cardíaco observada en el grupo ALDO de nuestro estudio, podría estar promoviendo por sí sola la entrada de sodio independientemente del nivel de expresión del resto de subunidades, mejorando además la estabilidad del trímero  $\alpha\beta\gamma$ .

El ENaC ha sido ampliamente estudiado en el riñón, donde el aumento en su expresión y/o actividad se traduce en una captación masiva de sodio y en el desarrollo de HTA, que sostenida en el tiempo, lleva a la HC (Bubien, 2010; Fuller y Young, 2005; Schild y Kellenberger, 2001; Wulff *et al.*, 2002; Zaika *et al.*, 2013). Sin embargo hasta el momento, no se ha estudiado el papel del ENaC en el aumento de la captación de sodio en el corazón y su relación con la HC inducida por la aldosterona. El presente trabajo aporta datos novedosos sobre como la aldosterona podría estar aumentando la entrada de sodio en el corazón a través de la regulación al alza del  $\gamma$ ENaC cardíaco. La captación excesiva de sodio en el corazón estaría relacionada con las alteraciones estructurales y funcionales observadas en los corazones del grupo ALDO. Dada la importancia del sodio en la electrofisiología cardíaca, el mantenimiento de su equilibrio iónico resulta imprescindible para el correcto funcionamiento del corazón. Durante el desarrollo de la HC, se produce un desajuste en la homeostasis iónica estimulada por cambios en la expresión génica de transportadores iónicos (Pogwizd *et al.*, 2001), especialmente en los transportadores cardíacos implicados en la captación de sodio (Cingolani y Ennis, 2007; Nakamura *et al.*, 2008) como sería el ENaC. En la HC, como consecuencia del cambio en la expresión de los transportadores de sodio, la captación del mismo en el corazón está aumentada. Este efecto ha sido demostrado en estudios previos realizados en modelos celulares y animales de HC, donde se ha observado un incremento particularmente elevado de la  $[Na^+]_i$  cardíaca (Coppini *et al.*, 2013; Verdonck *et al.*, 2003a, b). El aumento en la captación de sodio en el corazón supone a su vez un factor determinante en la transición de la HC a la IC, empeorando la función diastólica y aumentando el riesgo de arritmias ventriculares (Cingolani y

Ennis, 2007; Coppini *et al.*, 2013; Louch *et al.*, 2010; Popov *et al.*, 2012; Verdonck *et al.*, 2003b).

La sobreexpresión del SGK1 y del  $\gamma$ ENaC, estuvo acompañada por un aumento de la expresión del Nedd4-2 cardíaco, descrito por primera en el presente estudio. Teniendo en cuenta que la función principal del Nedd4-2 es disminuir la cantidad de canales ENaC favoreciendo su degradación, su sobreexpresión en el grupo ALDO puede interpretarse como un mecanismo compensatorio ante el posible aumento en la captación de sodio mediado por el aumento en la expresión del  $\gamma$ ENaC cardíaco. De manera similar al ENaC, el Nedd4-2 ha sido estudiado fundamentalmente en el riñón (Goel *et al.*, 2015; Yang y Kumar, 2010). En corazón, se ha demostrado su expresión relacionándolo con la regulación de otros canales de sodio (Albesa *et al.*, 2011; van Bemmelen *et al.*, 2004).

La sobreexpresión del Nedd4-2 cardíaco observada en el grupo de ratas ALDO, estuvo acompañada a su vez de un aumento significativo de pNedd4-2, así como de la relación pNedd4-2/Nedd4-2 total, respecto al grupo CONTROL. Estos resultados indican que en el grupo ALDO, a pesar del aumento en la expresión del Nedd4-2, el SGK1 sobreexpresado estaría promoviendo la fosforilación y consecuente inhibición del mismo. La inactivación del Nedd4-2 aumentaría en consecuencia el número de canales ENaC cardíacos y por tanto del sodio captado a través de ellos. Se ha demostrado que el SGK1 interacciona con el Nedd4-2 fosforilándolo en la serina 436 (Chandran *et al.*, 2011; Debonneville *et al.*, 2001). Esta fosforilación reduce la

capacidad del Nedd4-2 para ubiquitinar a las subunidades del ENaC para que sean degradadas en el proteosoma, llevando a un incremento en la expresión del ENaC en la superficie celular (Debonneville *et al.*, 2001). La fosforilación del Nedd4-2 realizada por el SGK1 promueve la unión del pNedd4-2 a la proteína de anclaje 14-3-3, formando un complejo estable que protege al pNedd4-2 frente a la desfosforilación (Ichimura *et al.*, 2005). En consecuencia, pNedd4-2 aumenta y estimula en gran medida la captación de sodio a través del ENaC (Lang *et al.*, 2014).

En conjunto, la sobreexpresión del SGK1, del  $\gamma$ ENaC y de la relación pNedd4-2/Nedd4-2 en el grupo ALDO comparado con el grupo CONTROL, sugieren que la aldosterona estaría estimulando el aumento de la entrada de sodio en el corazón a través del ENaC. La mayor entrada de sodio en las células cardíacas resultante contribuiría en gran medida al desarrollo de la HC y la disfunción diastólica observadas en el grupo ALDO.

Los resultados obtenidos por la administración de aldosterona fueron bloqueados o anulados por el tratamiento con proantocianidinas. La expresión proteica cardíaca del SGK1 en el grupo ALDO+PRO80 disminuyó significativamente respecto al grupo ALDO. A su vez, la co-incubación con proantocianidinas también disminuyó la sobreexpresión proteica del SGK1 en las células estimuladas con aldosterona. Este efecto fue comparable al obtenido con la co-incubación con espironolactona. Este resultado en particular, junto a los obtenidos en el modelo experimental animal, contribuye significativamente a la hipótesis de la actuación de las proantocianidinas

como posibles antagonistas del RM. Como consecuencia, y a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, las proantocianidinas se presentarían como una posible terapia alternativa para las alteraciones cardíacas asociadas a la estimulación del RM por la aldosterona. Estudios previos han demostrado los efectos beneficiosos del uso de los antagonistas del RM sobre el desarrollo de la HC y en el tratamiento de la IC, reduciendo la fibrosis, la inflamación y el estrés oxidativo en el corazón, mejorando en consecuencia la función cardíaca (Capuano *et al.*, 2002; Michea *et al.*, 2008; Ohtake *et al.*, 2014; Young, 2008; Young *et al.*, 2007). El bloqueo del RM mediante el uso de sus antagonistas ha mostrado su utilidad en el manejo de pacientes con enfermedad cardíaca. El uso de espironolactona en pacientes con IC en el estudio RALES (Pitt *et al.*, 1999) y el de eplerenona en pacientes que habían sufrido IAM en el estudio EPHEBUS (Pitt *et al.*, 2005), mejoró el pronóstico de la enfermedad y redujo la mortalidad en ambos casos. Al igual que los antagonistas del RM, las proantocianidinas parecen tener la capacidad de bloquear el RM. Un estudio previo demostró que un extracto rico en proantocianidinas disminuía la expresión *in vitro* del RM y lograba mimetizar los efectos de la espironolactona *in vivo* en el modelo en rata de aldosterona más sal (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a).

La disminución de la expresión proteica del SGK1 cardíaco en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO estaría relacionada a su vez con la disminución en la expresión proteica cardíaca de los factores CTGF, TNF $\alpha$  e iNOS, lo que estaría relacionado con la mejora estructural y funcional observada en los corazones del grupo ALDO+PRO80. Este efecto sobre dichos factores podría estar mediado por una menor activación del NF $\kappa$ B y una menor expresión del TGF $\beta$  como resultado de la bajada en la

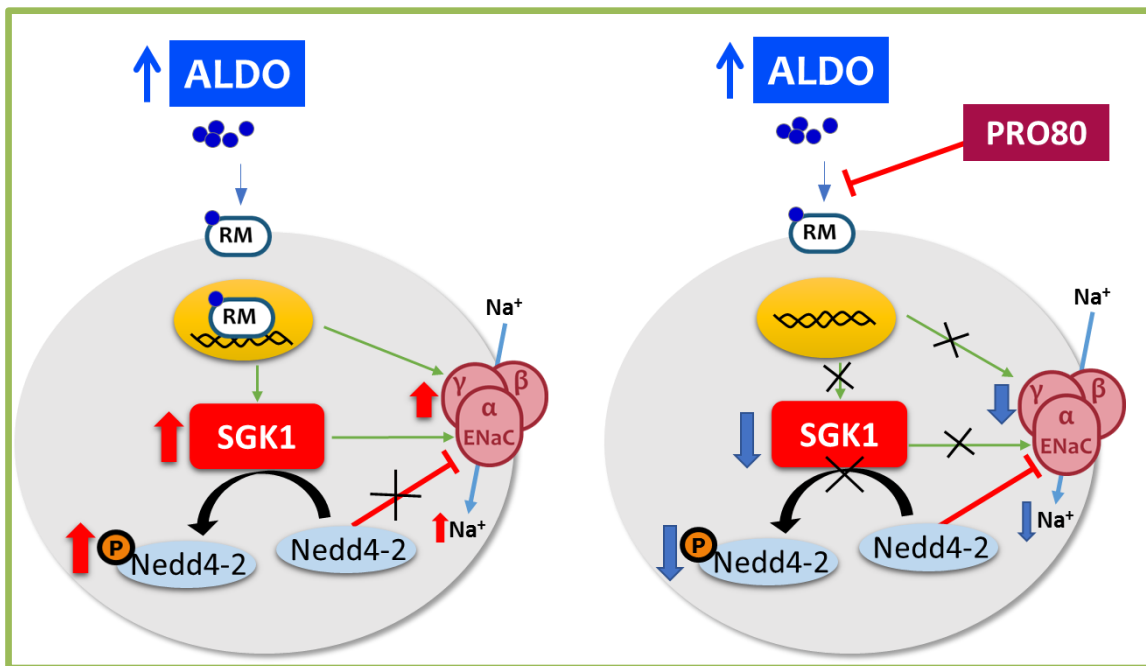
expresión del SGK1 observada en el grupo ALDO+PRO80. Estudios previos demuestran que la inactivación del SGK1 disminuye el grado de activación del NF $\kappa$ B, lo que se traduce en una menor expresión de proteínas relacionadas con la fibrosis, la inflamación y la oxidación, entre las que se encuentran el CTGF, el TNF $\alpha$  y la iNOS (Gilmore y Herscovitch, 2006; Leroy *et al.*, 2009; Terada *et al.*, 2012). Así mismo, se ha demostrado que en el corazón el SGK1 aumenta la expresión del TGF $\beta$  y éste del CTGF, llevando al desarrollo de fibrosis (Chen *et al.*, 2000; Martin-Fernandez *et al.*, 2014b). En concordancia, una menor expresión del SGK1 ha sido relacionada con una menor fibrosis cardíaca a través de la disminución de dichos factores pro-fibróticos (Martin-Fernandez *et al.*, 2014a).

Así mismo, las proantocianidinas redujeron la expresión aumentada por la aldosterona del  $\gamma$ ENaC en el grupo ALDO+PRO80. En el presente trabajo se muestra por primera vez que las proantocianidinas pueden bloquear la sobreexpresión del ENaC cardíaco. Tanto el RM activado por aldosterona como el propio SGK1 activarían mediante mecanismos distintos la transcripción del ENaC en el grupo ALDO+PRO80. Por ello, el posible bloqueo del RM y/o la disminución en la expresión proteica cardíaca del SGK1 explicarían la disminución de la expresión proteica del  $\gamma$ ENaC en el corazón de las ratas ALDO+PRO80. La disminución de la expresión de  $\gamma$ ENaC en el grupo ALDO+PRO80 estuvo acompañada de la reducción en los niveles cardíacos del pNedd4-2 en comparación con el grupo ALDO. Debido a que la fosforilación de Nedd4-2 está atribuida al SGK1, la disminución en los niveles proteicos del pNedd4-2 cardíaco encontrados en el grupo ALDO+PRO80 estarían directamente relacionados con la reducción en la expresión del SGK1. La relación pNedd4-2/Nedd4-2 en el grupo

ALDO+PRO80 disminuyó respecto al grupo ALDO lo que indica que la mayoría del Nedd4-2 cardíaco no estaba inhibido por el SGK1, si no que se encontraba en su forma funcional. Este resultado sugiere que el tratamiento con PRO80 estimuló el mecanismo de degradación del ENaC a través de la activación de Nedd4-2 en el grupo ALDO+PRO80. En consecuencia, el tratamiento con PRO80 estaría impidiendo en las ratas del grupo ALDO+PRO80 la entrada masiva de sodio en el corazón a través del ENaC, previniendo el desarrollo de las alteraciones cardíacas asociadas al exceso de sodio.

Por tanto, la reducción en la expresión proteica cardíaca del  $\gamma$ ENaC así como en la relación pNedd4-2/Nedd4-2 total sugiere que el tratamiento con PRO80 estaría confiriendo protección al corazón frente al aumento en la captación de sodio promovida por la aldosterona a través del ENaC. Este efecto parece estar mediado por el bloqueo del RM cardíaco por PRO80 y por la disminución de la expresión del SGK1. La disminución de la entrada masiva de sodio en el corazón, estaría relacionado con el menor grado de HC y la mejora en la función cardíaca observada en el grupo ALDO+PRO80 comparado con el grupo ALDO.

En la figura 48 se representan en un esquema las acciones inhibitoras que PRO80 estaría promoviendo sobre el mecanismo de captación de sodio a través del ENaC inducido por la aldosterona.



**Figura 48.** Mecanismo de acción de la aldosterona sobre la captación de sodio a través del ENaC en el corazón (izquierda) y efecto de las proantocianidinas sobre el mismo (derecha). La administración de aldosterona activa el RM en las células (izquierda), lo que induce el aumento en la expresión proteica cardíaca de SGK1 y  $\gamma$ ENaC. A su vez, SGK1 promueve la inactivación de Nedd4-2 por fosforilación, lo que protege al ENaC de su degradación. Como consecuencia, la aldosterona aumentaría la captación de sodio en el corazón a través del ENaC. Por su parte, PRO80 bloquearía la unión de la aldosterona al RM (derecha) disminuyendo la expresión proteica de SGK1 y  $\gamma$ ENaC y el nivel de fosforilación de Nedd4-2, lo que reduciría la captación de sodio en el corazón a través del ENaC. ALDO, aldosterona; PRO80, extracto con un 80% de proantocianidinas; RM, receptor de mineralocorticoides; SGK1, quinasa regulada por suero y glucocorticoides tipo 1; Nedd4-2, ubiquitina ligasa E3 precursor neuronal de células en desarrollo regulado a la baja 4-2; ENaC, canal epitelial de sodio; P, fosforilación.

### **3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PRO80 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA CARDÍACA DE MEDIADORES RELACIONADOS CON EL TRANSPORTE DE POTASIO, SODIO Y CALCIO EN RATAS A LAS QUE SE LES ADMINISTRÓ ALDOSTERONA**

Las alteraciones estructurales y funcionales observadas descritas hasta el momento en el grupo ALDO estuvieron acompañadas de cambios en la expresión proteica cardíaca de los transportadores iónicos ROMK, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa (subunidad  $\alpha$ 1), NHE1, Ca<sub>v</sub>1.2 (subunidad  $\alpha$ 1C) y NCX1 y en la auto-fosforilación y oxidación de la proteína CaMKII. Estas proteínas están implicadas en el mantenimiento del equilibrio iónico cardíaco. En el grupo ALDO+PRO80, el tratamiento con PRO80 previno los cambios inducidos por la aldosterona en la expresión proteica cardíaca de dichos transportadores iónicos y la auto-fosforilación y oxidación de la CaMKII. A través de la regulación de las proteínas estudiadas, PRO80 podría estar contribuyendo a restablecer el equilibrio iónico alterado por la administración de aldosterona, lo que ayudaría a prevenir los cambios estructurales y funcionales cardíacos inducidos por la hormona.

#### **3.1 Canal de potasio medular exterior renal, ROMK**

La administración de aldosterona produjo la sobreexpresión proteica del ROMK en los corazones de las ratas ALDO comparado con el grupo CONTROL. En el presente

trabajo se muestra por primera vez que la aldosterona produce el aumento en la expresión del ROMK en el corazón. Estudios previos han demostrado que en el riñón, la aldosterona induce la expresión del ROMK (Beesley *et al.*, 1998; Wald, 1999) y que el SGK1 estimula su actividad (Lang *et al.*, 2006; Welling y Ho, 2009; Yoo *et al.*, 2003). Por tanto la sobreexpresión cardíaca del SGK1 observada en el grupo ALDO podría estar aumentando por fosforilación la actividad del ROMK cardíaco. La sobreexpresión y estimulación del ROMK renal por la aldosterona aumenta la salida celular de potasio dando lugar a una mayor excreción renal de potasio (Beesley *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 2003). Aunque se ha demostrado que los niveles de expresión del ROMK cardíaco son comparables a los de otros miembros de la familia Kir tradicionalmente estudiados en el corazón, como el Kir2.1 (Han *et al.*, 2010; Spector *et al.*, 2008), actualmente no existen estudios sobre la sobreexpresión o sobreactivación del ROMK cardíaco o Kir1.1. Los canales Kir solo permiten la salida de potasio cuando las células están al final de la fase de repolarización y durante la fase de reposo, por lo que su principal función es la de contribuir a alcanzar y mantener el potencial de reposo (Anumonwo y Lopatin, 2010). Por tanto, al igual que los demás canales Kir cardíacos, se ha sugerido que el ROMK estaría favoreciendo la repolarización cardíaca (Han *et al.*, 2010; Spector *et al.*, 2008) de manera que cambios en su actividad o expresión podrían tener efectos perjudiciales. Estudios previos han relacionado la sobreexpresión de los canales Kir con alteraciones cardíacas, como las arritmias (Ehrlich, 2008) y el desarrollo de HC (Li *et al.*, 2004). Se ha demostrado en ratones transgénicos que la sobreexpresión del Kir2.1 cardíaco conduce al desarrollo de HC y al aumento de la corriente de salida de potasio durante la repolarización en los cardiomiocitos de dichos ratones, acortándose la duración del potencial de acción (Li *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha relacionado el

aumento en la expresión de los canales Kir con el grado de disfunción ventricular, habiéndose encontrado niveles de expresión génica y proteica elevados de distintos canales Kir cardíacos en corazones de pacientes con cardiopatía dilatada y disfunción ventricular (Ortega *et al.*, 2015; Szuts *et al.*, 2013). Así mismo, la sobreexpresión del ROMK ha sido relacionada con el desarrollo de HTA (Hoagland *et al.*, 2004; Sonalker *et al.*, 2004), mientras que polimorfismos de pérdida de función o su inhibición farmacológica protegen frente a la misma (Fang *et al.*, 2010; Garcia y Kaczorowski, 2014; Ji *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta los antecedentes citados, podríamos proponer que la sobreexpresión del ROMK en el grupo ALDO y su posible sobreactivación por el SGK1 favorecerían el desarrollo de HTA así como la salida de potasio durante la fase de repolarización en las células cardíacas. En el corazón, esta situación podría dar lugar a un desajuste en el equilibrio iónico que promovería las alteraciones en la función cardíaca y el desarrollo de la HC observadas en el grupo ALDO.

En el presente estudio, las proantocianidinas disminuyeron significativamente la expresión proteica cardíaca del ROMK en el grupo de ratas ALDO+PRO80 comparado con el grupo ALDO. Diversos estudios llevados a cabo en modelos animales y celulares donde se sobreexpresaron o estimularon los canales Kir, han demostrado los efectos beneficiosos de la disminución de los niveles de expresión y/o la actividad de los canales Kir cardíacos, resultando en la mejora de la función cardíaca y disminuyendo el riesgo de arritmias (Hattori *et al.*, 2012; Ortega *et al.*, 2015; Szuts *et al.*, 2013). La disminución de la expresión del ROMK en el grupo ALDO+PRO80 podría haber contribuido al restablecimiento de la corriente de salida de potasio durante la

repolarización. Por tanto, se podría sugerir que el tratamiento con PRO80 lo estaría mejorando la función cardíaca y disminuyendo el grado de HC observada en el grupo ALDO a través de la regulación del ROMK.

### **3.2 Bomba de sodio-potasio dependiente de ATP, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>**

#### **ATPasa: subunidad $\alpha$ 1**

La expresión cardíaca de la subunidad  $\alpha$ 1 de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa disminuyó en el grupo de ratas ALDO en comparación con el grupo de ratas CONTROL. Estudios previos realizados en modelos celulares y animales de HC así como en pacientes con HC e IC han demostrado que en dichas patologías existe una disminución en la expresión y en la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa cardíaca que ha sido asociada al aumento de las ROS (Kjeldsen, 2003; Liu *et al.*, 2006; Mihailidou *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 1999). En cardiomiocitos, se ha observado que una mayor producción de ROS está relacionada con la oxidación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa dando como resultado la inhibición de su actividad y su degradación (Liu *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios previos llevados a cabo en ratones *knock-out* para uno de los alelos de la subunidad  $\alpha$ 1 de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa, demostraron que la menor expresión de dicha subunidad afectó a la capacidad contráctil de los corazones y a la función cardíaca de los animales (Dostanic *et al.*, 2004; James *et al.*, 1999). Así mismo, un estudio realizado en cardiomiocitos de perro con HC demostró que la disminución de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa cardíaca estuvo acompañada del aumento en la entrada de sodio afectando a la contractilidad del corazón (Verdonck *et al.*, 2003a).

Adicionalmente, estudios sobre el remodelado cardíaco post-infarto realizados en ratas, indicaron que tanto la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa cardíaca como la salida de sodio y la entrada de potasio disminuyeron, alterando la contractilidad cardíaca (Stefanon *et al.*, 2009). Por tanto, la disminución de la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa cardíaca observada en el grupo ALDO, junto con el aumento en la expresión del  $\gamma\text{ENaC}$  observada en el mismo grupo, estarían participando en la alteración de la homeostasis iónica del sodio cardíaco. Se ha demostrado ampliamente que el desajuste en la homeostasis del sodio en el corazón juega un papel fundamental en el desarrollo de múltiples patologías cardíacas entre las que se incluyen la HC y la IC (Allen y Xiao, 2003; Engelhardt *et al.*, 2002; Ingwall, 1995; Schmidt y Kjeldsen, 1997). Por ejemplo, se ha comprobado que la capacidad contráctil del miocardio es altamente sensible a los cambios en las concentraciones de sodio dentro y fuera de la célula y que el aumento en la captación de sodio promueve la disfunción diastólica y la transición de HC a IC (Abete y Vassalle, 1988; Coppini *et al.*, 2013; Hilgemann *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2012). Por tanto, nuestros resultados sugieren un desequilibrio en el balance del sodio cardíaco inducido por la aldosterona que contribuiría a la disfunción diastólica e HC observadas en el grupo ALDO.

Por otro lado, en el grupo ALDO+PRO80 la expresión cardíaca de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa aumentó significativamente en comparación con el grupo ALDO. Debido a la posible relación entre la disminución de la expresión proteica de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa y el estrés oxidativo citado anteriormente, cabría proponer que el aumento observado en el grupo ALDO+PRO80 podría deberse al efecto inhibitorio de PRO80 sobre la expresión proteica cardíaca de p22phox e iNOS. Como consecuencia,

las proantocianidinas disminuirían la producción de ROS estimulada por la aldosterona en las células cardíacas, protegiendo a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa de la oxidación y posterior degradación. Un estudio previo ha demostrado que la capacidad antioxidante de las proantocianidinas protege frente a la sobreproducción de ROS en modelos animales de isquemia-reperfusión, evitando la oxidación y degradación de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa (Zhao *et al.*, 2010). Otros estudios realizados en modelos celulares y animales de HC han demostrado que la disminución de las ROS mediante el uso de antioxidantes como la vitamina C o el extracto de té verde rico en catequinas protegen a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa cardíaca frente a la oxidación y degradación mediada por las ROS (Priyadarshi *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 1999). Se ha demostrado que el restablecimiento de la actividad y/o expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa protege frente al incremento de la entrada sodio en cardiomiocitos procedentes de animales con IC, mejorando la función cardíaca, evitando la disfunción contráctil y reduciendo la aparición de arritmias (Bers y Despa, 2009; Doshi y Marx, 2009). Por tanto, el aumento en los niveles proteicos de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa indicaría que las proantocianidinas podrían restablecer, al menos en parte, la salida de sodio y la entrada de potasio mediados por dicha bomba. Sumado a la disminución en la expresión proteica cardíaca del  $\gamma\text{ENaC}$  y el ROMK observadas en el grupo de ratas ALDO+PRO80, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con PRO80 estaría contribuyendo a restaurar el equilibrio iónico del sodio y el potasio en los corazones de las ratas ALDO+PRO80. Estos resultados estarían relacionados con la mejora en la función cardíaca observada en dicho grupo.

### 3.3 Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1, NHE1

La expresión proteica del NHE1 aumentó significativamente en los corazones de las ratas del grupo ALDO comparado con el grupo CONTROL. Estudios previos realizados en cardiomiocitos de rata han demostrado que la aldosterona, a través de la activación del RM, estimula la expresión del NHE1 resultando en la entrada masiva de sodio en las células y en su hipertrofia (Cingolani y Ennis, 2007; Karmazyn *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que la sobreexpresión del SGK1 cardíaco aumenta la fosforilación del NHE1 cardíaco, lo que estimula su actividad en gran medida incrementando la entrada de sodio a través del mismo (Voelkl *et al.*, 2012; Voelkl *et al.*, 2013). Por tanto en el grupo ALDO la sobreexpresión del SGK1 podría haber estimulado un aumento de la actividad del NHE1 produciendo un probable aumento de la entrada de sodio en el corazón. En modelos animales transgénicos se ha demostrado que la sobreexpresión del NHE1 cardíaco lleva al desarrollo de HC, disfunción contráctil e IC, encontrándose además un aumento exacerbado en la entrada de sodio en los cardiomiocitos de dichos animales (Mraiche *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2010). De igual manera, ensayos *in vitro* han demostrado que el aumento en la expresión del NHE1 resulta en la captación masiva de sodio y en la hipertrofia de los mismos (Jaballah *et al.*, 2015; Mohamed *et al.*, 2015). La sobreexpresión del NHE1 observada en el grupo ALDO de nuestro estudio acompañada de la sobreexpresión del  $\gamma$ ENaC y de la disminución de la expresión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa sugiere la sobrecarga de sodio en los corazones de dichos animales. Esta sobrecarga de sodio estaría promoviendo el desarrollo de la HC y las alteraciones funcionales observadas en los corazones del grupo ALDO.

En el grupo ALDO+PRO80, la expresión proteica del NHE1 cardíaco disminuyó significativamente en comparación con el grupo ALDO. Se ha demostrado que el uso de antagonistas del RM inhiben la expresión del NHE1 cardíaco reduciendo en consecuencia la sobrecarga de sodio en los cardiomiocitos y el desarrollo de HC asociado (Cingolani y Ennis, 2007; Karmazyn *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha observado que la inhibición del NHE1 *in vitro* e *in vivo* en modelos de HC e IC reduce la captación de sodio en los cardiomiocitos, previene el desarrollo de HC y celular y mejora la función cardíaca (Baartscheer *et al.*, 2005; Chahine *et al.*, 2005; Morris, 2002; Wu y Qi, 2012). A su vez, dados los efectos estimulantes del SGK1 sobre el NHE1, se ha sugerido que los inhibidores de esta quinasa también podrían ser útiles en el control de la sobrecarga de sodio inducida por el NHE1 y sus consecuencias patológicas (Lang y Voelkl, 2013). Como hemos propuestos anteriormente, las proantocianidinas podrían estar reduciendo la expresión del NHE1 a través del bloqueo del RM. Por tanto, nuestros resultados sugieren que las proantocianidinas prevendrían la entrada de sodio a través del NHE1 inducida por la aldosterona, contribuyendo a restablecer la homeostasis del sodio. Este efecto estaría directamente relacionado con la mejora estructural y funcional observada en los corazones del grupo ALDO+PRO80.

### 3.4 Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, Ca<sub>v</sub>1.2: subunidad $\alpha$ 1C

En nuestro estudio, la expresión proteica de la subunidad  $\alpha$ 1C del Ca<sub>v</sub>1.2 cardíaco aumentó significativamente en el grupo ALDO respecto al grupo CONTROL. Estudios previos han demostrado que la aldosterona aumenta la expresión del Ca<sub>v</sub>1.2 y la corriente de entrada de calcio en los cardiomiocitos a través del mismo produciendo remodelado cardíaco, HC y disfunción diastólica (Benitah y Vassort, 1999; Martín-Fernandez *et al.*, 2009). Así mismo, varios estudios han demostrado que la sobreactivación del Ca<sub>v</sub>1.2 debido a mutaciones de ganancia de función, resultan en el aumento en los niveles de calcio intracelulares durante la sístole y la diástole, lo que incrementa la contractilidad cardíaca, produce arritmias e induce el remodelado cardíaco (Dixon *et al.*, 2012; Shaw y Colecraft, 2013; Splawski *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha observado que el aumento de la corriente de entrada de calcio por medio del Ca<sub>v</sub>1.2 aumenta la cantidad de calcio liberado desde el retículo endoplasmático durante la contracción, lo que altera el acoplamiento EC aumentando la contractilidad cardíaca y el tiempo necesario para que se dé la relajación (Bers *et al.*, 2003). Por tanto, la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha$ 1C del Ca<sub>v</sub>1.2 observada en el grupo ALDO podría haber aumentado la entrada de calcio afectando a la contractilidad y distensibilidad de los corazones de las ratas del grupo ALDO contribuyendo a su vez al desarrollo de disfunción diastólica.

Por el contrario, la expresión proteica cardíaca de la subunidad  $\alpha 1C$  del  $Ca_v1.2$  disminuyó significativamente en el grupo ALDO+PRO80 en comparación con el grupo ALDO. Dicha disminución podría deberse al propuesto papel antagonista del RM de las proantociandinas. Estudios previos han demostrado que los antagonistas del RM disminuyen la expresión del canal  $Ca_v1.2$  cardíaco aumentada por la administración de aldosterona, restableciéndose el flujo normal de entrada de calcio a través de dicho canal (Benitah y Vassort, 1999; Wagner *et al.*, 2008). A su vez, se ha demostrado que el bloqueo del  $Ca_v1.2$  tiene efectos beneficiosos en modelos animales de HTA, disminuyendo el remodelado cardíaco, la HC y la disfunción diastólica previniendo la sobrecarga intracelular de calcio en los cardiomiocitos de dichos animales (Nagasawa *et al.*, 2015). Así mismo, en modelos animales de isquemia reperfusión, se ha observado que el bloqueo del  $Ca_v1.2$  mejora la función cardíaca del corazón y reduce el daño cardíaco asociado al aumento en la entrada celular de calcio (Viola *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes, podría plantearse que las proantociandinas habrían prevenido en el grupo ALDO+PRO80 la alteración en el acoplamiento EC y el acoplamiento ET a través de la disminución de la expresión de la subunidad  $\alpha 1C$  del  $Ca_v1.2$  cardíaco. Este efecto estaría relacionado con la menor HC y disfunción diastólica observadas en los corazones del grupo ALDO+PRO80.

### 3.5 Intercambiador de sodio-calcio tipo 1, NCX1

La aldosterona aumentó significativamente la expresión del NCX1 en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. Diversas investigaciones han demostrado que en la HC y la IC, el NCX1 está sobreexpresado (He *et al.*, 2015; Menick *et al.*, 2007). Dado que el NCX1 es una proteína crucial en la regulación de la entrada de calcio en el cardiomiocito (Menick *et al.*, 2007), su sobreexpresión afecta a las corrientes de calcio, lo que contribuye al desarrollo de disfunción diastólica y al riesgo incrementado de arritmias (Menick *et al.*, 2007).

En el grupo ALDO, el aumento de los niveles de  $\gamma$ ENaC, NHE1 y la disminución de los de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa apuntan a una mayor entrada de sodio y una menor salida del mismo, lo que podría haber activado el modo reverso del NCX1. Cuando el cardiomiocito es estimulado, debido al gran aumento en la entrada de sodio durante la despolarización de la membrana, las concentraciones de sodio dentro y fuera de la célula cambian drásticamente haciendo que el NCX1 actúe en modo reverso y, expulsando el exceso de sodio e introduciendo calcio a cambio (Despa y Bers, 2013; Giladi *et al.*, 2016). La relación entre el aumento en la entrada de sodio y el cambio a modo reverso del NCX1 ha sido demostrada en numerosos estudios donde, incluso un modesto aumento de menos de 10mM en la  $[\text{Na}^+]_i$  de reposo, es suficiente para que el NCX1 actúe en el modo reverso (Bers *et al.*, 2003; Despa y Bers, 2013; Giladi *et al.*, 2016). Por ejemplo, en un estudio realizado en cardiomiocitos de ratón, la estimulación de los canales de sodio dependientes de voltaje aumentó la corriente de entrada de sodio activando modo reverso del NCX1 e incrementándose la corriente de

entrada de calcio (Yan *et al.*, 2015). Además, debido a que el modo normal de acción del NCX1 supone el principal sistema implicado en expulsar fuera de la célula el exceso de calcio intracelular tras cada contracción (Despa y Bers, 2013), la inducción de su modo reverso de manera permanente tiene como consecuencia una eliminación más lenta del exceso de calcio (Bers *et al.*, 2003). Una tasa de expulsión de calcio más lenta puede alterar el acoplamiento EC, lo que ha sido relacionado con el desarrollo de disfunción diastólica y el riesgo aumentado de arritmias (Asp *et al.*, 2013; Bers *et al.*, 2003).

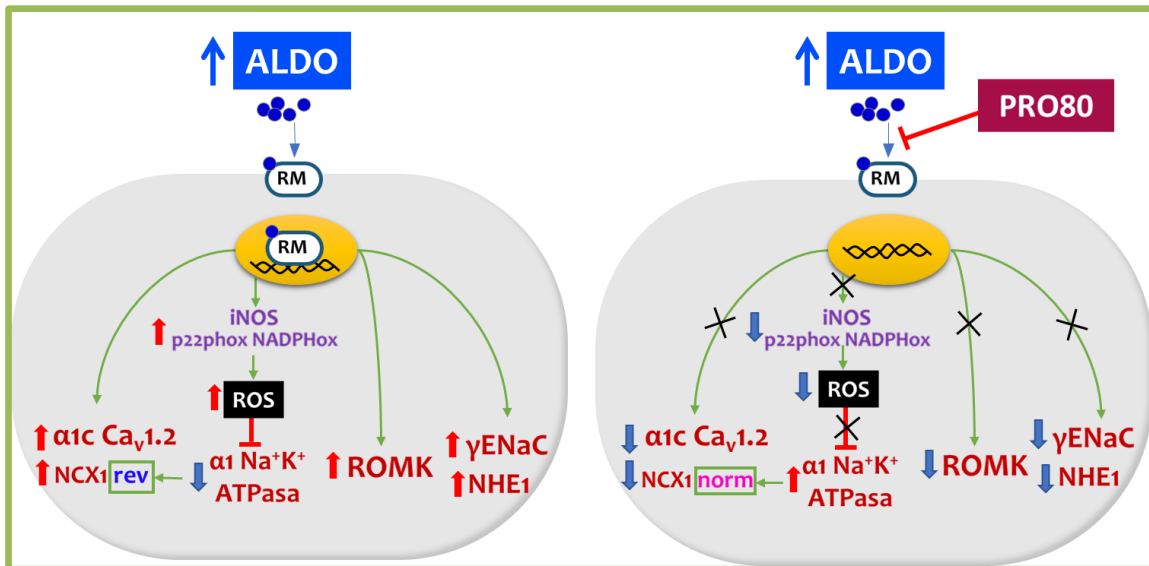
Los resultados obtenidos en el presente estudio, parecen indicar la activación del modo reverso del NCX1 en el grupo ALDO. Este efecto de la aldosterona contribuiría a compensar la disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa ayudando a expulsar el exceso de sodio intracelular.

En nuestro estudio, la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 1C$  del  $\text{Ca}_v1.2$  y del NCX1, posiblemente actuando en modo reverso, estarían contribuyendo al aumento de los niveles cardíacos de calcio en el grupo ALDO. En consecuencia, la homeostasis del calcio estaría alterada, afectando al acoplamiento EC y promoviendo el acoplamiento ET, lo que contribuiría a los cambios en la estructura y la función cardíacas observadas en el grupo de ratas ALDO respecto al grupo CONTROL.

El tratamiento con proantocianidinas disminuyó significativamente la expresión del NCX1 cardíaco del grupo ALDO+PRO80 en comparación con el grupo ALDO. Este efecto podría ser consecuencia del aumento en la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  de la

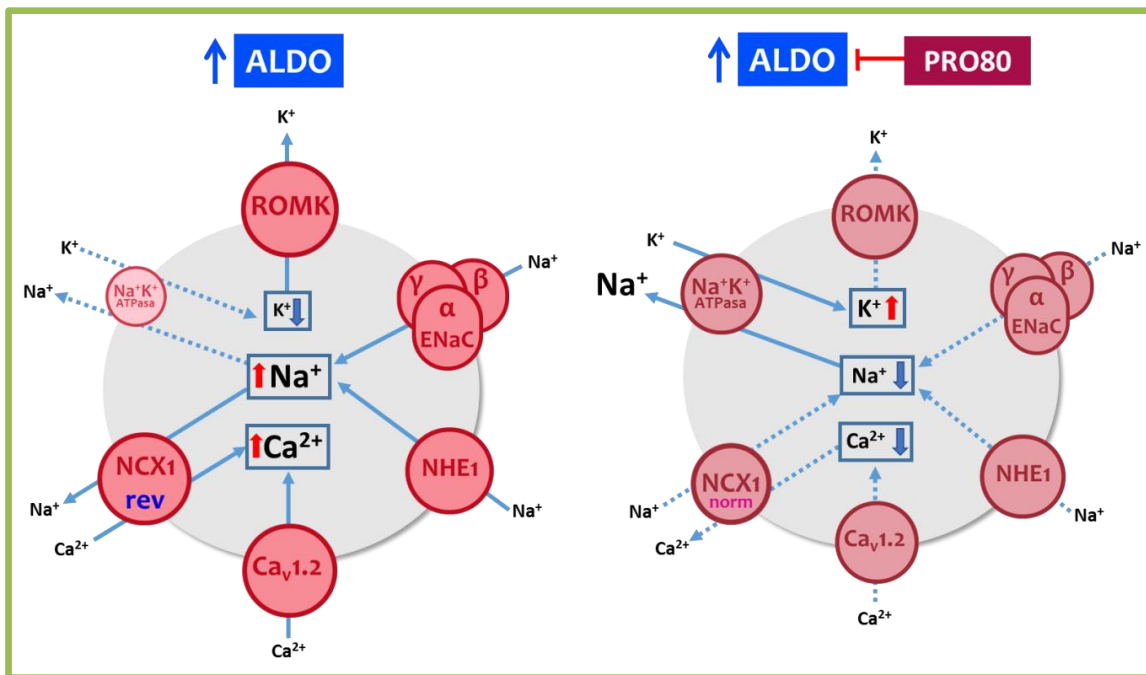
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa cardíaca observado en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO. De esta manera, las células cardíacas no necesitarían compensar una posible pérdida de función de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa con la sobreexpresión del NCX1 y su posible cambio al modo reverso. Como consecuencia, la entrada de calcio asociada al modo reverso del NCX1 habría sido menor. Numerosos estudios llevados a cabo en modelos animales de daño cardíaco por isquemia-reperfusión, HC e IC han demostrado que una menor actividad del modo reverso del NCX1 está asociada a una mejora en la función diastólica a través de la prevención en la sobrecarga intracelular de calcio (Hobai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2007). La disminución de la expresión del NCX1 cardíaco junto con la del  $\text{Ca}_v1.2$  observadas en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO, contribuirían a restablecer la homeostasis del calcio. Estos resultados estarían relacionados con la mejora en la función diastólica y el menor grado de HC observados en el grupo ALDO+PRO80 comparado con el grupo ALDO.

La figura 49 muestra los efectos del tratamiento con PRO80 sobre los cambios producidos por la aldosterona sobre la expresión de los transportadores iónicos cardíacos estudiados a través de un posible efecto antagonista del RM.



**Figura 49.** Efectos de la aldosterona (izquierda) e inhibidores de PRO80 sobre la expresión proteica cardíaca de los transportadores iónicos estudiados. A través del posible bloqueo del RM, PRO80 previene la expresión proteica cardíaca inducida por la aldosterona de transportadores de calcio ( $\alpha 1C$  Ca<sub>v</sub>1.2 y NCX1), potasio (ROMK) y sodio ( $\gamma$ ENaC y NHE1). Además, disminuye la expresión cardíaca de proteínas que aumentan el nivel de ROS (iNOS y p22phox NADPHox), lo que protege a la bomba sodio-potasio de la degradación e impide a su vez que el NCX1 actúe en modo reverso. ALDO, aldosterona; PRO80, extracto con un 80% de proantocianidinas; RM, receptor de mineralocorticoides;  $\alpha 1C$  Ca<sub>v</sub>1.2, subunidad  $\alpha 1C$  del canal de calcio dependiente de voltaje tipo L; NCX rev, modo de acción reverso del intercambiador de sodio-calcio tipo 1; NCX norm, modo de acción normal del intercambiador de sodio-calcio tipo 1; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; p22phox NADPHox, subunidad p22phox de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; ROS, especies reactivas de oxígeno;  $\alpha 1C$  Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasa, subunidad  $\alpha 1C$  de la sodio-potasio ATPasa; ROMK, canal de potasio medular exterior renal;  $\gamma$ ENaC, subunidad  $\gamma$  del canal epitelial de sodio; NHE1, intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1.

En la figura 50 se representan los efectos del tratamiento con PRO80 sobre los cambios producidos por la aldosterona en los transportadores iónicos del potasio, sodio y el calcio y sus posibles consecuencias sobre el intercambio iónico cardíaco.



**Figura 50.** Posibles cambios inducidos por la aldosterona (izquierda) e inhibidores de PRO80 (derecha) sobre los flujos del potasio, sodio y calcio mediados por los transportadores iónicos cardíacos estudiados. La aldosterona podría estar aumentando los flujos de entrada de sodio y calcio y de salida de potasio en el corazón a través del aumento en la expresión proteica cardíaca de los transportadores de sodio ( $\gamma$ ENaC y NHE1), potasio (ROMK), calcio ( $\alpha$ 1C  $Ca_v1.2$  y NCX1) y mediante la degradación de la bomba sodio-potasio ( $Na^+K^+ATPasa$ ). PRO80, a través de sus efectos inhibitorios de las acciones de la aldosterona sobre dichos transportadores, prevendría los cambios en los flujos del sodio, potasio y calcio inducidos por esta hormona, contribuyendo a restablecer el equilibrio iónico cardíaco. ALDO, aldosterona; PRO80, extracto con un 80% de proantocianidinas; ROMK, canal de potasio medular exterior renal; ENaC, canal epitelial de sodio; NHE1, intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 1;  $Ca_v1.2$ , canal de calcio dependiente de voltaje tipo L; NCX rev, modo de acción reverso del intercambiador de sodio-calcio tipo 1; NCX norm, modo de acción normal del intercambiador de sodio-calcio tipo 1;  $Na^+K^+ATPasa$ , sodio-potasio ATPasa. Las flechas sólidas indican aumento del flujo iónico y las punteadas disminución del mismo.

### 3.6 Contenido de calcio cardíaco y auto-fosforilación y oxidación de la quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2, CaMKII

El contenido de calcio cardíaco aumentó significativamente en el grupo ALDO comparado con el grupo CONTROL, lo que estaría relacionado con la HC y las alteraciones funcionales cardíacas inducidas por la aldosterona. El aumento en el contenido de calcio cardíaco podría haber sido consecuencia de la sobreexpresión proteica cardíaca de la subunidad  $\alpha 1C$  del  $Ca_v1.2$  y del NCX1 observadas en el grupo ALDO respecto al grupo CONTROL. Estudios previos han demostrado que la HC cursa con un aumento del contenido de calcio cardíaco que tiene como consecuencia la sobreactivación de proteínas sensibles al calcio implicadas en el acoplamiento EC y ET que agravan aún más la hipertrofia y promueven la transición hacia la IC (Anderson *et al.*, 2011; Cipolletta *et al.*, 2015; Couchonnal y Anderson, 2008). Entre dichas proteínas sensibles al calcio destaca la CaMKII, cuya sobreactivación ha sido estrechamente relacionada con el desarrollo de la HC y las alteraciones cardíacas asociadas (Anderson *et al.*, 2011; Maier, 2005). Uno de los mecanismos más frecuentes a través de los cuales aumenta la actividad de la CaMKII es mediante la auto-fosforilación dependiente de calcio de la treonina 286 (pCaMKII) (Anderson *et al.*, 2011; Erickson, 2014). En nuestro estudio, el aumento del contenido de calcio cardíaco estuvo acompañado del incremento de los niveles de auto-fosforilación de la CaMKII así como de la relación pCaMKII/CaMKII en el grupo ALDO respecto al grupo CONTROL. Nuestros

resultados sugieren que el aumento de la cantidad de calcio cardíaco inducido por la aldosterona pudo sobreactivar a la CaMKII por auto-fosforilación.

Otro de los mecanismos mediante el cual la CaMKII es sobreactivada es a través de la oxidación de los dominios reguladores (Erickson *et al.*, 2008; Luczak y Anderson, 2014). En nuestro estudio, el grado de oxidación en las metioninas 280 y 281 del dominio regulador (oxCaMKII) y la relación oxCaMKII/CaMKII aumentaron en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. Estudios previos realizados en ratones modelo de IAM han demostrado que la aldosterona induce la sobreactivación de la CaMKII cardíaca por oxidación de las metioninas 281 y 282 debido a la sobreexpresión de la NADPHox y el consecuente aumento en la producción de ROS (He *et al.*, 2011). Otros estudios han señalado que la auto-fosforilación de la treonina 286 y la oxidación de las metioninas 281 y 282 son procesos estrechamente relacionados, ya que se ha observado un aumento en la auto-fosforilación cuando hay un exceso de ROS intracelular (Erickson *et al.*, 2008). Por tanto, el posible aumento en la producción de ROS sugerido por la sobreexpresión de la subunidad p22phox de la NADPHox y la iNOS observadas en el grupo ALDO, explicaría el incremento en la oxidación de la CaMKII observado en dicho grupo.

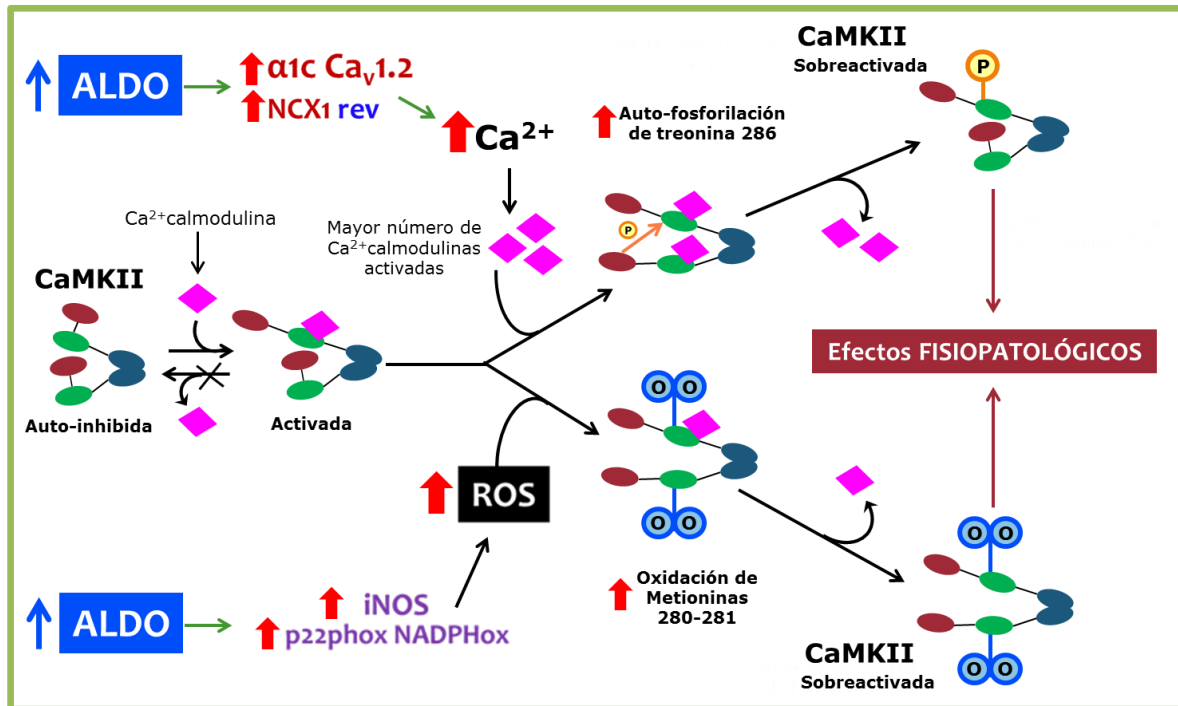
La posible sobreactivación de la CaMKII cardíaca inducida por la administración de aldosterona podría haber contribuido al desajuste iónico sugerido por los cambios en la expresión proteica cardíaca de los transportadores iónicos valorados y a la HC y la disfunción diastólica observadas en el grupo ALDO. Se ha demostrado que la sobreactivación de la CaMKII induce el aumento en la actividad del canal de sodio

Na<sub>v</sub>1.5, del canal de calcio Ca<sub>v</sub>1.2 y de los receptores de rianodina, lo que altera el acoplamiento EC y promueve la disfunción diastólica, las arritmias y la IC (Anderson *et al.*, 2011; Bers, 2011; Bers y Morotti, 2014; Maier, 2005). Así mismo, la sobreactivación de la CaMKII ha demostrado inducir el acoplamiento ET activando factores de transcripción implicados en el remodelado cardíaco y el desarrollo de HC (Bers, 2011). Por ejemplo, se ha observado que la CaMKII aumenta la actividad de factores de transcripción pro-hipertróficos como el factor estimulante de miocitos tipo 2 (MEF2) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT), que activan genes como la creatina quinasa,  $\alpha$ -actina, troponina T y C, algunas MMPs o el NCX1, entre muchos otros (Akazawa y Komuro, 2003). En concreto, se ha demostrado que la oxidación de la CaMKII estimulada por la aldosterona en ratones induce el acoplamiento ET mediante la activación del factor de transcripción MEF2 y el aumento de la expresión génica de MMPs, lo que promueve la fibrosis y el remodelado cardíaco (He *et al.*, 2011).

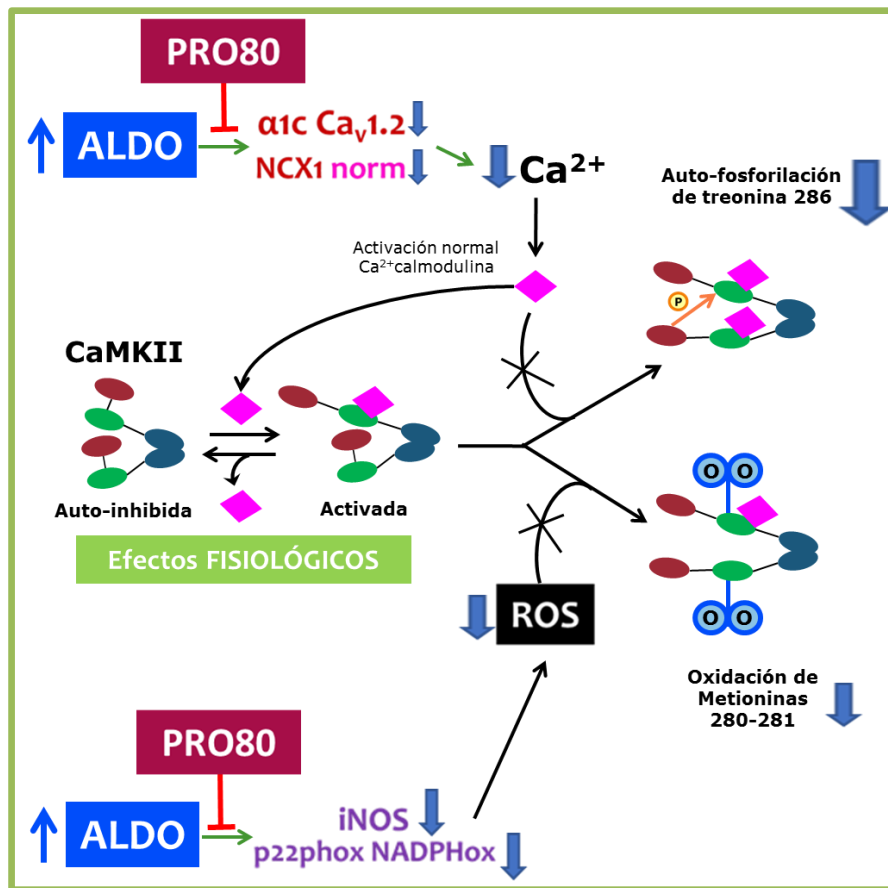
Así mismo, nuestros resultados muestran por primera vez que las proantocianidinas tienen la capacidad de reducir la auto-fosforilación de la CaMKII cardíaca inducida por la aldosterona. En el grupo ALDO+PRO80, el tratamiento con proantocianidinas logró reducir significativamente los niveles cardíacos de pCaMKII y pCaMKII/CaMKII. La menor cantidad de calcio intracelular cardíaco observada en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO, podría haber reducido el número de calcio-calmodulinas activadas y unidas a las CaMKII, lo que explicaría la disminución en la auto-fosforilación observada en el grupo ALDO+PRO80. Por el contrario, los niveles de oxCaMKII y oxCaMKII/CaMKII, aunque mostraron una tendencia a la baja, no disminuyeron significativamente en el grupo ALDO+PRO80 respecto al grupo ALDO. En

conjunto, la disminución en la auto-fosforilación y la tendencia a la baja en la oxidación de la CaMKII observadas en el grupo ALDO+PRO80 comparado con el grupo ALDO sugieren que las proantocianidinas podrían prevenir, al menos en parte, la sobreactivación de la CaMKII. Este efecto estaría contribuyendo a la mejora en las alteraciones estructurales y funcionales observadas en las ratas del grupo ALDO+PRO80. Numerosos estudios han demostrado que la inhibición de la expresión y/o la actividad de la CaMKII cardíaca protege frente al desarrollo de la HC y de la IC (Anderson *et al.*, 2011; Banyasz *et al.*, 2011; Cipolletta *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2005). Ciertos polifenoles han mostrado la capacidad de reducir la sobreactivación de la CaMKII por auto-fosforilación y oxidación, reduciendo el grado de HC y las alteraciones cardíacas asociadas. Un estudio reciente llevado a cabo en ratas con HC inducida por constricción de la aorta abdominal, ha demostrado que el uso de baicaleína, un polifenol de la familia de los flavonoides, redujo los niveles de pCaMKII, lo que mejoró el grado de fibrosis miocárdica (Zhao *et al.*, 2016). Otro estudio realizado en el mismo modelo animal de HC que el anterior, demostró que el uso de resveratrol, un polifenol de la familia de los estilbenos, previno la sobreactivación de la CaMKII por auto-fosforilación, lo que fue asociado con una menor fibrosis cardíaca, la disminución del grado de hipertrofia y la mejora en la función cardíaca (Dong *et al.*, 2014). Así mismo, en ratones a los que se les administró AII, el uso de kaempferol, un tipo de flavonoide, redujo el grado de oxidación de la CaMKII cardíaca y previno la disfunción auricular (An y Kim, 2015).

En las siguientes figuras se muestran dos esquemas que representan la sobreactivación de la CaMKII por la aldosterona (figura 51) y como PRO80 podría estar inhibiendo los efectos de la aldosterona (figura 52).



**Figura 51.** Sobreactivación de la CaMKII por la aldosterona mediante auto-fosforilación y oxidación. La administración de aldosterona aumenta la expresión proteica cardíaca de transportadores de calcio ( $Ca_v1.2$  y  $NCX1$ ), lo que contribuye a incrementar los niveles de calcio cardíaco. Como consecuencia habría un mayor número de calcio-calmodulinas activadas y unidas a los dominios reguladores de la CaMKII, lo que resultaría en la auto-fosforilación y sobreactivación de la CaMKII. Así mismo, la aldosterona aumentaría el nivel de ROS cardíaco a través del incremento de la expresión de la iNOS y de p22phox, lo que induciría la oxidación de los dominios reguladores de la CaMKII y su sobreactivación. La mayor auto-fosforilación y oxidación de CaMKII promovería los efectos fisiopatológicos asociados a su sobreactivación. CaMKII: quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2; dominios de la CaMKII: rojo, dominio catalítico; verde, dominio regulador; gris, dominio de asociación. ALDO, aldosterona;  $\alpha 1C$   $Ca_v1.2$ , subunidad  $\alpha 1C$  del canal de calcio dependiente de voltaje tipo L;  $NCX1$  rev, modo de acción reverso del intercambiador de sodio-calcio tipo 1; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; p22phox NADPHox, subunidad p22phox de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; ROS, especies reactivas de oxígeno; P, fosforilación en treonina 286; O, oxidación en metioninas 280-281.



**Figura 52.** Posibles efectos inhibitorios de PRO80 sobre la auto-fosforilación y oxidación de la CaMKII mediadas por la aldosterona. PRO80 bloquearía los efectos de la aldosterona disminuyendo los niveles de expresión de transportadores de calcio ( $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{NCX1}$ ). Como consecuencia los niveles de calcio cardíaco se reducirían y el número de calcio-calmodulinas activadas se normalizaría, lo que estaría relacionado con una menor auto-fosforilación de la CaMKII. Así mismo, PRO80 bloquearía las acciones de la aldosterona disminuyendo la expresión de proteínas pro-oxidantes (iNOS y p22phox) lo que reduciría la producción de ROS y en consecuencia la oxidación de la CaMKII. Una menor auto-fosforilación y oxidación de CaMKII promovería los efectos fisiológicos de la misma. CaMKII: quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2; dominios de la CaMKII: rojo, dominio catalítico; verde, dominio regulador; gris, dominio de asociación. ALDO, aldosterona; PRO80, extracto con un 80% de proantocianidinas;  $\alpha1C \text{ Ca}_v1.2$ , subunidad  $\alpha1C$  del canal de calcio dependiente de voltaje tipo L;  $\text{NCX1 norm}$ , modo de acción normal del intercambiador de sodio-calcio tipo 1; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; p22phox NADPHox, subunidad p22phox de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; ROS, especies reactivas de oxígeno; P, fosforilación en treonina 286; O, oxidación en metioninas 280-281.





# VIII

## Resumen de los resultados

---







1. La administración de aldosterona produce hipertensión arterial, disfunción diastólica, hipertrofia cardíaca y aumento de la cantidad de colágeno. Además, aumenta la expresión proteica de mediadores oxidativos (p22phox), inflamatorios (CD68, TNF $\alpha$  e iNOS) y pro-fibróticos (CTGF) en el corazón de las ratas.
2. El tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas (PRO80) previene las alteraciones mencionadas inducidas por la administración de aldosterona en ratas.
3. La administración de aldosterona estimula la expresión proteica del SGK1 en el corazón de las ratas y en células cardíacas H9c2.
4. El aumento de la expresión proteica cardíaca del SGK1 es prevenido por el tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas (PRO80), en ratas a las que se les administró aldosterona, y mediante co-incubación con espironolactona y proantocianidinas, en células H9c2 estimuladas con aldosterona.
5. La administración de aldosterona en ratas aumenta la expresión proteica cardíaca de la subunidad  $\gamma$  del ENaC y el grado de fosforilación de Nedd4-2.
6. El tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas (PRO80) en ratas a las que se les administró aldosterona previene los cambios mencionados sobre la subunidad  $\gamma$  del ENaC y del Nedd4-2.
7. La administración de aldosterona en ratas aumenta la expresión proteica cardíaca de los transportadores iónicos ROMK, NHE1, Ca $_v$ 1.2 y NCX1 y disminuye la de la Na $^+$ /K $^+$  ATPasa. Además, induce la fosforilación y oxidación de la CaMKII y aumenta el contenido de calcio cardíaco.

8. El tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas (PRO80) en ratas a las que se les administró aldosterona previene los cambios en la expresión proteica cardíaca de los transportadores iónicos mencionados, disminuye la fosforilación de la CaMKII y reduce el contenido de calcio cardíaco.
9. La estimulación de células H9c2 con aldosterona disminuye la supervivencia celular y aumenta la producción de anión superóxido y la expresión proteica de p22phox. Dichos efectos son prevenidos mediante co-incubación con proantocianidinas y espironolactona.





VIII

**Conclusiones**

---







1. El tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas (PRO80) disminuye la expresión proteica del SGK1 en el corazón de ratas a las que se les administró aldosterona. Así mismo, en células H9c2 estimuladas con aldosterona, las proantocianidinas y la espironolactona, disminuyeron la expresión del SGK1, indicando que las proantocianidinas actuarían a través del bloqueo del RM.
2. El extracto rico en proantocianidinas (PRO80) previene los cambios inducidos por la aldosterona sobre la expresión de los mediadores implicados en el transporte iónico en el corazón de ratas. Estos efectos contribuirían a disminuir las alteraciones funcionales, estructurales y moleculares (oxidación, inflamación y fibrosis) producidas por la aldosterona.
3. Las proantocianidinas, además de sus demostrados efectos antioxidantes y antiinflamatorios, podrían ser una alternativa terapéutica a los antagonistas clásicos del RM en la prevención y tratamiento de patologías cardíacas relacionadas con niveles elevados de aldosterona.







**IX**

## **Bibliografía**

---







- Abete, P., and Vassalle, M. (1988). Relation between Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump, Na<sup>+</sup> activity and force in strophanthidin inotropy in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 404, 275-299.
- Ahmad, A., Singhal, U., Hossain, M.M., Islam, N., and Rizvi, I. (2013). The role of the endogenous antioxidant enzymes and malondialdehyde in essential hypertension. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 7, 987-990.
- Akazawa, H., and Komuro, I. (2003). Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92, 1079-1088.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences* 75, 639-653.
- Albesa, M., Grilo, L.S., Gavillet, B., and Abriel, H. (2011). Nedd4-2-dependent ubiquitylation and regulation of the cardiac potassium channel hERG1. *J Mol Cell Cardiol* 51, 90-98.
- Alvarez de la Rosa, D., Gimenez, I., Forbush, B., and Canessa, C.M. (2006). SGK1 activates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in amphibian renal epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology* 290, C492-498.
- Alvarez, E., Rodino-Janeiro, B.K., Jerez, M., Uceda-Somoza, R., Nunez, M.J., and Gonzalez-Juanatey, J.R. (2012). Procyanidins from grape pomace are suitable inhibitors of human endothelial NADPH oxidase. *Journal of cellular biochemistry* 113, 1386-1396.
- Allen, D.G., and Xiao, X.H. (2003). Role of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovascular research* 57, 934-941.
- An, M., and Kim, M. (2015). Protective effects of kaempferol against cardiac sinus node dysfunction via CaMKII deoxidization. *Anatomy & cell biology* 48, 235-243.

- Anderson, M.E., Braun, A.P., Schulman, H., and Premack, B.A. (1994). Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca<sup>2+</sup>-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 75, 854-861.
- Anderson, M.E., Brown, J.H., and Bers, D.M. (2011). CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51, 468-473.
- Anumonwo, J.M., and Lopatin, A.N. (2010). Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 48, 45-54.
- Anversa, P., Ricci, R., and Olivetti, G. (1986). Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *Journal of the American College of Cardiology* 7, 1140-1149.
- Aoyagi, T., and Matsui, T. (2011). The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury. *Journal of cell science & therapy* 2012, 003.
- Ashton, A.W., Le, T.Y., Gomez-Sanchez, C.E., Morel-Kopp, M.C., McWhinney, B., Hudson, A., and Mihailidou, A.S. (2015). Role of Nongenomic Signaling Pathways Activated by Aldosterone During Cardiac Reperfusion Injury. *Mol Endocrinol* 29, 1144-1155.
- Asp, M.L., Martindale, J.J., Heinis, F.I., Wang, W., and Metzger, J.M. (2013). Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 895-900.
- Auguste, G., Ruiz Hurtado, G., Thaboulet, G., Viengchareun, S., Gomez, A., Morel, E., Lombès, M., and Benitah, J. (2014). Molecular mechanism involved in MR upregulation of the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. In IX<sup>ème</sup> Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, pp. PM2-107.

- Azibani, F., Benard, L., Schlossarek, S., Merval, R., Tournoux, F., Fazal, L., Polidano, E., Launay, J.M., Carrier, L., Chatziantoniou, C., *et al.* (2012). Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart. *Hypertension* *59*, 1179-1187.
- Baartscheer, A., Schumacher, C.A., van Borren, M.M., Belterman, C.N., Coronel, R., Opthof, T., and Fiolet, J.W. (2005). Chronic inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovascular research* *65*, 83-92.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., and Pruess, H.G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* *148*, 187-197.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Ray, S.D., Das, D.K., Bagchi, M., Preuss, H.G., and Vinson, J.A. (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation research* *523-524*, 87-97.
- Banyasz, T., Szentandrassy, N., Toth, A., Nanasi, P.P., Magyar, J., and Chen-Izu, Y. (2011). Cardiac calmodulin kinase: a potential target for drug design. *Current medicinal chemistry* *18*, 3707-3713.
- Bassett, M.H., White, P.C., and Rainey, W.E. (2004). The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* *217*, 67-74.
- Basu, A., Rhone, M., and Lyons, T.J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews* *68*, 168-177.
- Bayorh, M.A., Rollins-Hairston, A., Adiyiah, J., Lyn, D., and Eatman, D. (2011). Eplerenone suppresses aldosterone/ salt-induced expression of NOX-4. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* *12*, 195-201.

- Beckman, J.S., and Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424-1437.
- Beecher, G.R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of nutrition* 133, 3248s-3254s.
- Beesley, A.H., Hornby, D., and White, S.J. (1998). Regulation of distal nephron K(+) channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney. *The Journal of Physiology* 509, 629-634.
- Bénitah, J.-P., Perrier, E., Gómez, A.M., and Vassort, G. (2001). Effects of aldosterone on transient outward K(+) current density in rat ventricular myocytes. *The Journal of Physiology* 537, 151-160.
- Benitah, J.P., and Vassort, G. (1999). Aldosterone upregulates Ca(2+) current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res* 85, 1139-1145.
- Bers, D. (2001). Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.
- Bers, D.M. (2011). CaMKII Regulation of Cardiac Excitation-Transcription Coupling. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 8, 1101-1104.
- Bers, D.M., Barry, W.H., and Despa, S. (2003). Intracellular Na<sup>+</sup> regulation in cardiac myocytes. *Cardiovascular research* 57, 897-912.
- Bers, D.M., and Despa, S. (2009). Na/K-ATPase – an integral player in the adrenergic fight-or-flight response. *Trends in cardiovascular medicine* 19, 111-118.
- Bers, D.M., and Morotti, S. (2014). Ca(2+) current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Frontiers in pharmacology* 5, 144.
- Bhandari, S. (2012). Aldosterone blockade: the heart versus the kidney. *Kidney Int* 82, 1136; author reply 1136-1137.

- Bhargava, A., Fullerton, M.J., Myles, K., Purdy, T.M., Funder, J.W., Pearce, D., and Cole, T.J. (2001). The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* *142*, 1587-1594.
- Bhattacharyya, N., Ramsammy, R., Eatman, E., Hollis, V.W., and Anderson, W.A. (1994). Protooncogene, growth factor, growth factor receptor, and estrogen and progesterone receptor gene expression in the immature rat uterus after treatment with estrogen and tamoxifen. *Journal of submicroscopic cytology and pathology* *26*, 147-162.
- Biennu, L.A., Reichelt, M.E., Morgan, J., Fletcher, E.K., Bell, J.R., Rickard, A.J., Delbridge, L.M., and Young, M.J. (2015). Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor Activation Impairs Acute Cardiac Functional Recovery After Ischemic Insult. *Hypertension* *66*, 970-977.
- Binart, N., Lombes, M., and Baulieu, E.E. (1995). Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants. *Biochem J* *311 ( Pt 3)*, 797-804.
- Birt, D.F., and Jeffery, E. (2013). Flavonoids. *Advances in Nutrition* *4*, 576-577.
- Birukov, K.G. (2009). Cyclic Stretch, Reactive Oxygen Species, and Vascular Remodeling. *Antioxidants & Redox Signaling* *11*, 1651-1667.
- Blade, C., Arola, L., and Salvado, M.J. (2010). Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Molecular nutrition & food research* *54*, 37-59.
- Bolten, C.W., and Heron, M.I. (2006). Early cardiac mineralocorticoid receptor-regulated genes: identifying the not so usual suspects. *Endocrinology* *147*, 3181-3182.

- Bollag, W.B. (2014). Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Comprehensive Physiology* 4, 1017-1055.
- Borlaug, B.A., and Kass, D.A. (2006). Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure. *Trends in cardiovascular medicine* 16, 273-279.
- Boyd, C., and Naray-Fejes-Toth, A. (2005). Gene regulation of ENaC subunits by serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F505-512.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brem, A.S., Morris, D.J., and Gong, R. (2011). Aldosterone-induced fibrosis in the kidney: questions and controversies. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 58, 471-479.
- Brewster, U.C., and Perazella, M.A. (2004). The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *The American journal of medicine* 116, 263-272.
- Briet, M., and Schiffrin, E.L. (2013). Vascular actions of aldosterone. *Journal of vascular research* 50, 89-99.
- Brilla, C.G., Matsubara, L.S., and Weber, K.T. (1993). Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 25, 563-575.
- Brilla, C.G., Pick, R., Tan, L.B., Janicki, J.S., and Weber, K.T. (1990). Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 67, 1355-1364.

- Brouard, M., Casado, M., Djelidi, S., Barrandon, Y., and Farman, N. (1999). Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. *Journal of cell science* *112 (Pt 19)*, 3343-3352.
- Brown, N.J. (2013). Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* *9*, 459-469.
- Brown, R.G. (1993). Disorders of water and sodium balance. *Postgraduate medicine* *93*, 227-228, 231-224, 239-240 *passim*.
- Bruner, K.L., Derfoul, A., Robertson, N.M., Guerriero, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., and Litwack, G. (1997). The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct* *7*, 85-98.
- Bubien, J.K. (2010). Epithelial Na<sup>(+)</sup> Channel (ENaC), Hormones, and Hypertension. *The Journal of Biological Chemistry* *285*, 23527-23531.
- Burckhardt, G., Di Sole, F., and Helmle-Kolb, C. (2002). The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family. *Journal of nephrology* *15 Suppl 5*, S3-21.
- Buset Rios, N., Rodriguez Esparragon, F., Fernandez-Andrade Rodriguez, C., and Rodriguez Perez, J.C. (2011). Vascular and metabolic properties of manidipine. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* *31*, 268-274.
- Calderone, A., Takahashi, N., Izzo, N.J., Jr., Thaik, C.M., and Colucci, W.S. (1995). Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* *92*, 2385-2390.

- Cannavo, A., Liccardo, D., Eguchi, A., Elliott, K.J., Traynham, C.J., Ibeti, J., Eguchi, S., Leosco, D., Ferrara, N., Rengo, G., *et al.* (2016). Myocardial pathology induced by aldosterone is dependent on non-canonical activities of G protein-coupled receptor kinases. *Nature communications* 7, 10877.
- Capuano, V., Ruchon, Y., Antoine, S., Sant, M.C., and Renaud, J.F. (2002). Ventricular hypertrophy induced by mineralocorticoid treatment or aortic stenosis differentially regulates the expression of cardiac K<sup>+</sup> channels in the rat. *Molecular and cellular biochemistry* 237, 1-10.
- Carreno, J.E., Apablaza, F., Ocaranza, M.P., and Jalil, J.E. (2006). Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Revista española de cardiología* 59, 473-486.
- Cascales, M. (2001). Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad.
- Cassidy, A., O'Reilly, E.J., Kay, C., Sampson, L., Franz, M., Forman, J.P., Curhan, G., and Rimm, E.B. (2011). Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *The American journal of clinical nutrition* 93, 338-347.
- Castro, M.M., and Tanus-Santos, J.E. (2013). Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Current drug targets* 14, 335-343.
- Catena, C., Colussi, G., Brosolo, G., Novello, M., and Sechi, L.A. (2015). Aldosterone and Left Ventricular Remodeling. *Horm Metab Res*.
- Catena, C., Colussi, G., Nait, F., Martinis, F., Pezzutto, F., and Sechi, L.A. (2014). Aldosterone and the heart: still an unresolved issue? *Frontiers in endocrinology* 5, 168.

- Cediel, E., Sanz-Rosa, D., Oubina, M.P., de las Heras, N., Gonzalez Pacheco, F.R., Vegazo, O., Jimenez, J., Cachofeiro, V., and Lahera, V. (2003). Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *285*, R674-681.
- Ciampolillo, F., McCoy, D.E., Green, R.B., Karlson, K.H., Dagenais, A., Molday, R.S., and Stanton, B.A. (1996). Cell-specific expression of amiloride-sensitive, Na(+)-conducting ion channels in the kidney. *Am J Physiol* *271*, C1303-1315.
- Cingolani, H.E., and Ennis, I.L. (2007). Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy. *Circulation* *115*, 1090-1100.
- Cipolletta, E., Rusciano, M.R., Maione, A.S., Santulli, G., Sorriento, D., Del Giudice, C., Ciccarelli, M., Franco, A., Crola, C., Campiglia, P., *et al* (2015). Targeting the CaMKII/ERK Interaction in the Heart Prevents Cardiac Hypertrophy. *PLoS One* *10*, e0130477.
- Cleland, J.G., Torabi, A., and Khan, N.K. (2005). Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart (British Cardiac Society)* *91 Suppl 2*, ii7-13; discussion ii31, ii43-18.
- Cohn, J.N., and Colucci, W. (2006). Cardiovascular effects of aldosterone and post-acute myocardial infarction pathophysiology. *The American journal of cardiology* *97*, 4f-12f.
- Cohn, J.N., Ferrari, R., and Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* *35*, 569-582.

- Colombo, P.C., Ganda, A., Lin, J., Onat, D., Harxhi, A., Iyasere, J.E., Uriel, N., and Cotter, G. (2012). Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. *Heart failure reviews* 17, 10.1007/s10741-10011-19261-10743.
- Cooper, G. (2002). *The cell, A Molecular Approach*, 2nd edition edn (Boston University: Sunderland (MA): Sinauer Associates).
- Coppini, R., Ferrantini, C., Mazzoni, L., Sartiani, L., Olivotto, I., Poggesi, C., Cerbai, E., and Mugelli, A. (2013). Regulation of intracellular Na(+) in health and disease: pathophysiological mechanisms and implications for treatment. *Global cardiology science & practice* 2013, 222-242.
- Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D.V., and Vlietinck, A.J. (2004). Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current medicinal chemistry* 11, 1345-1359.
- Couchonnal, L.F., and Anderson, M.E. (2008). The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda, Md)* 23, 151-159.
- Chahine, M., Bkaily, G., Nader, M., Al-Khoury, J., Jacques, D., Beier, N., and Scholz, W. (2005). NHE-1-dependent intracellular sodium overload in hypertrophic hereditary cardiomyopathy: prevention by NHE-1 inhibitor. *J Mol Cell Cardiol* 38, 571-582.
- Chandran, S., Li, H., Dong, W., Krasinska, K., Adams, C., Alexandrova, L., Chien, A., Hallows, K.R., and Bhalla, V. (2011). Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 4-2 (Nedd4-2) regulation by 14-3-3 protein binding at canonical serum and glucocorticoid kinase 1 (SGK1) phosphorylation sites. *J Biol Chem* 286, 37830-37840.

- Chen, C., Liang, W., Jia, J., van Goor, H., Singhal, P.C., and Ding, G. (2009). Aldosterone induces apoptosis in rat podocytes: role of PI3-K/Akt and p38MAPK signaling pathways. *Nephron Experimental nephrology* *113*, e26-34.
- Chen, M.M., Lam, A., Abraham, J.A., Schreiner, G.F., and Joly, A.H. (2000). CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* *32*, 1805-1819.
- Chiang, A.N., Wu, H.L., Yeh, H.I., Chu, C.S., Lin, H.C., and Lee, W.C. (2006). Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. *Lipids* *41*, 797-803.
- Choe, E., and Min, D.B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical reviews in food science and nutrition* *46*, 1-22.
- Chopra, S., Cherian, D., Verghese, P.P., and Jacob, J.J. (2013). Physiology and clinical significance of natriuretic hormones. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* *17*, 83-90.
- Chun, T.Y., Bloem, L.J., and Pratt, J.H. (2003). Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* *144*, 1712-1717.
- Dahan, I., Issaeva, I., Gorzalczany, Y., Sigal, N., Hirshberg, M., and Pick, E. (2002). Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J Biol Chem* *277*, 8421-8432.
- Daniels, A., van Bilsen, M., Goldschmeding, R., van der Vusse, G.J., and van Nieuwenhoven, F.A. (2009). Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta physiologica (Oxford, England)* *195*, 321-338.

- de Bakker, J.M., van Capelle, F.J., Janse, M.J., Tasseron, S., Vermeulen, J.T., de Jonge, N., and Lahpor, J.R. (1996). Fractionated electrograms in dilated cardiomyopathy: origin and relation to abnormal conduction. *Journal of the American College of Cardiology* 27, 1071-1078.
- De Giusti, V.C., Orłowski, A., Ciancio, M.C., Espejo, M.S., Gonano, L.A., Caldiz, C.I., Vila Petroff, M.G., Villa-Abrille, M.C., and Aiello, E.A. (2015). Aldosterone stimulates the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter via activation of the G protein-coupled receptor gpr30. *J Mol Cell Cardiol* 89, 260-267.
- de la Iglesia, R., Milagro, F.I., Campion, J., Boque, N., and Martinez, J.A. (2010). Healthy properties of proanthocyanidins. *BioFactors (Oxford, England)* 36, 159-168.
- Debonneville, C., Flores, S.Y., Kamynina, E., Plant, P.J., Tauxe, C., Thomas, M.A., Munster, C., Chraïbi, A., Pratt, J.H., Horisberger, J.D., *et al.* (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *The EMBO journal* 20, 7052-7059.
- Despa, S., and Bers, D.M. (2013). Na(+) transport in the normal and failing heart - remember the balance. *J Mol Cell Cardiol* 61, 2-10.
- Deswal, A., Petersen, N.J., Feldman, A.M., Young, J.B., White, B.G., and Mann, D.L. (2001). Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 103, 2055-2059.
- Dhamoon, A.S., and Jalife, J. (2005). The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2, 316-324.

- Di Gregorio, G.B., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Varma, V., Lu, T., Miles, L.M., Ranganathan, G., Peterson, C.A., McGehee, R.E., and Kern, P.A. (2005). Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* 54, 2305-2313.
- Di Lullo, L., Gorini, A., Russo, D., Santoboni, A., and Ronco, C. (2015). Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal Medicine* 5, 254-266.
- Diez, J. (2008). Effects of aldosterone on the heart: beyond systemic hemodynamics? *Hypertension* 52, 462-464.
- Diller, P.M., Smucker, D.R., David, B., and Graham, R.J. (1999). Congestive heart failure due to diastolic or systolic dysfunction. Frequency and patient characteristics in an ambulatory setting. *Archives of family medicine* 8, 414-420.
- Ding, W., Yang, L., Zhang, M., and Gu, Y. (2012). Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress contributes to aldosterone-induced apoptosis in tubular epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 418, 451-456.
- Dixon, R.E., Yuan, C., Cheng, E.P., Navedo, M.F., and Santana, L.F. (2012). Ca<sup>2+</sup> signaling amplification by oligomerization of L-type Cav1.2 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1749-1754.
- Doi, T., Doi, S., Nakashima, A., Ueno, T., Yokoyama, Y., Kohno, N., and Masaki, T. (2014). Mizoribine Ameliorates Renal Injury and Hypertension along with the Attenuation of Renal Caspase-1 Expression in Aldosterone-Salt-Treated Rats. *PLoS ONE* 9, e93513.

- Dong, Q., Wu, Z., Li, X., Yan, J., Zhao, L., Yang, C., Lu, J., Deng, J., and Chen, M. (2014). Resveratrol ameliorates cardiac dysfunction induced by pressure overload in rats via structural protection and modulation of Ca<sup>2+</sup> cycling proteins. *Journal of translational medicine* 12, 323.
- Dong, S., Tong, X., Liu, H., and Gao, Q. (2012). [Protective effects of pomegranate polyphenols on cardiac function in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 32, 924-927.
- Dooley, R., Harvey, B.J., and Thomas, W. (2012). Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. *Mol Cell Endocrinol* 350, 223-234.
- Doshi, D., and Marx, S.O. (2009). Ion channels, transporters, and pumps as targets for heart failure. *Journal of cardiovascular pharmacology* 54, 273-278.
- Dostanic, I., Schultz Jel, J., Lorenz, J.N., and Lingrel, J.B. (2004). The alpha 1 isoform of Na,K-ATPase regulates cardiac contractility and functionally interacts and co-localizes with the Na/Ca exchanger in heart. *J Biol Chem* 279, 54053-54061.
- Douiri, S., Bahdoudi, S., Hamdi, Y., Cubi, R., Basille, M., Fournier, A., Vaudry, H., Tonon, M.C., Amri, M., Vaudry, D., *et al.* (2016). Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. *Journal of neurochemistry*.

- Draijer, R., de Graaf, Y., Slettenaar, M., de Groot, E., and Wright, C.I. (2015). Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects. *Nutrients* *7*, 3138-3153.
- Du, Y., Guo, H., and Lou, H. (2007). Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *Journal of agricultural and food chemistry* *55*, 1695-1701.
- Duc, C., Farman, N., Canessa, C.M., Bonvalet, J.P., and Rossier, B.C. (1994). Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *The Journal of cell biology* *127*, 1907-1921.
- Ehrlich, J.R. (2008). Inward rectifier potassium currents as a target for atrial fibrillation therapy. *Journal of cardiovascular pharmacology* *52*, 129-135.
- Engelhardt, S., Hein, L., Keller, U., Klambt, K., and Lohse, M.J. (2002). Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res* *90*, 814-819.
- Erickson, J.R. (2014). Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Frontiers in pharmacology* *5*, 59.
- Erickson, J.R., Joiner, M.L., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., Aykin-Burns, N., *et al.* (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* *133*, 462-474.
- Erlejan, A.G., Jagers, G., Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2008). TNFalpha-induced NF-kappaB activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Archives of biochemistry and biophysics* *476*, 186-195.

- Estrada, M., Liberona, J.L., Miranda, M., and Jaimovich, E. (2000). Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 279, E132-139.
- Falkenstein, E., Christ, M., Feuring, M., and Wehling, M. (2000). Specific nongenomic actions of aldosterone. *Kidney Int* 57, 1390-1394.
- Fang, L., Li, D., and Welling, P.A. (2010). Hypertension resistance polymorphisms in ROMK (Kir1.1) alter channel function by different mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F1359-1364.
- Ferreira, N.S., Cau, S.B., Silva, M.A., Manzato, C.P., Mestriner, F.L., Matsumoto, T., Carneiro, F.S., and Tostes, R.C. (2015). Diabetes impairs the vascular effects of aldosterone mediated by G protein-coupled estrogen receptor activation. *Frontiers in pharmacology* 6, 34.
- Fink, L.N., Costford, S.R., Lee, Y.S., Jensen, T.E., Bilan, P.J., Oberbach, A., Bluher, M., Olefsky, J.M., Sams, A., and Klip, A. (2014). Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obesity (Silver Spring, Md)* 22, 747-757.
- Firestone, G.L., Giampaolo, J.R., and O'Keeffe, B.A. (2003). Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 13, 1-12.
- Flora, S.J.S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 191-206.

- Foo, L.Y., Lu, Y., Howell, A.B., and Vorsa, N. (2000). The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry* *54*, 173-181.
- Foo, R., O'Shaughnessy, K.M., and Brown, M.J. (2001). Hyperaldosteronism: recent concepts, diagnosis, and management. *Postgraduate medical journal* *77*, 639-644.
- Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2011). Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free radical biology & medicine* *51*, 813-823.
- Francis, G.S., and Tang, W.H. (2003). Pathophysiology of congestive heart failure. *Reviews in cardiovascular medicine* *4 Suppl 2*, S14-20.
- Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., and Hill, J.A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* *109*, 1580-1589.
- Frohlich, E.D. (1999). State of the Art lecture. Risk mechanisms in hypertensive heart disease. *Hypertension* *34*, 782-789.
- Fujioka, D., Kawabata, K., Saito, Y., Kobayashi, T., Nakamura, T., Kodama, Y., Takano, H., Obata, J.E., Kitta, Y., Umetani, K., *et al.* (2006). Role of adiponectin receptors in endothelin-induced cellular hypertrophy in cultured cardiomyocytes and their expression in infarcted heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* *290*, H2409-2416.
- Fuller, P.J. (2015). Novel interactions of the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* *408*, 33-37.
- Fuller, P.J., and Young, M.J. (2005). Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* *46*, 1227-1235.

- Funakoshi, H., Kubota, T., Machida, Y., Kawamura, N., Feldman, A.M., Tsutsui, H., Shimokawa, H., and Takeshita, A. (2002). Involvement of inducible nitric oxide synthase in cardiac dysfunction with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* *282*, H2159-2166.
- Funder, J. (2001). Mineralocorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* *28*, 1002-1006.
- Funder, J.W. (2009). Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor. *Hypertension* *53*, 286-290.
- Funder, J.W. (2010). Minireview: Aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology* *151*, 5098-5102.
- Galigniana, M.D., Echeverria, P.C., Erlejman, A.G., and Pivien-Pilipuk, G. (2010). Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus (Austin, Tex)* *1*, 299-308.
- Galkina, E., and Ley, K. (2009). Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annual review of immunology* *27*, 165-197.
- Garcia, M.L., and Kaczorowski, G.J. (2014). Targeting the inward-rectifier potassium channel ROMK in cardiovascular disease. *Current opinion in pharmacology* *15*, 1-6.
- Garty, H. (2000). Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by aldosterone: open questions and emerging answers. *Kidney Int* *57*, 1270-1276.
- Gekle, M., Bretschneider, M., Meinel, S., Ruhs, S., and Grossmann, C. (2014). Rapid mineralocorticoid receptor trafficking. *Steroids* *81*, 103-108.

- Giladi, M., Tal, I., and Khananshvili, D. (2016). Structural Features of Ion Transport and Allosteric Regulation in Sodium-Calcium Exchanger (NCX) Proteins. *Frontiers in physiology* 7, 30.
- Gilbert, K.C., and Brown, N.J. (2010). Aldosterone and Inflammation. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 17, 199-204.
- Gilmore, T.D., and Herscovitch, M. (2006). Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25, 6887-6899.
- Goel, P., Manning, J.A., and Kumar, S. (2015). NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene* 557, 1-10.
- Gonzalez-Cadavid, N.F., and Rajfer, J. (2005). The pleiotropic effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS) on the physiology and pathology of penile erection. *Current pharmaceutical design* 11, 4041-4046.
- Good, D.W. (2007). Nongenomic actions of aldosterone on the renal tubule. *Hypertension* 49, 728-739.
- Gradman, A.H., and Alfayoumi, F. (2006). From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis* 48, 326-341.
- Grant, A.O. (2009). Cardiac ion channels. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2, 185-194.
- Grieger, F., and Wolter, F. (1971). Importance of cuff-width in indirect blood pressure determination in the rat's tail. *Acta Biol Med Ger* 26, 637-641.
- Gros, R., Ding, Q., Sklar, L.A., Prossnitz, E.E., Arterburn, J.B., Chorazyczewski, J., and Feldman, R.D. (2011). GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension* 57, 442-451.

- Grossman, W., and Paulus, W.J. (2013). Myocardial stress and hypertrophy: a complex interface between biophysics and cardiac remodeling. *J Clin Invest* 123, 3701-3703.
- Grossmann, C., Benesic, A., Krug, A.W., Freudinger, R., Mildenerger, S., Gassner, B., and Gekle, M. (2005). Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* 19, 1697-1710.
- Group, T.C.T.S. (1987). Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *The New England journal of medicine* 316, 1429-1435.
- Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., and Prior, R.L. (2003). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 7513-7521.
- Habauzit, V., and Morand, C. (2012). Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 3, 87-106.
- Han, Y., Chen, J.D., Liu, Z.M., Zhou, Y., Xia, J.H., Du, X.L., and Jin, M.W. (2010). Functional ion channels in mouse cardiac c-kit(+) cells. *American journal of physiology Cell physiology* 298, C1109-1117.
- Hasenfuss, G., Reinecke, H., Studer, R., Meyer, M., Pieske, B., Holtz, J., Holubarsch, C., Posival, H., Just, H., and Drexler, H. (1994). Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75, 434-442.

- Hassan-Ali, S., and Witzgall, H. (1979). Aldosterone 18-glucuronide excretion determined with and without chromatography in human hypertensives. *Klinische Wochenschrift* *57*, 1133-1135.
- Hattori, T., Makiyama, T., Akao, M., Ehara, E., Ohno, S., Iguchi, M., Nishio, Y., Sasaki, K., Itoh, H., Yokode, M., *et al.* (2012). A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovascular research* *93*, 666-673.
- Hayashi, H., Kobara, M., Abe, M., Tanaka, N., Gouda, E., Toba, H., Yamada, H., Tatsumi, T., Nakata, T., and Matsubara, H. (2008). Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* *31*, 363-375.
- He, B.J., Joiner, M.L., Singh, M.V., Luczak, E.D., Swaminathan, P.D., Koval, O.M., Kutschke, W., Allamargot, C., Yang, J., Guan, X., *et al.* (2011). Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone. *Nature medicine* *17*, 1610-1618.
- He, J., Cai, Y., Luo, L.M., and Wang, R. (2015). Expression of Wnt and NCX1 and its correlation with cardiomyocyte apoptosis in mouse with myocardial hypertrophy. *Asian Pacific journal of tropical medicine* *8*, 930-936.
- Hegyvary, C. (1977). Effect of aldosterone and methylprednisolone on cardiac NaK-ATPase. *Experientia* *33*, 1280-1281.
- Hermidorff, M.M., Faria Gde, O., Amancio Gde, C., de Assis, L.V., and Isoldi, M.C. (2015). Non-genomic effects of spironolactone and eplerenone in cardiomyocytes of neonatal Wistar rats: do they evoke cardioprotective pathways? *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* *93*, 83-93.

- Heymes, C., Garnier, A., Fuchs, S., Bendall, J.K., Nehme, J., Ambroisine, M.L., Robidel, E., Swynghedauw, B., Milliez, P., and Delcayre, C. (2004). Aldosterone-synthase overexpression in heart: a tool to explore aldosterone's effects. *Mol Cell Endocrinol* 217, 213-219.
- Hilgemann, D.W., Yaradanakul, A., Wang, Y., and Fuster, D. (2006). Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 17 Suppl 1, S47-s56.
- Hoagland, K.M., Flasch, A.K., Dahly-Vernon, A.J., dos Santos, E.A., Knepper, M.A., and Roman, R.J. (2004). Elevated BSC-1 and ROMK expression in Dahl salt-sensitive rat kidneys. *Hypertension* 43, 860-865.
- Hobai, I.A., Maack, C., and O'Rourke, B. (2004). Partial inhibition of sodium/calcium exchange restores cellular calcium handling in canine heart failure. *Circ Res* 95, 292-299.
- Hobai, I.A., and O'Rourke, B. (2001). Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation* 103, 1577-1584.
- Hobbs, F.D., Kenkre, J.E., Roalfe, A.K., Davis, R.C., Hare, R., and Davies, M.K. (2002). Impact of heart failure and left ventricular systolic dysfunction on quality of life: a cross-sectional study comparing common chronic cardiac and medical disorders and a representative adult population. *Eur Heart J* 23, 1867-1876.
- Hohensinner, P.J., Kaun, C., Rychli, K., Niessner, A., Pfaffenberger, S., Rega, G., de Martin, R., Maurer, G., Ullrich, R., Huber, K., *et al.* (2007). Macrophage colony stimulating factor expression in human cardiac cells is upregulated by tumor necrosis factor-alpha via an NF-kappaB dependent mechanism. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 5, 2520-2528.

- Holmer, S.R., and Schunkert, H. (1996). Adaptive and genetic alterations of the renin angiotensin system in cardiac hypertrophy and failure. *Basic research in cardiology 91 Suppl 2*, 65-71.
- Honsho, S., Nishikawa, S., Amano, K., Zen, K., Adachi, Y., Kishita, E., Matsui, A., Katsume, A., Yamaguchi, S., Nishikawa, K., *et al.* (2009). Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways. *Circ Res 105*, 1149-1158.
- Hori, M., and Yamaguchi, O. (2013). Is tumor necrosis factor-alpha friend or foe for chronic heart failure? *Circ Res 113*, 492-494.
- Horky, K. (2011). [Aldosterone as an endogenous cardiovascular toxin and the options for its therapeutic management]. *Vnitřní lékařství 57*, 1012-1016.
- Horn, M.A., and Trafford, A.W. (2015). Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *J Mol Cell Cardiol.*
- Horstkotte, D., Schulte, H.D., Niehues, R., Klein, R.M., Piper, C., and Strauer, B.E. (1993). Diagnostic and therapeutic considerations in acute, severe mitral regurgitation: experience in 42 consecutive patients entering the intensive care unit with pulmonary edema. *The Journal of heart valve disease 2*, 512-522.
- Hotta, H., Nagano, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, J., and Osakai, T. (2002). Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochimica et biophysica acta 1572*, 123-132.
- Hu, H., Chiamvimonvat, N., Yamagishi, T., and Marban, E. (1997). Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ Res 81*, 742-752.

- Huang, L.L., Pan, C., Wang, L., Ding, L., Guo, K., Wang, H.Z., Xu, A.M., and Gao, S. (2015). Protective effects of grape seed proanthocyanidins on cardiovascular remodeling in DOCA-salt hypertension rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 26, 841-849.
- Hugel, H.M., Jackson, N., May, B., Zhang, A.L., and Xue, C.C. (2016). Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 23, 220-231.
- Hummer, W., and Schreier, P. (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular nutrition & food research* 52, 1381-1398.
- Hunt, S.A. (2005). ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *Journal of the American College of Cardiology* 46, e1-82.
- Ichimura, T., Yamamura, H., Sasamoto, K., Tominaga, Y., Taoka, M., Kakiuchi, K., Shinkawa, T., Takahashi, N., Shimada, S., and Isobe, T. (2005). 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na<sup>+</sup> channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 280, 13187-13194.
- Ikeda, U., Hyman, R., Smith, T.W., and Medford, R.M. (1991). Aldosterone-mediated regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J Biol Chem* 266, 12058-12066.
- Ingwall, J.S. (1995). How high does intracellular sodium rise during acute myocardial ischaemia? A view from NMR spectroscopy. *Cardiovascular research* 29, 279.

- Jaballah, M., Mohamed, I.A., Alemrayat, B., Al-Sulaiti, F., Mlih, M., and Mraiche, F. (2015). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 induced cardiomyocyte hypertrophy involves activation of p90 ribosomal s6 kinase. *PLoS One* *10*, e0122230.
- Jaisser, F., and Farman, N. (2016). Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacological reviews* *68*, 49-75.
- James, P.F., Grupp, I.L., Grupp, G., Woo, A.L., Askew, G.R., Croyle, M.L., Walsh, R.A., and Lingrel, J.B. (1999). Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Molecular cell* *3*, 555-563.
- Ji, W., Foo, J.N., O'Roak, B.J., Zhao, H., Larson, M.G., Simon, D.B., Newton-Cheh, C., State, M.W., Levy, D., and Lifton, R.P. (2008). Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nature genetics* *40*, 592-599.
- Jiménez-Navarro, M.F., Gómez-Doblas, J.J., Cabrera-Bueno, F., Cruz-Ocaña, E., Rodríguez-Bailón, I., Ruiz-Galdón, M., Morell, M., Molero, E., and Teresa-Galván, E.d. (2005). Síntesis de colágeno e insuficiencia cardíaca. *Revista española de cardiología* *58*, 975-978.
- Jimenez Navarro, M.F., Diez Martinez, J., Delgado Jimenez, J.F., and Crespo Leiro, M.G. (2006). [Heart failure in 2005]. *Revista española de cardiología* *59 Suppl 1*, 55-65.
- Johar, S., Cave, A.C., Narayanapanicker, A., Grieve, D.J., and Shah, A.M. (2006). Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *20*, 1546-1548.

- Jones, S.A., O'Donnell, V.B., Wood, J.D., Broughton, J.P., Hughes, E.J., and Jones, O.T. (1996). Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 271, H1626-1634.
- Joshi, S.S., Kuszynski, C.A., and Bagchi, D. (2001). The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Current pharmaceutical biotechnology* 2, 187-200.
- Kahan, T., and Bergfeldt, L. (2005). Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential. *Heart (British Cardiac Society)* 91, 250-256.
- Kamynina, E., and Staub, O. (2002). Concerted action of ENaC, Nedd4-2, and Sgk1 in transepithelial Na(+) transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F377-387.
- Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71, 511-535.
- Karmazyn, M., Liu, Q., Gan, X.T., Brix, B.J., and Fliegel, L. (2003). Aldosterone increases NHE-1 expression and induces NHE-1-dependent hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension* 42, 1171-1176.
- Katz, A.I. (1982). Renal Na-K-ATPase: its role in tubular sodium and potassium transport. *Am J Physiol* 242, F207-219.
- Kawakami, K., Aketa, S., Sakai, H., Watanabe, Y., Nishida, H., and Hirayama, M. (2011). Antihypertensive and vasorelaxant effects of water-soluble proanthocyanidins from persimmon leaf tea in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75, 1435-1439.
- Kay, S., and Kim, E. (2015). *Adrenal Glands: Physiology (Medscape)*.

- Kiilerich, P., Triqueneaux, G., Christensen, N.M., Trayer, V., Terrien, X., Lombes, M., and Prunet, P. (2015). Interaction between the trout mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in vitro. *Journal of molecular endocrinology* *55*, 55-68.
- Kimes, B.W., and Brandt, B.L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* *98*, 367-381.
- Kitada, K., Nakano, D., Hitomi, H., Kobori, H., Deguchi, K., Mori, H., Masaki, T., and Nishiyama, A. (2012). Aldosterone induces p21-regulated apoptosis via increased synthesis and secretion of tumour necrosis factor-alpha in human proximal tubular cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* *39*, 858-863.
- Kjeldsen, K. (2003). Myocardial Na,K-ATPase: Clinical aspects. *Experimental & Clinical Cardiology* *8*, 131-133.
- Kobayashi, N., Yoshida, K., Nakano, S., Ohno, T., Honda, T., Tsubokou, Y., and Matsuoka, H. (2006). Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Hypertension* *47*, 671-679.
- Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N., and Cohen, P. (1999). Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochemical Journal* *344*, 189-197.
- Kojda, G., and Kottenberg, K. (1999). Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovascular research* *41*, 514-523.
- Kolattukudy, P.E., and Niu, J. (2012). Inflammation, ER Stress, Autophagy and MCP-1/CCR2 Pathway. *Circulation Research* *110*, 174-189.

- Konstas, A.A., and Korbmacher, C. (2003). The gamma-subunit of ENaC is more important for channel surface expression than the beta-subunit. *American journal of physiology Cell physiology* 284, C447-456.
- Konstas, A.A., Shearwin-Whyatt, L.M., Fotia, A.B., Degger, B., Riccardi, D., Cook, D.I., Korbmacher, C., and Kumar, S. (2002). Regulation of the epithelial sodium channel by N4WBP5A, a novel Nedd4/Nedd4-2-interacting protein. *J Biol Chem* 277, 29406-29416.
- Koppel, H., Christ, M., Yard, B.A., Bar, P.C., van der Woude, F.J., and Wehling, M. (2003). Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 1297-1302.
- Krenning, G., Zeisberg, E.M., and Kalluri, R. (2010). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *Journal of cellular physiology* 225, 631-637.
- Kruger, M.J., Davies, N., Myburgh, K.H., and Lecour, S. (2014). Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International* 59, 41-52.
- Kubota, S., and Takigawa, M. (2015). Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 128, 181-196.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews Immunology* 4, 181-189.
- Lan, C.Z., Ding, L., Su, Y.L., Guo, K., Wang, L., Kan, H.W., Ou, Y.R., and Gao, S. (2015). Grape seed proanthocyanidins prevent DOCA-salt hypertension-induced renal injury and its mechanisms in rats. *Food & function* 6, 2179-2186.

- Landete, J.M. (2012). Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical reviews in food science and nutrition* *52*, 936-948.
- Lang, F., Artunc, F., and Vallon, V. (2009). The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Current opinion in nephrology and hypertension* *18*, 439-448.
- Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., and Vallon, V. (2006). (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* *86*, 1151-1178.
- Lang, F., and Stournaras, C. (2013). Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens, Greece)* *12*, 160-171.
- Lang, F., Stournaras, C., and Alesutan, I. (2014). Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Molecular membrane biology* *31*, 29-36.
- Lang, F., and Voelkl, J. (2013). Therapeutic potential of serum and glucocorticoid inducible kinase inhibition. *Expert opinion on investigational drugs* *22*, 701-714.
- Lazzeroni, D., Rimoldi, O., and Camici, P.G. (2016). From Left Ventricular Hypertrophy to Dysfunction and Failure. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* *80*, 555-564.
- Leask, A. (2015). Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis. *Circ Res* *116*, 1269-1276.
- Leask, A., Holmes, A., and Abraham, D.J. (2002). Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Current rheumatology reports* *4*, 136-142.

- Leask, A., Holmes, A., Black, C.M., and Abraham, D.J. (2003). Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 278, 13008-13015.
- Lee, C., Dhalla, N.S., and Hryshko, L.V. (2005). Therapeutic potential of novel Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitors in attenuating ischemia-reperfusion injury. *The Canadian journal of cardiology* 21, 509-516.
- Lee, S.Y., Kim, S.I., and Choi, M.E. (2015). Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 165, 512-530.
- Lee, Y.S., Kim, J.A., Kim, K.L., Jang, H.S., Kim, J.M., Lee, J.Y., Shin, I.S., Lee, J.S., Suh, W., Choi, J.H., *et al.* (2004). Aldosterone upregulates connective tissue growth factor gene expression via p38 MAPK pathway and mineralocorticoid receptor in ventricular myocytes. *Journal of Korean medical science* 19, 805-811.
- Leroy, V., De Seigneux, S., Agassiz, V., Hasler, U., Rafestin-Oblin, M.-E., Vinciguerra, M., Martin, P.-Y., and Féraille, E. (2009). Aldosterone Activates NF-κB in the Collecting Duct. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20, 131-144.
- Li, J., McLerie, M., and Lopatin, A.N. (2004). Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 287, H2790-2802.
- Li, J.M., Gall, N.P., Grieve, D.J., Chen, M., and Shah, A.M. (2002). Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 40, 477-484.

- Li, Z., and Langhans, S.A. (2015). Transcriptional regulators of Na,K-ATPase subunits. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3, 66.
- Lighthouse, J.K., and Small, E.M. (2016). Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity. *J Mol Cell Cardiol* 91, 52-60.
- Lijnen, P., and Petrov, V. (2000). Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 32, 865-879.
- Lin, L.C., Kuo, Y.C., and Chou, C.J. (2002). Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*. *Journal of natural products* 65, 505-508.
- Lips, D.J., deWindt, L.J., van Kraaij, D.J., and Doevendans, P.A. (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 24, 883-896.
- Liu, J., Kennedy, D.J., Yan, Y., and Shapiro, J.I. (2012). Reactive Oxygen Species Modulation of Na/K-ATPase Regulates Fibrosis and Renal Proximal Tubular Sodium Handling. *International journal of nephrology* 2012, 381320.
- Liu, L., Li, J., Liu, J., Yuan, Z., Pierre, S.V., Qu, W., Zhao, X., and Xie, Z. (2006). Involvement of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in hydrogen peroxide-induced hypertrophy in cardiac myocytes. *Free radical biology & medicine* 41, 1548-1556.
- Liu, X., Gai, Y., Liu, F., Gao, W., Zhang, Y., Xu, M., and Li, Z. (2010). Trimetazidine inhibits pressure overload-induced cardiac fibrosis through NADPH oxidase-ROS-CTGF pathway. *Cardiovascular research* 88, 150-158.
- Lombes, M., Oblin, M.E., Gasc, J.M., Baulieu, E.E., Farman, N., and Bonvalet, J.P. (1992). Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 71, 503-510.

- Lopez-Andres, N., Martin-Fernandez, B., Rossignol, P., Zannad, F., Lahera, V., Fortuno, M.A., Cachofeiro, V., and Diez, J. (2011). A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* *301*, H2372-2382.
- López Salazar, B., Ravassa Albéniz, S., Arias Guedón, T., González Miqueo, A., Querejeta, R., and Díez Martínez, J. (2006). Altered Fibrillar Collagen Metabolism in Hypertensive Heart Failure. Current Understanding and Future Prospects. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* *59*, 1047-1057.
- Lothar, A., Moser, M., Bode, C., Feldman, R.D., and Hein, L. (2015). Mineralocorticoids in the heart and vasculature: new insights for old hormones. *Annual review of pharmacology and toxicology* *55*, 289-312.
- Louch, W.E., Hougen, K., Mork, H.K., Swift, F., Aronsen, J.M., Sjaastad, I., Reims, H.M., Roald, B., Andersson, K.B., Christensen, G., *et al.* (2010). Sodium accumulation promotes diastolic dysfunction in end-stage heart failure following Serca2 knockout. *J Physiol* *588*, 465-478.
- Luczak, E.D., and Anderson, M.E. (2014). CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol* *73*, 112-116.
- Mackenzie, G.G., Delfino, J.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2009). Dimeric procyanidins are inhibitors of NF-kappaB-DNA binding. *Biochemical pharmacology* *78*, 1252-1262.
- Madonna, R., Geng, Y.J., Bolli, R., Rokosh, G., Ferdinandy, P., Patterson, C., and De Caterina, R. (2014). Co-activation of nuclear factor-kappaB and myocardin/serum response factor conveys the hypertrophy signal of high insulin levels in cardiac myoblasts. *J Biol Chem* *289*, 19585-19598.

- Maier, L.S. (2005). CaMKII $\delta$  overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* *38*, 1293-1302.
- Mamenko, M., Zaika, O., Ilatovskaya, D.V., Staruschenko, A., and Pochynyuk, O. (2012). Angiotensin II increases activity of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) in distal nephron additively to aldosterone. *J Biol Chem* *287*, 660-671.
- Manach, C., and Donovan, J.L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical research* *38*, 771-785.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* *79*, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition* *81*, 230s-242s.
- Mandinov, L., Eberli, F.R., Seiler, C., and Hess, O.M. (2000). Diastolic heart failure. *Cardiovascular research* *45*, 813-825.
- Marney, A.M., and Brown, N.J. (2007). Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci (Lond)* *113*, 267-278.
- Martin-Fernandez, B., de las Heras, N., Valero-Munoz, M., Ballesteros, S., Yao, Y.Z., Stanton, P.G., Fuller, P.J., and Lahera, V. (2014a). Beneficial effects of proanthocyanidins in the cardiac alterations induced by aldosterone in rat heart through mineralocorticoid receptor blockade. *PLoS One* *9*, e111104.

- Martin-Fernandez, B., Miana, M., De Las Heras, N., Ruiz-Hurtado, G., Fernandez-Velasco, M., Bas, M., Ballesteros, S., Lahera, V., Cachofeiro, V., and Delgado, C. (2009). Cardiac L-type calcium current is increased in a model of hyperaldosteronism in the rat. *Experimental physiology* *94*, 675-683.
- Martin-Fernandez, B., Rubio-Navarro, A., Cortegano, I., Ballesteros, S., Alia, M., Cannata-Ortiz, P., Olivares-Alvaro, E., Egido, J., de Andres, B., Gaspar, M.L., *et al.* (2016). Aldosterone Induces Renal Fibrosis and Inflammatory M1-Macrophage Subtype via Mineralocorticoid Receptor in Rats. *PLoS One* *11*, e0145946.
- Martin-Fernandez, B., Valero Munoz, M., de las Heras, N., Ballesteros, S., and Lahera, V. (2014b). Relevance of SGK1 in structural, functional and molecular alterations produced by aldosterone in heart. *Hormone molecular biology and clinical investigation* *18*, 53-61.
- Masiha, S., Sundstrom, J., and Lind, L. (2013). Inflammatory markers are associated with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in a population-based sample of elderly men and women. *Journal of human hypertension* *27*, 13-17.
- Masilamani, S., Kim, G.H., Mitchell, C., Wade, J.B., and Knepper, M.A. (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* *104*, R19-23.
- Matsushita, K., McCray, P.B., Jr., Sigmund, R.D., Welsh, M.J., and Stokes, J.B. (1996). Localization of epithelial sodium channel subunit mRNAs in adult rat lung by in situ hybridization. *Am J Physiol* *271*, L332-339.

- McMullen, J.R., and Jennings, G.L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* *34*, 255-262.
- Meier, B., Cross, A.R., Hancock, J.T., Kaup, F.J., and Jones, O.T. (1991). Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J* *275 (Pt 1)*, 241-245.
- Meinel, S., Gekle, M., and Grossmann, C. (2014). Mineralocorticoid receptor signaling: crosstalk with membrane receptors and other modulators. *Steroids* *91*, 3-10.
- Menick, D.R., Renaud, L., Buchholz, A., Muller, J.G., Zhou, H., Kappler, C.S., Kubalak, S.W., Conway, S.J., and Xu, L. (2007). Regulation of Ncx1 gene expression in the normal and hypertrophic heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1099*, 195-203.
- Messaoudi, S., Gravez, B., Tarjus, A., Pelloux, V., Ouvrard-Pascaud, A., Delcayre, C., Samuel, J., Launay, J.M., Sierra-Ramos, C., Alvarez de la Rosa, D., *et al.* (2013). Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension* *61*, 361-367.
- Michea, L., Villagran, A., Urzua, A., Kuntsmann, S., Venegas, P., Carrasco, L., Gonzalez, M., and Marusic, E.T. (2008). Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and prevents oxidative stress in uremic rats. *Hypertension* *52*, 295-300.
- Mihailidou, A.S., Buhagiar, K.A., and Rasmussen, H.H. (1998). Na<sup>+</sup> influx and Na<sup>(+)</sup>-K<sup>+</sup> pump activation during short-term exposure of cardiac myocytes to aldosterone. *Am J Physiol* *274*, C175-181.

- Mihailidou, A.S., Bundgaard, H., Mardini, M., Hansen, P.S., Kjeldsen, K., and Rasmussen, H.H. (2000). Hyperaldosteronemia in rabbits inhibits the cardiac sarcolemmal Na(+)-K(+) pump. *Circ Res* *86*, 37-42.
- Miura, S., Nakayama, A., Tomita, S., Matsuo, Y., Suematsu, Y., and Saku, K. (2015). Comparison of aldosterone synthesis in adrenal cells, effect of various AT1 receptor blockers with or without atrial natriuretic peptide. *Clinical and experimental hypertension (New York, NY : 1993)* *37*, 353-357.
- Mohamed, I.A., Gadeau, A.-P., Fliegel, L., Lopaschuk, G., Mlih, M., Abdulrahman, N., Fillmore, N., and Mraiche, F. (2015). Na(+)/H(+) Exchanger Isoform 1- Induced Osteopontin Expression Facilitates Cardiomyocyte Hypertrophy. *PLoS ONE* *10*, e0123318.
- Mohana, T., Navin, A.V., Jamuna, S., Sakeena Sadullah, M.S., and Niranjali Devaraj, S. (2015). Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins -In-vivo and in-vitro study. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* *82*, 96-105.
- Moncada, S. (1999). Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine* *92*, 164-169.
- Montezano, A.C., and Touyz, R.M. (2012). Reactive oxygen species and endothelial function—role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* *110*, 87-94.
- Morris, K. (2002). Targeting the myocardial sodium-hydrogen exchange for treatment of heart failure. *Expert opinion on therapeutic targets* *6*, 291-298.

- Mraiche, F., Oka, T., Gan, X.T., Karmazyn, M., and Fliegel, L. (2011). Activated NHE1 is required to induce early cardiac hypertrophy in mice. *Basic research in cardiology* 106, 603-616.
- Mungrue, I.N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D.J., and Husain, M. (2002). Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest* 109, 735-743.
- Munoz-Durango, N., Vecchiola, A., Gonzalez-Gomez, L.M., Simon, F., Riedel, C.A., Fardella, C.E., and Kalergis, A.M. (2015). Modulation of Immunity and Inflammation by the Mineralocorticoid Receptor and Aldosterone. *BioMed research international* 2015, 652738.
- Murdoch, C.E., Zhang, M., Cave, A.C., and Shah, A.M. (2006). NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovascular research* 71, 208-215.
- Muto, S. (1995). Action of aldosterone on renal collecting tubule cells. *Current opinion in nephrology and hypertension* 4, 31-40.
- Nagasawa, K., Takahashi, K., Matsuura, N., Takatsu, M., Hattori, T., Watanabe, S., Harada, E., Niinuma, K., Murohara, T., and Nagata, K. (2015). Comparative effects of valsartan in combination with cilnidipine or amlodipine on cardiac remodeling and diastolic dysfunction in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 38, 39-47.
- Nakajima, S., Suzuki, H., Saito, I., and Saruta, T. (1987). Effects of atrial natriuretic peptide, dopamine, and ouabain on aldosterone synthesis. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115, 57-62.

- Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., and Wakabayashi, S. (2008). Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is sufficient to generate Ca<sup>2+</sup> signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 103, 891-899.
- Namsolleck, P., and Unger, T. (2014). Aldosterone synthase inhibitors in cardiovascular and renal diseases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 29 Suppl 1, i62-i68.
- Nandakumar, V., Singh, T., and Katiyar, S.K. (2008). Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer letters* 269, 378-387.
- Naray-Fejes-Toth, A., and Fejes-Toth, G. (2000). The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int* 57, 1290-1294.
- Neri, M., Fineschi, V., Di Paolo, M., Pomara, C., Riezzo, I., Turillazzi, E., and Cerretani, D. (2015). Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction. *Current vascular pharmacology* 13, 26-36.
- Odunewu-Aderibigbe, A., and Fliegel, L. (2014). The Na(+) /H(+) exchanger and pH regulation in the heart. *IUBMB life* 66, 679-685.
- Oemar, B.S., and Luscher, T.F. (1997). Connective tissue growth factor. Friend or foe? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 1483-1489.
- Ohtake, M., Hattori, T., Murase, T., Takahashi, K., Takatsu, M., Ohtake, M., Miyachi, M., Watanabe, S., Cheng, X.W., Murohara, T., *et al.* (2014). GLUCOCORTICOIDS ACTIVATE CARDIAC MINERALOCORTICOID RECEPTORS IN ADRENALECTOMIZED DAHL SALT-SENSITIVE RATS. *Nagoya Journal of Medical Science* 76, 59-72.

- Okoshi, M.P., Yan, X., Okoshi, K., Nakayama, M., Schuldt, A.J., O'Connell, T.D., Simpson, P.C., and Lorell, B.H. (2004). Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of cardiac failure* 10, 511-518.
- Opie, L.H., Commerford, P.J., Gersh, B.J., and Pfeffer, M.A. (2006). Controversies in ventricular remodelling. *Lancet (London, England)* 367, 356-367.
- Ortega, A., Tarazon, E., Rosello-Lleti, E., Gil-Cayueta, C., Lago, F., Gonzalez-Juanatey, J.R., Cinca, J., Jorge, E., Martinez-Dolz, L., Portoles, M., *et al.* (2015). Patients with Dilated Cardiomyopathy and Sustained Monomorphic Ventricular Tachycardia Show Up-Regulation of KCNN3 and KCNJ2 Genes and CACNG8-Linked Left Ventricular Dysfunction. *PLoS One* 10, e0145518.
- Ou, K., Percival, S.S., Zou, T., Khoo, C., and Gu, L. (2012). Transport of cranberry A-type procyanidin dimers, trimers, and tetramers across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 1390-1396.
- Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P.B., and Ndebele, K. (2014). The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *International journal of inflammation* 2014, 689360.
- Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological reviews* 87, 315-424.
- Padmanabhan Iyer, R., Chiao, Y.A., Flynn, E.R., Hakala, K., Cates, C.A., Weintraub, S.T., and de Castro Bras, L.E. (2016). Matrix metalloproteinase-9-dependent mechanisms of reduced contractility and increased stiffness in the aging heart. *Proteomics Clinical applications* 10, 92-107.
- Palmer, B.F. (2015). Regulation of Potassium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 1050-1060.

- Palmer, L.G., and Frindt, G. (2000). Aldosterone and potassium secretion by the cortical collecting duct. *Kidney Int* 57, 1324-1328.
- Parameswaran, N., and Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 20, 87-103.
- Park, S.K., Kim, J., Seomun, Y., Choi, J., Kim, D.H., Han, I.O., Lee, E.H., Chung, S.K., and Joo, C.K. (2001). Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochemical and biophysical research communications* 284, 966-971.
- Park, Y.M., Park, M.Y., Suh, Y.L., and Park, J.B. (2004). NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochemical and biophysical research communications* 313, 812-817.
- Parker, J.D., and Thiessen, J.J. (2004). Increased endothelin-1 production in patients with chronic heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 286, H1141-1145.
- Parker, M.D., Myers, E.J., and Schelling, J.R. (2015). Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-1 (NHE1) regulation in kidney proximal tubule. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 2061-2074.
- Pataki, T., Bak, I., Kovacs, P., Bagchi, D., Das, D.K., and Tosaki, A. (2002). Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *The American journal of clinical nutrition* 75, 894-899.
- Patni, H., Mathew, J.T., Luan, L., Franki, N., Chander, P.N., and Singhal, P.C. (2007). Aldosterone promotes proximal tubular cell apoptosis: role of oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1065-1071.

- Paulsen, G., Egener, I., Raastad, T., Reinholdt, F., Owe, S., Lauritzen, F., Brorson, S.H., and Koskinen, S. (2013). Inflammatory markers CD11b, CD16, CD66b, CD68, myeloperoxidase and neutrophil elastase in eccentric exercised human skeletal muscles. *Histochemistry and cell biology* *139*, 691-715.
- Pazos-López, P., Peteiro-Vázquez, J., Carcía-Campos, A., García-Bueno, L., de Torres, J.P.A., and Castro-Beiras, A. (2011). The causes, consequences, and treatment of left or right heart failure. *Vascular Health and Risk Management* *7*, 237-254.
- Pearce, D. (2001). The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol Metab* *12*, 341-347.
- Pearce, D., Soundararajan, R., Trimpert, C., Kashlan, O.B., Deen, P.M., and Kohan, D.E. (2015). Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin J Am Soc Nephrol* *10*, 135-146.
- Pellman, J., Zhang, J., and Sheikh, F. (2016). Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems. *J Mol Cell Cardiol* *94*, 22-31.
- Pennica, D., Shaw, K.J., Swanson, T.A., Moore, M.W., Shelton, D.L., Zioncheck, K.A., Rosenthal, A., Taga, T., Paoni, N.F., and Wood, W.I. (1995). Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem* *270*, 10915-10922.
- Petzel, D., Ganz, M.B., Nestler, E.J., Lewis, J.J., Goldenring, J., Akcicek, F., and Hayslett, J.P. (1992). Correlates of aldosterone-induced increases in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Isc}$  suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  is the second messenger for stimulation of apical membrane conductance. *J Clin Invest* *89*, 150-156.

- Pham-Huy, L.A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS* 4, 89-96.
- Piaditis, G., Markou, A., Papanastasiou, L., Androulakis, II, and Kaltsas, G. (2015). Progress in aldosteronism: a review of the prevalence of primary aldosteronism in pre-hypertension and hypertension. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 172, R191-203.
- Pinto, V., Pinho, M.J., Hopfer, U., Jose, P.A., and Soares-da-Silva, P. (2008). Oxidative stress and the genomic regulation of aldosterone-stimulated NHE1 activity in SHR renal proximal tubular cells. *Molecular and cellular biochemistry* 310, 191-201.
- Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J., Martinez, F., Roniker, B., Bittman, R., Hurley, S., Kleiman, J., and Gatlín, M. (2003). Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 348, 1309-1321.
- Pitt, B., White, H., Nicolau, J., Martinez, F., Gheorghiade, M., Aschermann, M., van Veldhuisen, D.J., Zannad, F., Krum, H., Mukherjee, R., *et al.* (2005). Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 46, 425-431.

- Pitt, B., Zannad, F., Remme, W.J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., Palensky, J., and Wittes, J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *The New England journal of medicine* *341*, 709-717.
- Pogwizd, S.M., Qi, M., Yuan, W., Samarel, A.M., and Bers, D.M. (1999). Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res* *85*, 1009-1019.
- Pogwizd, S.M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W., and Bers, D.M. (2001). Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* *88*, 1159-1167.
- Popov, S., Venetsanou, K., Chedrese, P.J., Pinto, V., Takemori, H., Franco-Cereceda, A., Eriksson, P., Mochizuki, N., Soares-da-Silva, P., and Bertorello, A.M. (2012). Increases in intracellular sodium activate transcription and gene expression via the salt-inducible kinase 1 network in an atrial myocyte cell line. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* *303*, H57-65.
- Poulsen, S.B., Praetorius, J., Damkier, H.H., Miller, L., Nelson, R.D., Hummler, E., and Christensen, B.M. (2016). Reducing alphaENaC expression in the kidney connecting tubule induces pseudohypoaldosteronism type 1 symptoms during K<sup>+</sup> loading. *Am J Physiol Renal Physiol* *310*, F300-310.
- Prakash, E.S. (2005). "Aldosterone Escape" or Refractory Hyperaldosteronism? *Medscape General Medicine* *7*, 25-25.
- Preston, R.R., and Wilson, T.E. (2012). *Physiology* (Wolters Kluwer, Health).

- Prior, R.L., and Gu, L. (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* 66, 2264-2280.
- Prior, R.L., Wu, X., Gu, L., Hager, T., Hager, A., Wilkes, S., and Howard, L. (2009). Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Molecular nutrition & food research* 53, 1406-1418.
- Prisant, L.M. (2005). Hypertensive heart disease. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 7, 231-238.
- Priyadarshi, S., Valentine, B., Han, C., Fedorova, O.V., Bagrov, A.Y., Liu, J., Periyasamy, S.M., Kennedy, D., Malhotra, D., Xie, Z., *et al.* (2003). Effect of green tea extract on cardiac hypertrophy following 5/6 nephrectomy in the rat. *Kidney Int* 63, 1785-1790.
- Qin, W., Rudolph, A.E., Bond, B.R., Rocha, R., Blomme, E.A., Goellner, J.J., Funder, J.W., and McMahon, E.G. (2003). Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 93, 69-76.
- Queisser, N., and Schupp, N. (2012). Aldosterone, oxidative stress, and NF-kappaB activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. *Free radical biology & medicine* 53, 314-327.
- Quinkler, M., Born-Frontsberg, E., and Fourkiotis, V.G. (2010). Comorbidities in primary aldosteronism. *Horm Metab Res* 42, 429-434.
- Quinn, S., Harvey, B.J., and Thomas, W. (2014). Rapid aldosterone actions on epithelial sodium channel trafficking and cell proliferation. *Steroids* 81, 43-48.

- Quinones, M., Miguel, M., and Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological research* *68*, 125-131.
- Rafikov, R., Fonseca, F.V., Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., Fulton, D., and Black, S.M. (2011). eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *The Journal of endocrinology* *210*, 271-284.
- Rastaldo, R., Pagliaro, P., Cappello, S., Penna, C., Mancardi, D., Westerhof, N., and Losano, G. (2007). Nitric oxide and cardiac function. *Life sciences* *81*, 779-793.
- Rebic, D., Rasic, S., and Rebic, V. (2014). Influence of endothelin-1 and nitric oxide on left ventricular remodelling in patients on peritoneal dialysis. *Renal failure* *36*, 232-236.
- Reddy, S., and Bernstein, D. (2015). Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure. *Circulation* *132*, 1734-1742.
- Reil, J.C., Hohl, M., Selejan, S., Lipp, P., Drautz, F., Kazakow, A., Munz, B.M., Muller, P., Steendijk, P., Reil, G.H., *et al.* (2012). Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J* *33*, 2098-2108.
- Richardson, R.V., Batchen, E.J., Denvir, M.A., Gray, G.A., and Chapman, K.E. (2016). Cardiac GR and MR: From Development to Pathology. *Trends Endocrinol Metab* *27*, 35-43.
- Rienks, M., Papageorgiou, A.P., Frangogiannis, N.G., and Heymans, S. (2014). Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circ Res* *114*, 872-888.

- Roos, K.P., Jordan, M.C., Fishbein, M.C., Ritter, M.R., Friedlander, M., Chang, H.C., Rahgozar, P., Han, T., Garcia, A.J., Maclellan, W.R., *et al.* (2007). Hypertrophy and heart failure in mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger. *Journal of cardiac failure* 13, 318-329.
- Rossier, B.C. (2014). Epithelial sodium channel (ENaC) and the control of blood pressure. *Current opinion in pharmacology* 15, 33-46.
- Rossier, B.C., Baker, M.E., and Studer, R.A. (2015). Epithelial sodium transport and its control by aldosterone: the story of our internal environment revisited. *Physiol Rev* 95, 297-340.
- Rude, M.K., Duhaney, T.A., Kuster, G.M., Judge, S., Heo, J., Colucci, W.S., Siwik, D.A., and Sam, F. (2005). Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 46, 555-561.
- Sam, R., and Feizi, I. (2012). Understanding hypernatremia. *American journal of nephrology* 36, 97-104.
- Samavat, S., Ahmadpoor, P., and Samadian, F. (2011). Aldosterone, hypertension, and beyond. *Iranian journal of kidney diseases* 5, 71-76.
- Samson, R., Baydoun, H., Jaiswal, A., and Le Jemtel, T.H. (2015). Cardiac Adrenergic Nervous System and Left Ventricular Remodeling. *The American journal of the medical sciences* 350, 321-326.
- Sardina, J.L., Lopez-Ruano, G., Sanchez-Abarca, L.I., Perez-Simon, J.A., Gaztelumendi, A., Trigueros, C., Llanillo, M., Sanchez-Yague, J., and Hernandez-Hernandez, A. (2010). p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. *Cell death and differentiation* 17, 1842-1854.

- Satoh, H., Ginsburg, K.S., Qing, K., Terada, H., Hayashi, H., and Bers, D.M. (2000). KB-R7943 block of  $\text{Ca}^{2+}$  influx via  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents  $\text{Ca}^{2+}$  overload in rat ventricular myocytes. *Circulation* *101*, 1441-1446.
- Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K., and Colucci, W.S. (2002). Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* *34*, 379-388.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition* *45*, 287-306.
- Schild, L., and Kellenberger, S. (2001). Structure function relationships of ENaC and its role in sodium handling. *Advances in experimental medicine and biology* *502*, 305-314.
- Schirpenbach, C., and Reincke, M. (2007). Primary aldosteronism: current knowledge and controversies in Conn's syndrome. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* *3*, 220-227.
- Schmidt, T.A., and Kjeldsen, K. (1997). Myocardial K homeostasis in ischemia—importance of Na,K-ATPase. *Basic research in cardiology* *92 Suppl 2*, 57-59.
- Schrier, R.W., Masoumi, A., and Elhassan, E. (2010). Aldosterone: role in edematous disorders, hypertension, chronic renal failure, and metabolic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* *5*, 1132-1140.
- Seki, S., Taniguchi, M., Takeda, H., Nagai, M., Taniguchi, I., and Mochizuki, S. (2002). Inhibition by KB-r7943 of the reverse mode of the  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger reduces  $\text{Ca}^{2+}$  overload in ischemic-reperfused rat hearts. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* *66*, 390-396.

- Seno, T., Inoue, N., Gao, D., Okuda, M., Sumi, Y., Matsui, K., Yamada, S., Hirata, K.I., Kawashima, S., Tawa, R., *et al.* (2001). Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thrombosis research* 103, 399-409.
- Seok, J.H., Hong, J.H., Jeon, J.R., Hur, G.M., Sung, J.Y., and Lee, J.H. (1999). Aldosterone directly induces Na, K-ATPase alpha 1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. *Biochem Mol Biol Int* 47, 251-254.
- Seymour, E.M., Singer, A.A., Bennink, M.R., Parikh, R.V., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., and Bolling, S.F. (2008). Chronic intake of a phytochemical-enriched diet reduces cardiac fibrosis and diastolic dysfunction caused by prolonged salt-sensitive hypertension. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 63, 1034-1042.
- Shakibaei, M., and Mobasheri, A. (2003). Beta1-integrins co-localize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes. *Histology and histopathology* 18, 343-351.
- Shao, Z.H., Becker, L.B., Vanden Hoek, T.L., Schumacker, P.T., Li, C.Q., Zhao, D., Wojcik, K., Anderson, T., Qin, Y., Dey, L., *et al.* (2003). Grape seed proanthocyanidin extract attenuates oxidant injury in cardiomyocytes. *Pharmacological research* 47, 463-469.
- Shattock, M.J., Ottolia, M., Bers, D.M., Blaustein, M.P., Boguslavskyi, A., Bossuyt, J., Bridge, J.H., Chen-Izu, Y., Clancy, C.E., Edwards, A., *et al.* (2015). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. *J Physiol* 593, 1361-1382.
- Shaw, R.M., and Colecraft, H.M. (2013). L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovascular research* 98, 177-186.

- Shehata, M.F. (2010). The Epithelial Sodium Channel alpha subunit (alpha ENaC) alternatively spliced form "b" in Dahl rats: What's next? *Int Arch Med* *3*, 14.
- Shi, H., Zhang, A., He, Y., Yang, M., and Gan, W. (2016). Effects of p53 on aldosterone-induced mesangial cell apoptosis in vivo and in vitro. *Molecular medicine reports* *13*, 5102-5108.
- Shimoni, Y., Chen, K., Emmett, T., and Kargacin, G. (2008). Aldosterone and the autocrine modulation of potassium currents and oxidative stress in the diabetic rat heart. *British Journal of Pharmacology* *154*, 675-687.
- Silvestre, J.S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J.M., Swynghedauw, B., and Delcayre, C. (1998). Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* *273*, 4883-4891.
- Slepkov, E., and Fliegel, L. (2002). Structure and function of the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* *80*, 499-508.
- Smeets, P.J.H., Teunissen, B.E.J., Planavila, A., de Vogel-van den Bosch, H., Willemsen, P.H.M., van der Vusse, G.J., and van Bilsen, M. (2008). Inflammatory Pathways Are Activated during Cardiomyocyte Hypertrophy and Attenuated by Peroxisome Proliferator-activated Receptors PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta$ . *The Journal of Biological Chemistry* *283*, 29109-29118.
- Somanna, N.K., Yariswamy, M., Garagliano, J.M., Siebenlist, U., Mummidi, S., Valente, A.J., and Chandrasekar, B. (2015). Aldosterone-induced cardiomyocyte growth, and fibroblast migration and proliferation are mediated by TRAF3IP2. *Cellular signalling* *27*, 1928-1938.

- Somers, J.R., Beck, P.L., Lees-Miller, J.P., Roach, D., Li, Y., Guo, J., Loken, S., Zhan, S., Semeniuk, L., and Duff, H.J. (2008). iNOS in cardiac myocytes plays a critical role in death in a murine model of hypertrophy induced by calcineurin. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 295, H1122-h1131.
- Sonalker, P.A., Tofovic, S.P., and Jackson, E.K. (2004). Increased expression of the sodium transporter BSC-1 in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 311, 1052-1061.
- Sonoyama, T., Sone, M., Tamura, N., Honda, K., Taura, D., Kojima, K., Fukuda, Y., Kanamoto, N., Miura, M., Yasoda, A., *et al.* (2014). Role of endogenous ACTH on circadian aldosterone rhythm in patients with primary aldosteronism. *Endocrine connections* 3, 173-179.
- Soskic, S.S., Dobutovic, B.D., Sudar, E.M., Obradovic, M.M., Nikolic, D.M., Djordjevic, J.D., Radak, D.J., Mikhailidis, D.P., and Isenovic, E.R. (2011). Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure. *The open cardiovascular medicine journal* 5, 153-163.
- Sparks, M.A., Crowley, S.D., Gurley, S.B., Mirotsoy, M., and Coffman, T.M. (2014). Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology* 4, 1201-1228.
- Spector, D.A., Yang, Q., Klopouh, L., Deng, J., Weinman, E.J., Steplock, D.A., Biswas, R., Brazie, M.F., Liu, J., and Wade, J.B. (2008). The ROMK potassium channel is present in mammalian urinary tract epithelia and muscle. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1658-1665.

- Splawski, I., Timothy, K.W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F.B., Beggs, A.H., Sanguinetti, M.C., and Keating, M.T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 8089-8096; discussion 8086-8088.
- Stefanon, I., Cade, J.R., Fernandes, A.A., Ribeiro Junior, R.F., Targueta, G.P., Mill, J.G., and Vassallo, D.V. (2009). Ventricular performance and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al] *42*, 902-911.
- Struthers, A.D. (2004). Aldosterone in heart failure: pathophysiology and treatment. *Curr Heart Fail Rep* *1*, 171-175.
- Suhail, M. (2010). Na<sup>(+)</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *Journal of Clinical Medicine Research* *2*, 1-17.
- Sun, M., Chen, M., Dawood, F., Zurawska, U., Li, J.Y., Parker, T., Kassiri, Z., Kirshenbaum, L.A., Arnold, M., Khokha, R., *et al.* (2007). Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation* *115*, 1398-1407.
- Sun, Y., Zhang, J., Lu, L., Chen, S.S., Quinn, M.T., and Weber, K.T. (2002). Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *The American journal of pathology* *161*, 1773-1781.

- Sundset, R., Bertelsen, G., and Ytrehus, K. (2003). Role of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) in heart muscle function during transient acidosis. A study in papillary muscles from rat and guinea pig hearts. *Canadian journal of physiology and pharmacology* *81*, 937-943.
- Suzuki, T., Hoshi, H., Sasaki, H., and Mitsui, Y. (1991). Endothelin-1 stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium. II. *Journal of cardiovascular pharmacology* *17 Suppl 7*, S182-186.
- Szuts, V., Menesi, D., Varga-Orvos, Z., Zvara, A., Houshmand, N., Bitay, M., Bogats, G., Virag, L., Baczko, I., Szalontai, B., *et al.* (2013). Altered expression of genes for Kir ion channels in dilated cardiomyopathy. *Canadian journal of physiology and pharmacology* *91*, 648-656.
- Tai, D.J., Su, C.C., Ma, Y.L., and Lee, E.H. (2009). SGK1 phosphorylation of I $\kappa$ B Kinase alpha and p300 Up-regulates NF-kappaB activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression. *J Biol Chem* *284*, 4073-4089.
- Takahashi, N., Saito, Y., Kuwahara, K., Harada, M., Tanimoto, K., Nakagawa, Y., Kawakami, R., Nakanishi, M., Yasuno, S., Usami, S., *et al.* (2005). Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* *38*, 185-192.
- Takimoto, E., and Kass, D.A. (2007). Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* *49*, 241-248.
- Tanaka, H., and Shigenobu, K. (2005). Pathophysiological significance of T-type Ca<sup>2+</sup> channels: T-type Ca<sup>2+</sup> channels and drug development. *Journal of pharmacological sciences* *99*, 214-220.

- Teixeira, S., Siquet, C., Alves, C., Boal, I., Marques, M.P., Borges, F., Lima, J.L., and Reis, S. (2005). Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free radical biology & medicine* *39*, 1099-1108.
- Ter Maaten, J.M., Damman, K., Verhaar, M.C., Paulus, W.J., Duncker, D.J., Cheng, C., van Heerebeek, L., Hillege, H.L., Lam, C.S., Navis, G., *et al.* (2016). Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *European journal of heart failure*.
- Terada, Y., Ueda, S., Hamada, K., Shimamura, Y., Ogata, K., Inoue, K., Taniguchi, Y., Kagawa, T., Horino, T., and Takao, T. (2012). Aldosterone stimulates nuclear factor-kappa B activity and transcription of intercellular adhesion molecule-1 and connective tissue growth factor in rat mesangial cells via serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase-1. *Clinical and experimental nephrology* *16*, 81-88.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Merrillon, J.M., Arola, L., Ardevol, A., Blade, C., Fernandez-Larrea, J., Pujadas, G., Salvado, J., *et al.* (2007). Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry* *55*, 4357-4365.
- Thomas, W., McEneaney, V., and Harvey, B.J. (2007). Aldosterone-stimulated PKC signalling cascades: from receptor to effector. *Biochemical Society transactions* *35*, 1049-1051.
- Tiwari, S., Zhang, Y., Heller, J., Abernethy, D.R., and Soldatov, N.M. (2006). Atherosclerosis-related molecular alteration of the human CaV1.2 calcium channel alpha1C subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 17024-17029.

- Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E., and Blaxall, B.C. (2016). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* 118, 1021-1040.
- Tsai, C.C., Wu, S.B., Chang, P.C., and Wei, Y.H. (2015). Alteration of Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Expression in Orbital Fibroblasts from Patients with Graves' Ophthalmopathy. *PLoS One* 10, e0143514.
- Tsang, L.L., Chan, L.N., Wang, X.F., So, S.C., Yuen, J.P., Fiscus, R.R., and Chan, H.C. (2001). Enhanced epithelial Na(+) channel (ENaC) activity in mouse endometrial epithelium by upregulation of gammaENaC subunit. *The Japanese journal of physiology* 51, 539-543.
- Tyagi, S.C. (1998). Dynamic extracellular matrix remodeling in the heart failure: cardiac hypertrophy, dilatation and fibrosis. *Pathophysiology* 4, 227-234
- Unsold, B., Bremen, E., Didie, M., Hasenfuss, G., and Schafer, K. (2015). Differential PI3K signal transduction in obesity-associated cardiac hypertrophy and response to ischemia. *Obesity (Silver Spring, Md)* 23, 90-99.
- Ushio-Fukai, M., Zafari, A.M., Fukui, T., Ishizaka, N., and Griendling, K.K. (1996). p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271, 23317-23321.
- Vaidya, A., Halperin, F., Alexander, E.K., and Dluhy, R. (2000). Hyperaldosteronism. In *Endotext*, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.).

- van Bemmelen, M.X., Rougier, J.S., Gavillet, B., Apotheloz, F., Daidie, D., Tateyama, M., Rivolta, I., Thomas, M.A., Kass, R.S., Staub, O., *et al.* (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res* 95, 284-291.
- Van der Meide, P.H., and Schellekens, H. (1996). Cytokines and the immune response. *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)* 8, 243-249.
- Van Linthout, S., Miteva, K., and Tschope, C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular research* 102, 258-269.
- Vanden Hoek, T.L., Li, C., Shao, Z., Schumacker, P.T., and Becker, L.B. (1997). Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2571-2583.
- Vasan, R.S., and Levy, D. (2000). Defining diastolic heart failure: a call for standardized diagnostic criteria. *Circulation* 101, 2118-2121.
- Velez Rueda, J.O., Palomeque, J., and Mattiazzi, A. (2012). Early apoptosis in different models of cardiac hypertrophy induced by high renin-angiotensin system activity involves CaMKII. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 112, 2110-2120.
- Velling, T., Risteli, J., Wennerberg, K., Mosher, D.F., and Johansson, S. (2002). Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 1 1beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem* 277, 37377-37381.
- Verdonck, F., Volders, P.G., Vos, M.A., and Sipido, K.R. (2003a). Increased Na<sup>+</sup> concentration and altered Na/K pump activity in hypertrophied canine ventricular cells. *Cardiovascular research* 57, 1035-1043.

- Verdonck, F., Volders, P.G., Vos, M.A., and Sipido, K.R. (2003b). Intracellular Na<sup>+</sup> and altered Na<sup>+</sup> transport mechanisms in cardiac hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* *35*, 5-25.
- Viola, H.M., Jordan, M.C., Roos, K.P., and Hool, L.C. (2014). Decreased myocardial injury and improved contractility after administration of a peptide derived against the alpha-interacting domain of the L-type calcium channel. *Journal of the American Heart Association* *3*, e000961.
- Viquerat, C.E., Daly, P., Swedberg, K., Evers, C., Curran, D., Parmley, W.W., and Chatterjee, K. (1985). Endogenous catecholamine levels in chronic heart failure. Relation to the severity of hemodynamic abnormalities. *The American journal of medicine* *78*, 455-460.
- Voelkl, J., Lin, Y., Alesutan, I., Ahmed, M.S., Pasham, V., Mia, S., Gu, S., Feger, M., Saxena, A., Metzler, B., *et al.* (2012). Sgk1 sensitivity of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger activity and cardiac remodeling following pressure overload. *Basic research in cardiology* *107*, 236.
- Voelkl, J., Pasham, V., Ahmed, M.S., Walker, B., Sztejn, K., Kuhl, D., Metzler, B., Alesutan, I., and Lang, F. (2013). Sgk1-dependent stimulation of cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhe1 by dexamethasone. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* *32*, 25-38.
- Vogiatzoglou, A., Mulligan, A.A., Luben, R.N., Lentjes, M.A., Heiss, C., Kelm, M., Merx, M.W., Spencer, J.P., Schroeter, H., and Kuhnle, G.G. (2014). Assessment of the dietary intake of total flavan-3-ols, monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins in the European Union. *The British journal of nutrition* *111*, 1463-1473.

- Waanders, F., de Vries, L.V., van Goor, H., Hillebrands, J.L., Laverman, G.D., Bakker, S.J., and Navis, G. (2011). Aldosterone, from (patho)physiology to treatment in cardiovascular and renal damage. *Current vascular pharmacology* 9, 594-605.
- Wagner, M., Rudakova, E., and Volk, T. (2008). Aldosterone-induced changes in the cardiac L-type Ca(2+) current can be prevented by antioxidants in vitro and are absent in rats on low salt diet. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457, 339-349.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E.C., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S.K., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J.H., *et al.* (2006). Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na+ channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138.
- Wald, H. (1999). Regulation of the ROMK potassium channel in the kidney. *Experimental nephrology* 7, 201-206.
- Warren, J.S., Ward, P.A., and Johnson, K.J. (1988). Tumor necrosis factor: a plurifunctional mediator of acute inflammation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1, 242-247.
- Waspe, L.E., Ordahl, C.P., and Simpson, P.C. (1990). The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest* 85, 1206-1214.
- Watkins, S.J., Borthwick, G.M., and Arthur, H.M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47, 125-131.

- Weber, K.T. (1994). The what, why and how of hypertensive heart disease. *Journal of human hypertension* 8, 665-675.
- Weber, K.T., Pick, R., Janicki, J.S., Gadodia, G., and Lakier, J.B. (1988). Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy. *American heart journal* 116, 1641-1646.
- Weber, K.T., Sun, Y., Katwa, L.C., and Cleutjens, J.P. (1995). Connective tissue: a metabolic entity? *J Mol Cell Cardiol* 27, 107-120.
- Wei, G.Z., Zhou, J.J., Wang, B., Wu, F., Bi, H., Wang, Y.M., Yi, D.H., Yu, S.Q., and Pei, J.M. (2007). Diastolic Ca<sup>2+</sup> overload caused by Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger during the first minutes of reperfusion results in continued myocardial stunning. *European journal of pharmacology* 572, 1-11.
- Welling, P.A. (2013). Regulation of renal potassium secretion: molecular mechanisms. *Seminars in nephrology* 33, 215-228.
- Welling, P.A., and Ho, K. (2009). A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F849-863.
- Whaley-Connell, A., Johnson, M.S., and Sowers, J.R. (2010). Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 52, 401-409.
- White, P.C. (2003). Aldosterone: direct effects on and production by the heart. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 2376-2383.
- Williams, G.H. (2005). Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart failure reviews* 10, 7-13.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine* 36, 838-849.

- Wojczuk, B., and Gniot-Szulzycka, J. (2004). [Nongenomic action of aldosterone on cellular metabolism]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* *58*, 252-258.
- Woodard, G.E., and Rosado, J.A. (2008). Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *International review of cell and molecular biology* *268*, 59-93.
- Wu, D., and Qi, J. (2012). Mechanisms of the beneficial effect of NHE1 inhibitor in traumatic hemorrhage: inhibition of inflammatory pathways. *Resuscitation* *83*, 774-781.
- Wulff, P., Vallon, V., Huang, D.Y., Volkl, H., Yu, F., Richter, K., Jansen, M., Schlunz, M., Klingel, K., Loffing, J., *et al.* (2002). Impaired renal Na(+) retention in the *sgk1*-knockout mouse. *J Clin Invest* *110*, 1263-1268.
- Xiao, T., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, Y., Yu, Z., and Shen, X. (2013). Activation of an apoptotic signal transduction pathway involved in the upregulation of calpain and apoptosis-inducing factor in aldosterone-induced primary cultured cardiomyocytes. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* *53*, 364-370.
- Xie, J.X., Li, X., and Xie, Z. (2013a). Regulation of renal function and structure by the signaling Na/K-ATPase. *IUBMB life* *65*, 991-998.
- Xie, Y., Yan, M., and Gai, L. (2013b). [Effect of angiotensin II and aldosterone on the proliferation of cardiac fibroblasts in rats]. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences* *38*, 902-908.

- Xie, Z., Kometiani, P., Liu, J., Li, J., Shapiro, J.I., and Askari, A. (1999). Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem* *274*, 19323-19328.
- Xue, J., Mraiche, F., Zhou, D., Karmazyn, M., Oka, T., Fliegel, L., and Haddad, G.G. (2010). Elevated myocardial Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger isoform 1 activity elicits gene expression that leads to cardiac hypertrophy. *Physiological Genomics* *42*, 374-383.
- Yamakage, M., and Namiki, A. (2002). Calcium channels—basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels—a review. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie* *49*, 151-164.
- Yan, Z.Y., Ban, T., Fan, Y., Chen, W.R., Sun, H.L., Chen, H., Qiao, Q.F., and Li, B.Y. (2015). Na<sup>+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> influx through reverse mode of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in mouse ventricular cardiomyocyte. *Oncotarget* *6*, 23272-23280.
- Yang, B., and Kumar, S. (2010). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell death and differentiation* *17*, 68-77.
- Yang, J., and Young, M.J. (2009). The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *Journal of molecular endocrinology* *43*, 53-64.
- Yang, L., Edvinsson, J., Sackin, H., and Palmer, L.G. (2012). Ion selectivity and current saturation in inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology* *139*, 145-157.

- Yasuoka, S., Kai, H., Kajimoto, H., Kudo, H., Takayama, N., Anegawa, T., Koga, M., Miyamoto, T., Mifune, H., Kage, M., *et al.* (2013). Blood pressure variability activates cardiac mineralocorticoid receptor and induces cardiac remodeling in hypertensive rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 77, 1474-1481.
- Yilmaz, A., and Sechtem, U. (2014). Diagnostic approach and differential diagnosis in patients with hypertrophied left ventricles. *Heart (British Cardiac Society)* 100, 662-671.
- Yin, Z., Wang, X., Zhang, L., Zhou, H., Wei, L., and Dong, X. (2016). Aspirin Attenuates Angiotensin II-induced Cardiomyocyte Hypertrophy by Inhibiting the Ca(2+) /Calcineurin-NFAT Signaling Pathway. *Cardiovascular therapeutics* 34, 21-29.
- Yokoyama, T., Nakano, M., Bednarczyk, J.L., McIntyre, B.W., Entman, M., and Mann, D.L. (1997). Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* 95, 1247-1252.
- Yoo, D., Kim, B.Y., Campo, C., Nance, L., King, A., Maouyo, D., and Welling, P.A. (2003). Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J Biol Chem* 278, 23066-23075.
- Yoshida, K., Kim-Mitsuyama, S., Wake, R., Izumiya, Y., Izumi, Y., Yukimura, T., Ueda, M., Yoshiyama, M., and Iwao, H. (2005). Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 28, 447-455.

- Young, M.J. (2008). Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Current opinion in nephrology and hypertension* 17, 174-180.
- Young, M.J., Lam, E.Y., and Rickard, A.J. (2007). Mineralocorticoid receptor activation and cardiac fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 112, 467-475.
- Young, M.J., and Rickard, A.J. (2012). Mechanisms of mineralocorticoid salt-induced hypertension and cardiac fibrosis. *Mol Cell Endocrinol* 350, 248-255.
- Yu, A.L., and Welge-Lussen, U. (2013). Antioxidants reduce TGF-beta2-induced gene expressions in human optic nerve head astrocytes. *Acta ophthalmologica* 91, e92-98.
- Zaika, O., Mamenko, M., Staruschenko, A., and Pochynyuk, O. (2013). Direct Activation of ENaC by Angiotensin II: Recent Advances and New Insights. *Current hypertension reports* 15, 17-24.
- Zamora, R., Vodovotz, Y., and Billiar, T.R. (2000). Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine* 6, 347-373.
- Zannad, F. (1995). Aldosterone and heart failure. *Eur Heart J* 16 Suppl N, 98-102.
- Zaragoza, C., Ocampo, C., Saura, M., Leppo, M., Wei, X.O., Quick, R., Moncada, S., Liew, F.Y., and Lowenstein, C.J. (1998). The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2469-2474.
- Zhang, M., Chen, J., Liu, S., You, L., Lin, S., and Gu, Y. (2009). The role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 in aldosterone-induced glomerulosclerosis in vivo. *Renal failure* 31, 726-735.

- Zhang, R., Khoo, M.S., Wu, Y., Yang, Y., Grueter, C.E., Ni, G., Price, E.E., Jr., Thiel, W., Guatimosim, S., Song, L.S., *et al.* (2005). Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nature medicine* 11, 409-417.
- Zhao, F., Fu, L., Yang, W., Dong, Y., Yang, J., Sun, S., and Hou, Y. (2016). Cardioprotective effects of baicalein on heart failure via modulation of Ca(2+) handling proteins in vivo and in vitro. *Life sciences* 145, 213-223.
- Zhao, G., Gao, H., Qiu, J., Lu, W., and Wei, X. (2010). The molecular mechanism of protective effects of grape seed proanthocyanidin extract on reperfusion arrhythmias in rats in vivo. *Biological & pharmaceutical bulletin* 33, 759-767.
- Zhou, J., Gao, J., Zhang, X., Liu, Y., Gu, S., Zhang, X., An, X., Yan, J., Xin, Y., and Su, P. (2015). microRNA-340-5p Functions Downstream of Cardiotrophin-1 to Regulate Cardiac Eccentric Hypertrophy and Heart Failure via Target Gene Dystrophin. *International heart journal* 56, 454-458.
- Zuo, Y.M., Gao, S., Cao, J.F., Liu, X.Y., Yu, H.J., and Zhang, Y. (2010). Effects of oligomeric grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 45, 565-570.
- Zuo, Y.M., Wang, X.H., Gao, S., and Zhang, Y. (2011). Oligomerized grape seed proanthocyanidins ameliorates isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats: role of oxidative stress. *Phytotherapy research : PTR* 25, 732-739.









**Anexos**

---







## Proanthocyanidins block aldosterone-dependent up-regulation of cardiac gamma ENaC and Nedd4-2 inactivation via SGK1

Adrián Galiana-Simal<sup>a</sup>, Elena Olivares-Álvaro<sup>a</sup>, Mercedes Klett-Mingo<sup>a</sup>, María Belén Ruiz-Roso<sup>a</sup>, Sandra Ballesteros<sup>a</sup>, Natalia de las Heras<sup>a</sup>, Peter J. Fuller<sup>b</sup>, Vicente Lahera<sup>a</sup>, Beatriz Martín-Fernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Hudson Institute of Medical Research, Clayton, VIC 3168, Australia

Received 22 March 2016; received in revised form 10 June 2016; accepted 15 July 2016

### Abstract

Aldosterone plays a central role in the development of cardiac pathological states involving ion transport imbalances, especially sodium transport. We have previously demonstrated a cardioprotective effect of proanthocyanidins in aldosterone-treated rats. Our objective was to investigate for the first time the effect of proanthocyanidins on serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1), epithelial Na<sup>+</sup> channel ( $\gamma$ -ENaC), neuronal precursor cells expressed developmentally down-regulated 4-2 (Nedd4-2) and phosphoNedd4-2 protein expression in the hearts of aldosterone-treated rats. Male Wistar rats received aldosterone (1 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) + 1% NaCl for 3 weeks. Half of the animals in each group were simultaneously treated with the proanthocyanidins-rich extract (80% w/w) (PRO80, 5 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). Hypertension and diastolic dysfunction induced by aldosterone were abolished by treatment with PRO80. Expression of fibrotic, inflammatory and oxidative mediators were increased by aldosterone-salt administration and blunted by PRO80. Antioxidant capacity was improved by PRO80. The up-regulated aldosterone mediator SGK1, ENaC and p-Nedd4-2/total Nedd4-2 ratio were blocked by PRO80. PRO80 blunted aldosterone-mineralocorticoid-mediated up-regulation of ENaC provides new mechanistic insight of the beneficial effect of proanthocyanidins preventing the cardiac alterations induced by aldosterone excess.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Proanthocyanidins; Aldosterone; Mineralocorticoid receptor; Cardiac hypertrophy; SGK1; ENaC; Nedd4-2

### 1. Background

Cardiac ion transport, especially sodium transport, plays an important role in many cardiac pathological states, including cardiac hypertrophy and heart failure [1–4]. For instance, it has been proven that contractile cardiac function is very sensitive to changes in the transmembrane sodium gradient [5,6].

It is well known that aldosterone plays a central role in the development of the aforementioned cardiac pathological states involving ion transport imbalances [7,8]. Aldosterone induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) expression in the renal tubular epithelial cells [9]. Previously, we demonstrated that SGK1 mRNA is also overexpressed in the heart of aldosterone-treated rats [10]. SGK1 triggers a cascade that leads to the absorption of sodium through the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC). ENaC is a heteromultimeric membrane protein composed of three homologous subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) [11]. To date, SGK1 regulation of ENaC has been demonstrated in cortical collecting duct cells, A6 cells, respiratory epithelial cells and neurons [12,13]. Coexpres-

sion of both SGK1 and ENaC proteins has been found in epithelial cells of the inner ear and in human adrenocortical cells; however, its expression and function in nonepithelial cells are poorly described [14].

SGK1 regulates sodium absorption indirectly by phosphorylating the ubiquitin ligase neuronal precursor cells expressed developmentally down-regulated 4-2 (Nedd4-2) [15,16]. Nedd4-2 ubiquitinates ENaC, thus preparing the channel protein for clearance from the cell membrane and subsequent degradation. SGK1 phosphorylation of Nedd4-2 fosters an interaction with the chaperone protein 14-3-3, precluding Nedd4-2-dependent target ubiquitination and as consequence, Nedd4-2 is cleared from the cell membrane and degraded [14,16].

Proanthocyanidins are a large family of phenolic bioactive compounds which have shown several beneficial effects in cardiovascular diseases [17–19]. We have previously demonstrated a cardioprotective effect of proanthocyanidins in aldosterone-treated rats [20]. Proanthocyanidin treatment improved cardiac function and decreased oxidative stress, inflammation and fibrosis in a cardiac disease model induced by aldosterone. Also, proanthocyanidins were able to decrease aldosterone-induced mineralocorticoid receptor (MR)-mediated transactivation in cells transiently transfected with the MR. The results led us to hypothesize that proanthocyanidins had a role as an MR antagonist in this cardiac disease model.

Following this line of investigation, in the present study, we aimed to explore in greater depth the mechanisms involved in the

\* Corresponding author: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain. Tel.: +34-91-394-1490; fax: +34-91-394-1628.

E-mail address: [bmartinfernandez@med.ucm.es](mailto:bmartinfernandez@med.ucm.es) (B. Martín-Fernández).