

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
Departamento de Fisiología



**TESIS DOCTORAL**

**Papel de las especies reactivas de oxígeno en la función endotelial renal  
y en la disfunción endotelial asociada a la obesidad**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Mercedes Muñoz Picos**

**Directores**

**Dolores Prieto Ocejo  
Albino García Sacristán  
Rafaela Raposo González**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE  
OXÍGENO EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL  
RENAL Y EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL  
ASOCIADA A LA OBESIDAD**

**TESIS DOCTORAL**

**D.<sup>a</sup> Mercedes Muñoz Picos**

**DIRECTORES**

Prof. Dra. Dolores Prieto Ocejo  
Prof. Dr. Albino García Sacristán  
Dra. Rafaela Raposo González

**MADRID, 2017**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

Los doctores Dolores Prieto Ocejo, Catedrática, Albino García Sacristán, Catedrático, y Rafaela Raposo González, Profesora Contratado Doctor de la Sección Departamental de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup> Mercedes Muñoz Picos, Licenciada en Farmacia y Máster en Análisis Sanitarios, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado “Papel de las especies reactivas de oxígeno en la función endotelial renal y en la disfunción endotelial asociada a la obesidad” como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Abril de 2017

Prof. Dra. Prieto Ocejo

Prof. Dr. García Sacristán

Dra. Raposo González



A mis padres, mis hermanos y Óscar



*“El éxito es fácil de obtener. Lo difícil es merecerlo.”*

Albert Camus



## AGRADECIMIENTOS

Llega el momento de agradecer a todas las personas que me han acompañado a lo largo de este duro, pero gratificamente proyecto. En el año 2011 me embarqué en esta aventura gracias a Fali que en ese momento me impartía clases del Máster. Desde hace ya muchos años, mi ilusión era poder investigar y así aportar mi granito de arena en el cuidado de los ciudadanos como profesional sanitario que soy.

En primer lugar, agradecer a mis directores de Tesis, la Dra. Rafaela Raposo González por haberme brindado la oportunidad de introducirme en el ámbito de la investigación, el Prof. Dr. Albino García Sacristán por acogerme en el Departamento y hacerme sentir una más del equipo y me gustaría realizar una mención especial a la Prof Dra. Dolores Prieto Ocejo que ha sido mi guía durante todo el camino, apoyándome, animándome e incluso a sufrir conmigo la recta final de esta Tesis Doctoral. ¡Lo conseguimos!

En segundo lugar, me gustaría darle las gracias a la Dra. Ana Sánchez Pina, a la que considero mi tutora por haberme enseñado y tener tantísima paciencia para ello, además de llevarme a una amiga conmigo. ¡Muchas gracias por estar ahí!

Como no, después de haberme dejado utilizar el despacho cuando lo he necesitado, gracias a las Dras. Paz Recio Visedo y Belén Climent Flórez por también escucharme y cuidarme en mis agobios y mis carreras por llegar a todos lados a tiempo.

A la Dra. María Pilar Martínez del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológicas de la Facultad de Veterinaria de la UCM por su colaboración con su gran trabajo inmunohistoquímico que realiza para que nuestros trabajos cuenten con esas imágenes maravillosas y tan ilustrativas.

A la Dra. Elvira López-Oliva, experta en la técnica del Western Blott, siempre tan dispuesta a ayudar y participar en los proyectos, obteniendo resultados magníficos a pesar de las dificultades que tuviste con las arterias renales al principio. ¡Siempre encuentras solución a las objeciones!

Por supuesto, me gustaría también agradecer a todos los profesores que forman parte de este Departamento, el Prof. Dr. Luis Rivera de los Arcos, la Dra. Sara Benedito Castellote, el Dr. Medardo Vicente Hernández Rodríguez, la Dra. Cristina Martínez Gómez y el Dr. Ángel Agis Torres, porque sin ellos no hubiera sido posible alcanzar el objetivo. Me alegro de tener un apoyo futbolístico, Tito y Sara y Cris, gracias por esos pocos minutos en el cuarto de sacrificio en los que compartíamos conocimientos y palabras de apoyo.

Además, no me olvido de los doctorandos Estéfano Pinilla y Claudia Rodríguez por participar conmigo en la investigación y espero que podamos seguir haciéndolo. Alejandro, gracias por esas risas a primera hora de la mañana que sientan tan bien. ¡Muchos ánimos chicos en vuestro trayecto!

Por otro lado, agradecer a los portus, ya doctores y grandes personas, Ana Sofi y Vítor por esos ánimos, siempre dispuestos a ayudarte y facilitarte el trabajo y más cuando a ellos les había supuesto un gran esfuerzo.

A Macarena Martín Zapatero, Teresa Moreno Plaza, María Antonia López Valles, Manuel Perales Calvo y Francisco Puente Maya, por mantener el Laboratorio en condiciones y que dispongamos del material necesario para trabajar. En este apartado, quiero resaltar mis agradecimientos a Maca, Manolo y Paquito que realmente han compartido más momentos conmigo y han estado a mi lado para que esta Tesis saliera adelante y no me rindiera.

Para terminar, agradecer a mis padres y hermanos, ese apoyo incondicional para luchar y conseguir dedicarme a lo que verdaderamente me gusta. Ellos saben lo que me apasiona la investigación y el gran sacrificio que me está suponiendo. En estos momentos en los que la inversión en I+D brilla por su ausencia, he tenido que desarrollar mi Tesis compaginando con trabajo, una situación que en muchos momentos me ha superado afectándome incluso a mi salud. ¡Muchas gracias por ser mi familia!

Finalmente, y no por ello menos importante, agradecer a Óscar por estar a mi lado de principio a fin, compartiendo mis alegrías, mis penas y mis agobios y siempre teniendo palabras positivas para hacerme feliz, animarme y luchar juntos por esto. A día de hoy puedo decir, que sino hubiera sido por él, no hubiera cumplido los plazos ni de lejos. Varias noches hemos estado juntos trabajando en esta Tesis Doctoral, que gran parte se la debo a él y por este motivo se la dedico con todo mi cariño. ¡MILLONES DE GRACIAS Y SABES QUE TE QUIERO MUCHÍSIMO!



Este trabajo de investigación ha sido financiado gracias a los Proyectos SAF2009-10448 del Ministerio de Ciencia e Innovación y SAF 2012-31631 del Ministerio de Economía y Competitividad, cuya investigadora principal es la Prof. Dra. Dolores Prieto Ocejo.



## ÍNDICE



<b>SUMMARY</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1 REGULACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO RENAL</b> .....	<b>25</b>
1.1.1 Autorregulación del flujo sanguíneo renal.....	29
1.1.2 Regulación neurohumoral del flujo sanguíneo renal.....	31
1.1.3 Regulación local del flujo sanguíneo renal.....	32
1.1.3.1 Regulación del flujo sanguíneo renal por prostaglandinas .....	34
1.1.3.2 Regulación del flujo sanguíneo renal por derivados de las CYP.....	39
<b>1.2 ENDOTELIO VASCULAR</b> .....	<b>44</b>
1.2.1 Función endotelial.....	44
1.2.1.1 Óxido Nítrico.....	45
1.2.1.2 Peróxido de hidrógeno .....	55
1.2.1.3 Prostanoides.....	57
1.2.1.4 Endotelina-1 .....	58
1.2.2 Disfunción endotelial y enfermedad vascular.....	59
<b>1.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)</b> .....	<b>69</b>
1.3.1 Generación y metabolismo de las ROS en la pared vascular .....	70
1.3.2 ROS y riñón.....	79
1.3.3 Estrés oxidativo y función vascular renal.....	79
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>93</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>97</b>
<b>3.1 CYP epoxygenase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries</b> .....	<b>99</b>
<b>3.2 COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats</b> .....	<b>119</b>

<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>135</b>
<b>4.1 PAPEL DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL RENAL.....</b>	<b>137</b>
4.1.1 Papel del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la vasodilatación endotelial renal.....	138
4.1.2 Mecanismos de las acciones vasculares renales del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	139
4.1.3 La implicación del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> derivado de la CYP en la vasodilatación dependiente del endotelio de las arterias renales.....	141
<b>4.2 PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISFUNCIÓN EDOTELIAL ASOCIADA A LA OBESIDAD.....</b>	<b>144</b>
4.2.1 Disfunción endotelial renal y fuentes de estrés oxidativo en la obesidad genética	144
4.2.2 Papel de la COX-2 en el estrés oxidativo y la disfunción endotelial renal .....	146
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>159</b>

## **SUMMARY**



## **ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN RENAL ENDOTHELIAL FUNCTION AND IN OBESITY-ASSOCIATED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION**

Besides its role in the pathogenesis of vascular disease, reactive oxygen species (ROS) can act as physiological signalling molecules in the vascular wall, and ROS like peroxide ( $H_2O_2$ ) are involved in the in endothelium-derived hyperpolarization (EDH) relaxant responses of coronary and mesenteric arterioles, where in it is released in response to flow or agonists (Matoba et al., 2000; Matoba et al., 2003). The role of ROS in kidney vascular function has mainly been investigated in the context of harmful NADPH oxidase- and mitochondria-derived ROS generation in diabetes and obesity-associated kidney disease (Sharma, 2015). A substantial fraction of the endothelium-dependent vasodilatation of renal arteries is mediated by a non-nitric oxide (NO), non-prostanoid relaxing factor released from the endothelium (Büssemaker et al., 2003), whose nature remains to be elucidated.

Obesity is a worldwide public health problem of increasing prevalence nowadays, associated with the development of insulin resistance, hypertension, dislipidemia and type 2 diabetes, jointly referred to as metabolic syndrome. Obesity and metabolic syndrome increase the risk of diabetic complications such as nephropathy and chronic kidney disease (CKD). However, recent epidemiological studies suggest that CKD can develop in non-diabetic obese individuals, and obesity represents a risk factor of CKD independent of diabetes, hypertension and other comorbidities (De Vries et al., 2014).

Both cyclooxygenase 1 (COX-1) and COX-2 are constitutively expressed in the kidney and COX-2 derivatives play an essential role in renal hemodynamics and kidney tubular function (Imig, 2006). COX-2 has been involved in the renal inflammatory response in obesity and COX-2 expression is increased in renal microvessels, kidney cortex and glomeruli and associated to renal injury (Dey et al., 2004a). Treatment with COX-2 inhibitors decreased renal expression of proinflammatory cytokines, reduced albuminuria and ameliorated glomerulosclerosis in the obese kidney (Dey et al., 2004a), and these agents also reduced expression of renal injury mediators in experimental models of diabetes and hypertension. It's well established that oxidative stress is the common link for the major pathogenic pathways involved in the development of the micro- and macrovascular complications in

diabetes including diabetic nephropathy. However, the specific contribution of COX-2 to oxidative stress renal endothelial dysfunction in obesity has not yet fully been addressed.

### AIMS

This study sought to assess the role of ROS in renal endothelial function and the involvement of oxidative stress in obesity-associated endothelial dysfunction. The specific aims of the study were the following:

1. To assess whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-dependent responses of intrarenal arteries.
2. To determine the endothelial sources of ROS generation involved in the relaxant responses of renal arteries.
3. To characterize the mechanisms of action of ROS like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in both renal endothelium and vascular smooth muscle (VSM).
4. To investigate endothelial dysfunction and sources of oxidative stress in a rat model of genetic obesity/metabolic syndrome.
5. To determine whether COX-2 is involved in oxidative stress and endothelial dysfunction in renal arteries in obesity.

### METHODS

Renal interlobar arteries isolated from the kidney of Wistar rats for the functional studies, and obese Zucker rats (OZR), a model of genetic obesity/metabolic syndrome and their lean counterparts lean Zucker rats (LZR), were mounted in microvascular myographs to assess function. Superoxide ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production were measured by chemiluminescence and fluorescence, respectively. Antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase -Gpx-, CuZn- and MnSOD), CYP2C11 and CYP2C23 enzymes and COX-2 were detected by Western blotting and by immunohistochemistry. K<sup>+</sup> currents were measured in isolated renal endothelial cells by patch-clamp electrophysiology. Intracellular calcium [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in VSM was measured by FURA-2 ratio-fluorometry.

## RESULTS

Under conditions of cyclooxygenase (COX) and nitric oxide (NO) synthase inhibition, acetylcholine (ACh) induced relaxations and stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release that were reduced in the presence of catalase in rat renal interlobar arteries, suggesting the involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the endothelium-dependent responses. ACh relaxations were also blunted by the CYP2C inhibitor sulfaphenazole and by the NADPH oxidase inhibitor apocynin. Acetylcholine stimulated both •O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production that were reduced by sulfaphenazole and apocynin. Levels of expression of the antioxidant enzyme CuZn-SOD were similar in intrarenal arteries and renal cortex. On the other hand, exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaxed renal arteries by decreasing VSM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and markedly enhanced endothelial K<sub>Ca</sub> currents in freshly isolated renal endothelial cells. CYP2C11 and CYP2C23 epoxygenases were highly expressed in interlobar renal arteries and renal cortex, respectively, and were co-localized with eNOS in renal endothelial cells.

In the present study, the specific relationships between ROS, COX-2 and endothelial dysfunction in renal interlobar arteries were further assessed in OZR. Relaxations to ACh were significantly reduced in renal arteries from OZR compared to their counterpart, the LZR, suggesting endothelial dysfunction. Blockade of COX with indomethacin and with the selective blocker of COX-2 restored the relaxations to ACh in obese rats. Selective blockade of the TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (TP) receptor enhanced ACh relaxations only in OZR, while inhibition of the prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) receptor (IP) enhanced basal tone and inhibited ACh vasodilator responses only in LZR. Basal production of superoxide was increased in arteries of OZR and involved NADPH and xanthin oxidase activation and NOS uncoupling. Under conditions of NOS blockade, ACh induced vasoconstriction and increased ROS generation that were augmented in arteries from OZR and blunted by COX-2 inhibition and by the ROS scavenger tempol. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evoked both endothelium- and VSM-dependent contractions, as well as ROS generation that was reduced by COX-2 inhibition. In addition, COX-2 expression was enhanced in both VSM and endothelium of renal arteries from OZR.

## CONCLUSIONS

1. These results demonstrate that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the EDH-type relaxant responses of renal arteries.
2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates K<sup>+</sup> currents in renal endothelial cells thus initiating an EDH response further spread to VSM.
3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaxes renal VSM through both calcium dependent and calcium-independent mechanisms.
4. CYP2C epoxygenases are physiologically relevant endothelial sources of vasodilator H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the kidney.
5. Intrarenal arteries exhibit endothelial dysfunction in obese rats associated to increased oxidative stress derived from NADPH oxidases, xanthin oxidase and uncoupled NOS.
6. Increased COX-2-dependent vasoconstriction contributes to renal endothelial dysfunction through enhanced ROS generation in obesity. COX-2 activity is in turn upregulated by ROS.

*Key words:*

Key words: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, endothelium, renal arteries, cytochrome P450 (CYP), endothelium-derived-hyperpolarization (EDH), obesity, COX-2, endothelial dysfunction, oxidative stress

**RESUMEN**



## **PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL RENAL Y EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA OBESIDAD**

Además de su papel en la patogénesis de la enfermedad vascular, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden actuar como moléculas de señalización fisiológica en la pared vascular, y ROS como el  $H_2O_2$  están implicadas en las respuestas relajantes mediadas por la hiperpolarización derivada del endotelio (EDH) de arteriolas coronarias y mesentéricas, donde se libera en respuesta al flujo o a agonistas (Matoba et al., 2000; Matoba et al., 2003). El papel de las ROS en la función vascular renal ha sido investigado en el contexto perjudicial de la generación de ROS derivadas de NADPH oxidasa y mitocondria en diabetes y enfermedad renal asociada a obesidad (Sharma, 2015). Una fracción sustancial de la vasodilatación dependiente del endotelio de arterias renales está mediada por el factor relajante no-óxido nítrico (NO), no-prostanoide liberado por el endotelio (Büssemaker et al., 2003), cuya naturaleza aún se desconoce.

La obesidad es un problema mundial de salud pública cuya prevalencia continúa aumentando en la actualidad, asociada con el desarrollo de la resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia y diabetes tipo 2, conocidos en su conjunto como síndrome metabólico. La obesidad y el síndrome metabólico aumentan el riesgo de complicaciones diabéticas como la nefropatía y la enfermedad renal crónica (ERC). Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes sugieren que la ERC puede desarrollarse en individuos obesos no diabéticos, y la obesidad representa un factor de riesgo de ERC independiente de la diabetes, la hipertensión y otras comorbilidades (De Vries et al., 2014).

Tanto la ciclooxigenasa 1 (COX-1) como la COX-2 se expresan constitutivamente en el riñón y los derivados de la COX-2 juegan un papel esencial en la función hemodinámica renal y en la función tubular renal (Imig, 2006). La COX-2 ha sido implicada en la respuesta inflamatoria renal en la obesidad y la expresión de la COX-2 aumenta en microvasos renales, corteza renal y glomérulos y se asocia a insuficiencia renal (Dey et al., 2004a). El tratamiento con inhibidores de la COX-2 disminuyó la expresión renal de citoquinas proinflamatorias, redujo la albuminuria y mejoró la glomeruloesclerosis en el riñón obeso (Dey et al., 2004a), y estos agentes

también redujeron la expresión de mediadores de lesiones renales en modelos experimentales de diabetes e hipertensión. Está claramente definido que el estrés oxidativo es el eslabón común entre las principales vías patógenas implicadas en el desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares en la diabetes, incluyendo la nefropatía diabética. Sin embargo, la contribución específica de la COX-2 al estrés oxidativo y a la disfunción endotelial renal en la obesidad aún no ha sido determinada.

### OBJETIVOS

Este estudio pretendió evaluar el papel de las ROS en la función endotelial renal y la participación del estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada a obesidad. Los objetivos específicos del estudio fueron los siguientes.

1. Evaluar si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está implicado en las respuestas derivadas del endotelio de arterias intrarrenales.
2. Determinar las fuentes endoteliales de generación de ROS implicadas en las respuestas relajantes de arterias renales.
3. Caracterizar los mecanismos de acción de las ROS como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto en el endotelio como en el músculo liso vascular (MLV) renal.
4. Investigar la disfunción endotelial y las fuentes del estrés oxidativo en un modelo de rata de obesidad genética/síndrome metabólico.
5. Determinar si la COX-2 está involucrada en el estrés oxidativo y la disfunción endotelial en arterias renales en la obesidad.

### MÉTODOS

Las arterias interlobares renales aisladas del riñón de ratas Wistar para los estudios funcionales y las ratas Zucker obesas (RZO), un modelo de obesidad genética y síndrome metabólico y sus homólogas controles ratas Zucker lean (RZL), se montaron en miógrafos microvasculares para evaluar la función. La producción de superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midió por quimioluminiscencia y fluorescencia, respectivamente. Las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa -Gpx-, CuZn- y MnSOD), las enzimas CYP2C11 y CYP2C23 y COX-2 se detectaron mediante Western Blott e inmunohistoquímica. Las corrientes de K<sup>+</sup> se midieron en células endoteliales renales aisladas mediante la técnica de electrofisiología de patch clamp. El calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el MLV se midió mediante fluorimetría-relación FURA-2.

## RESULTADOS

En condiciones de inhibición de la ciclooxigenasa (COX) y NO sintasa, la acetilcolina (ACh) indujo relajaciones y estimuló la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se redujeron en presencia de catalasa en las arterias interlobares renales de rata, sugiriendo la implicación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las respuestas endoteliales. Las relajaciones de ACh también fueron inhibidas por el inhibidor CYP2C sulfafenazol y por el inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina. La ACh estimuló la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se redujeron con sulfafenazol y apocinina. Los niveles de expresión de la enzima antioxidante CuZn-SOD fueron similares en las arterias intrarrenales y en la corteza renal. Por otra parte, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno relajó las arterias renales disminuyendo la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el MLV y aumentó de forma significativa las corrientes de K<sub>Ca</sub> endotelial en células endoteliales renales aisladas frescas. Las epoxigenasas CYP2C11 y CYP2C23 se expresaron altamente en las arterias renales interlobares y en la corteza renal, respectivamente, y se co-localizaron con eNOS en células endoteliales renales.

En el presente estudio, las relaciones específicas entre las ROS, COX-2 y la disfunción endotelial en las arterias interlobares renales se evaluaron adicionalmente en RZO. Las relajaciones a la ACh se redujeron significativamente en las arterias renales de RZO en comparación con su control, la RZL, indicando disfunción endotelial. El bloqueo de COX con indometacina y con el inhibidor selectivo de COX-2 restauraron las relajaciones en respuesta a la ACh en ratas obesas. El bloqueo selectivo del receptor TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (TP) mejoró las relajaciones inducidas por ACh sólo en RZO, mientras que la inhibición del receptor de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (IP) aumentó el tono basal e inhibió las respuestas vasodilatadoras de ACh únicamente en RZL. La producción basal de  $\bullet\text{O}_2^-$  se incrementó en las arterias de RZO implicando la activación de la NADPH y xantina oxidasa (XO) y NOS desacoplada. En condiciones de inhibición de la NOS, la ACh produjo vasoconstricción y aumento de la generación de ROS que fue mayor en las arterias de RZO y reducido por la inhibición de COX-2 y por el *scavenger* de ROS tempol. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generó contracciones dependientes del endotelio y del MLV, así como la generación de ROS que se redujo por la inhibición de la COX-2. Además, la expresión de COX-2 fue mayor tanto en el MLV como en el endotelio de las arterias renales de RZO.

## CONCLUSIONES

1. El  $H_2O_2$  está implicado en las respuestas relajantes de tipo EDH en arterias renales.
2. El  $H_2O_2$  activa corrientes de  $K^+$  en células endoteliales renales iniciando así una respuesta EDH extendida posteriormente al MLV.
3. El  $H_2O_2$  relaja el MLV renal a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de calcio.
4. Las epoxigenasas CYP2C son fuentes fisiológicamente relevantes del  $H_2O_2$  vasodilatador en el riñón.
5. Las arterias intrarrenales presentan disfunción endotelial en ratas obesas asociada al incremento del estrés oxidativo derivado de NADPH oxidasas, XO y NOS desacoplada.
6. El aumento de la vasoconstricción dependiente de la COX-2 contribuye a la disfunción endotelial renal mediante la generación de ROS en la obesidad. La actividad de la COX-2 es a su vez regulada al alza por las ROS.

*Palabras clave:*

$H_2O_2$ , endotelio, arterias renales, citocromo P450 (CYP), hiperpolarización derivada del endotelio (EDH), obesidad, COX-2, disfunción endotelial, estrés oxidativo

**ABREVIATURAS**

ACh	Acetilcolina
ADMA	Dimetil arginina asimétrica
ADP	Adenosín difosfato
ADRF	Factor relajante derivado de adipocito
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
Ang II	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético atrial
AP-1	Proteína activadora-1
APPL1	Proteína adaptadora
AT1	Receptor de angiotensina II tipo 1
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BK <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
BH4	Tetrahidrobiopterina
BMP4	Proteína morfogénica ósea 4
BNP	Péptido natriurético cerebral
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
CAD	Cardiopatía coronaria

cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CAT-1	Transportador de aminoácidos catiónico 1
CDC	Centros para el control y prevención de enfermedades
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	Ión bicarbonato
COX	Ciclooxigenasa
CPA	Ácido ciclopiazónico
cPGES	Enzima de síntesis de prostaglandina E citosólica
cPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> dependiente de calcio
CSF-1	Factor estimulante de colonias 1
Cu	Cobre
CYP	Citocromo
CYP450	Citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
DHETE	Ácido dihidroxiecosatetraenoico
DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
DPI	Difenilen iodonio
DPP4	Dipeptidil peptidasa-4
ECA	Enzima convertora de angiotensina

EDCF	Factor contráctil derivado del endotelio
EDH	Hiperpolarización derivada del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
ENaC	Canal de Na <sup>+</sup> epitelial
eNOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico endotelial
ER $\alpha$	Receptor de estrógeno $\alpha$
ERC	Enfermedad renal crónica
ET	Endotelina
Fe <sup>3+</sup>	Ión hierro
FGR	Filtración glomerular
FMD	Dilatación mediada por flujo
FPR	Flujo plasmático renal
FSR	Flujo sanguíneo renal
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GRK2	Proteína quinasa 2 acoplada a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
GTPCH I	Guanosín trifosfato ciclohidrolasa I
5-HT	Serotonina
H <sup>+</sup>	Hidrogeniones
HDL	Proteína de alta densidad

HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HIF	Factor inducible por hipoxia
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HOCl	Ácido hipocloroso
H-PGDS	Enzima de síntesis de prostaglandina D hematopoyética
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de hidrógeno
HSP	Proteína de choque térmico
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IFN $\gamma$	Interferón $\gamma$
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Receptor de prostaciclina
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
iPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> independiente de calcio
IRI	Insuficiencia por isquemia-reperfusión
IRS	Sustrato de insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
K <sup>+</sup>	Ión potasio
K <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por calcio
Keap-1	Proteína asociada a ECH-1 de tipo Kelch
KLF2	Factor 2 de tipo Krüppel
KPSS	Solución salina fisiológica rica en potasio

LDL	Proteína de baja densidad
LKB1	Quinasa hepática B1
L-NOARG	N $\omega$ -Nitro-L-arginina
LPS	Endotoxinas
LRA	Lesión renal aguda
L-PGDS	Enzima de síntesis de prostaglandina D de tipo lipocalina
LOX	Lipooxigenasa
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MC1	Melanocortina 1
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos 2
MLV	Músculo liso vascular
Mn	Manganeso
mPGES1	Enzima de síntesis 1 de prostaglandina E microsomal
mPGES2	Enzima de síntesis 2 de prostaglandina E microsomal
MR	Receptor de mineralocorticoide
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
Na <sup>+</sup>	Ión sodio

NaCl	Cloruro sódico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NFR-1	Factor nuclear respiratorio 1
NFR-2	Factor nuclear eritroide 2
NHE	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
NOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico
Nox	NADPH oxidasa
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
•OH	Anión hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Anión peroxinitrito
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
PDK-1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PG	Prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGDS	Enzima de síntesis de prostaglandina D
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGES	Enzima de síntesis de prostaglandina E
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>

PGFS	Enzima de síntesis de prostaglandina F
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina I <sub>2</sub>
PGIS	Enzima de síntesis de prostaciclina
phox	Fagocito oxidasa
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PKC $\beta$	Proteína quinasa C- $\beta$
PKG	Proteína quinasa G
PKG <sub>1<math>\alpha</math></sub>	Proteína quinasa G <sub>1<math>\alpha</math></sub>
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PPAR $\delta$	Receptor de peroxisoma proliferador activado $\delta$
PPAR $\gamma$	Receptor de peroxisoma proliferador activado $\gamma$
PSS	Solución salina fisiológica
PTCs	Células de túbulo proximales
PTX3	Pentraxina 3
PVAT	Tejido adiposo perivascular
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

RAGE	Receptor de productos finales de glicosilación avanzada
RANTES	Citoquina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación
RE	Retículo endoplasmático
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RVR	Resistencia vascular renal
RZL	Rata zucker lean
RZO	Rata zucker obesa
S1P	Esfingosina 1-fosfato
sEH	Hidrolasa epóxido soluble
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del retículo endoplásmico-sarcoplásmico
sGC	Guanilil ciclasa soluble
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SM	Síndrome metabólico
SOD	Superóxido dismutasa
STIM1	Molécula de interacción con el estroma 1
Tfam	Factor de transcripción mitocondrial A
TGF-β	Factor de crecimiento β
TLR4	Receptor de tipo Toll 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TP	Receptor de tromboxano

TRPV	Receptor de potencial transitorio endotelial
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UCP2	Proteína-2 desacoplada
Up4A	Uridina adenosina tetrafosfato
UPR	Respuesta proteica desacoplada
URAT1	Transportador de urato 1
UV	Luz ultravioleta
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores
VDR	Receptor de vitamina D
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WKY	Wistar Kyoto
XO	Xantina oxidasa
Zn	Zinc



## **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 1.1 REGULACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO RENAL

Los riñones son órganos que realizan tanto una función excretora como reguladora en la homeostasis, aunque su función excretora es crucial para la regulación de la composición y el volumen de los líquidos corporales. Los riñones participan en el control de la osmolalidad y el volumen del líquido extracelular, el equilibrio de los electrolitos y el equilibrio acidobásico.

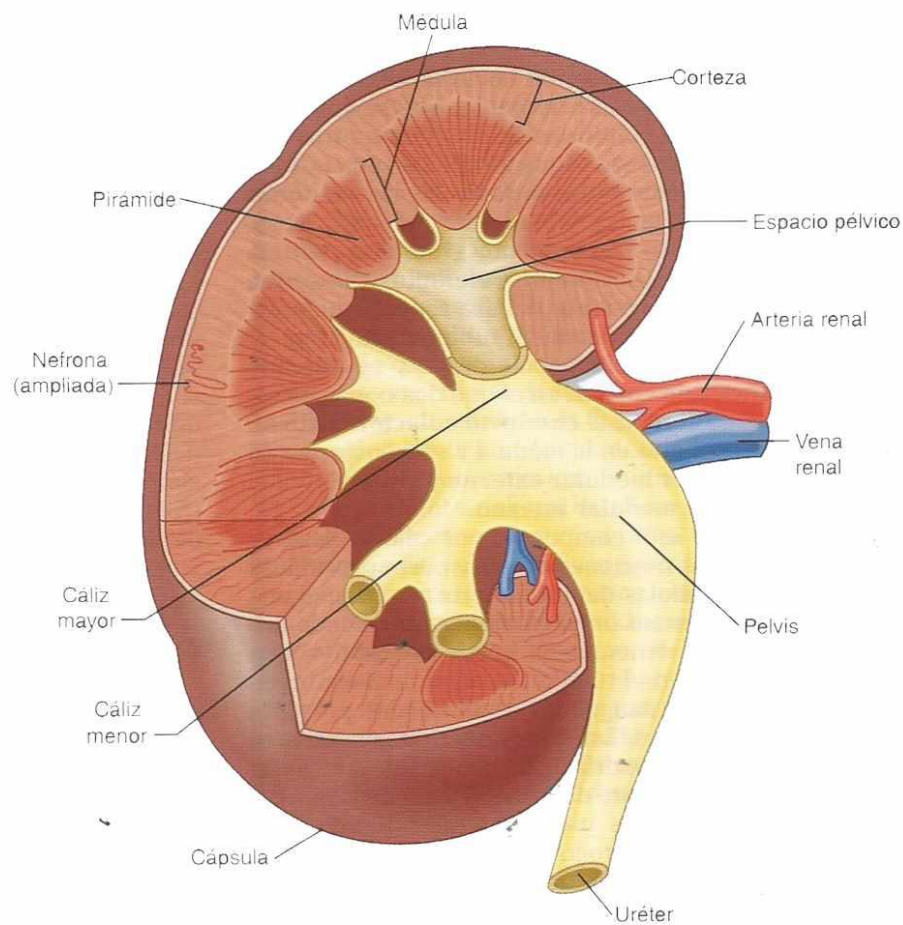
Mientras que el control de la osmolalidad de los líquidos corporales es importante para el mantenimiento del volumen celular en todos los tejidos del organismo, el control del volumen es necesario para el funcionamiento normal del sistema cardiovascular. Los riñones también son esenciales para regular la cantidad de diversos iones inorgánicos importantes en el organismo, incluyendo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , bicarbonato ( $\text{CO}_3\text{H}^-$ ), hidrogeniones ( $\text{H}^+$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ). La excreción de estos electrolitos debe ser igual a su ingesta diaria, para mantener el equilibrio adecuado. Si la ingesta de un electrolito excede su excreción, su cantidad en el organismo se incrementará, y el sujeto tendrá un equilibrio positivo para este electrolito. Por el contrario, si la excreción de un electrolito supera la ingesta, su cantidad en el organismo se reducirá, y el sujeto presentará un equilibrio negativo para ese electrolito. Los riñones son la única o la principal vía de excreción del organismo de muchos electrolitos.

Otra función importante de los riñones es la regulación del equilibrio acidobásico. Muchas de las funciones metabólicas del organismo son sensibles al pH. Por ello, el pH de los líquidos corporales debe mantenerse entre unos límites estrechos. El pH se mantiene mediante los tampones de los líquidos corporales y la acción coordinada de pulmones, hígado y riñones (Barrett et al., 2010).

Además, los riñones excretan productos del catabolismo proteico entre los que se incluyen urea (de los aminoácidos), ácido úrico (de los ácidos nucleicos), creatinina (de la creatina muscular), productos finales del metabolismo de la hemoglobina y metabolitos de las hormonas, así como también sustancias extrañas como fármacos, pesticidas y otros compuestos químicos.

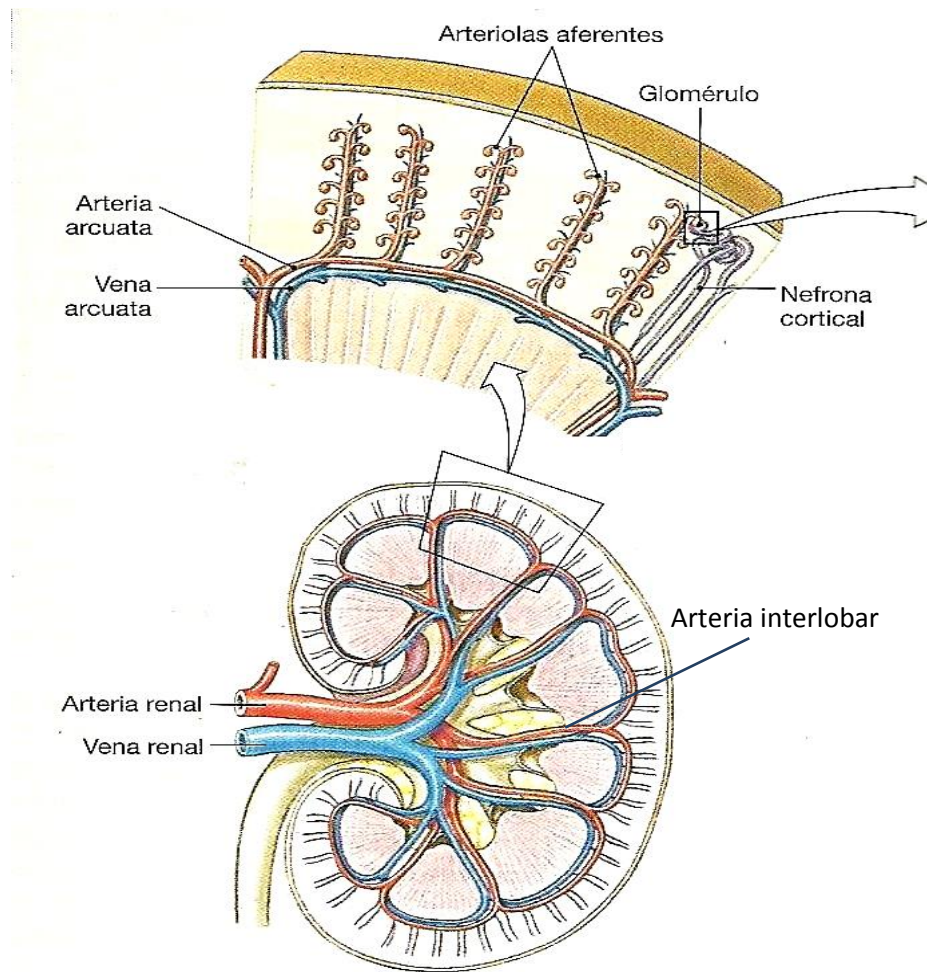
Finalmente, los riñones son importantes órganos endocrinos que producen y segregan hormonas, entre ellas, renina, calcitriol y eritropoyetina. La renina activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona, que ayuda a regular la presión sanguínea y el equilibrio  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ . El calcitriol, un metabolito de la vitamina  $\text{D}_3$ , es necesario para la absorción normal del calcio en el tracto gastrointestinal y para su depósito en el hueso. Por último, la eritropoyetina estimula la formación de eritrocitos por la médula ósea.

Los riñones son órganos dobles que se sitúan en la pared abdominal posterior por detrás del peritoneo, a ambos lados de la columna vertebral. La cara medial de cada riñón contiene una hendidura a través de la cual pasan la arteria y la vena renal, los nervios y la pelvis. Si se corta un riñón por la mitad se observan dos regiones: una región externa o corteza, y una región interna, la médula. La corteza y la médula se componen de nefronas, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La médula en el riñón humano se divide en áreas cónicas denominadas pirámides renales. La base de cada pirámide se origina en el límite corticomedular, y el ápex termina en una papila que reposa dentro de un cáliz menor. Los cálices menores recogen la orina de cada papila. Los numerosos cálices menores se expanden en dos o tres bolsas abiertas, los cálices mayores. Los cálices mayores terminan en la pelvis. La pelvis representa el extremo abierto y extendido del uréter, que lleva la orina de la pelvis renal a la vejiga urinaria. Las paredes de cálices, pelvis y uréter contienen músculo liso, que se contrae para propulsar la orina hacia la vejiga urinaria.



**Figura 1.** Corte de un riñón humano que muestra su estructura interna. Tomado de Marsh (1983) y Barrett et al., (2010).

El flujo sanguíneo a los dos riñones es equivalente al 25% del gasto cardíaco (1,25 l/min) en los individuos en reposo. Las ramas de las arterias renales progresivamente forman la arteria interlobar, arteria arcuata, arteria interlobular y las arteriolas aferentes, que forman los capilares glomerulares (glomérulo). Los capilares glomerulares se reúnen en la arteriola eferente que conduce a la formación de una segunda red de capilares, los capilares peritubulares, los cuales aportan la sangre a la nefrona. Los capilares del sistema venoso discurren paralelos a los vasos arteriales y, progresivamente, forman la vena interlobar, vena arcuata, vena interlobular y vena renal cuyo curso transcurre al lado del uréter (Barrett et al., 2010).



**Figura 2.** Anatomía renal microvascular. Pequeños vasos derivados de ramas de la arteria renal forman arterias interlobulares, arcuatas y arterias interlobulillares, que se convierten en arteriolas aferentes suministrando sangre al glomérulo. Adaptado de Barrett et al., (2010).

La unidad funcional del riñón es la nefrona y cada riñón humano contiene aproximadamente 1,2 millones de nefronas. La nefrona se compone de corpúsculo renal, túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y sistema de conductos colectores (se considera parte de la nefrona por simplicidad aunque no forma parte de la nefrona en realidad). El corpúsculo renal se compone de los capilares glomerulares y la cápsula de Bowman. El túbulo proximal forma al inicio varias curvas a las que sucede un segmento recto que desciende hacia la médula. El siguiente segmento es el asa de Henle, que se compone de una parte recta a continuación del túbulo proximal, el asa descendente delgada (que termina en una horquilla), el asa ascendente delgada (sólo en las neuronas con largas asas de Henle), y el asa ascendente gruesa. Casi al terminar el asa ascendente gruesa, el túbulo pasa entre las arteriolas aferente y eferente de la misma nefrona. Este corto segmento del asa ascendente gruesa se denomina mácula densa. El túbulo distal comienza un poco más allá de la mácula densa y se extiende

hasta un punto en la corteza en el que dos o más nefronas se unen para formar el túbulo colector cortical. Este conducto penetra en la médula y se transforma en el túbulo colector medular externo y, después, en el túbulo colector medular interno. Las acciones coordinadas de los diferentes segmentos de la nefrona determinan la cantidad de una sustancia que aparecerá en la orina. Se realizan tres procesos principales: la filtración glomerular, la reabsorción de sustancias desde el líquido tubular hacia la sangre, y en algunos casos, la secreción de sustancias desde la sangre al líquido tubular (Barrett et al., 2010).

El flujo sanguíneo renal (FSR) equivale aproximadamente al 20% del gasto cardíaco a pesar de que los riñones representan tan sólo un 0.4% del peso corporal total, siendo el mismo alrededor de 400ml/min por 100 g de tejido. En la mayoría de los órganos, los cambios en la actividad metabólica van acoplados a cambios en el flujo sanguíneo. Sin embargo, en el riñón, las variaciones en el flujo sanguíneo provocan modificaciones en el consumo de O<sub>2</sub> (alrededor de 5ml O<sub>2</sub>/min por 100g), permitiendo que gran cantidad de plasma sea filtrado y reabsorbido para así formar la orina (Klabunde, 2012).

El flujo de sangre a través de los riñones tiene diversas funciones importantes:

1. Determina indirectamente la filtración glomerular.
2. Modifica la relación de absorción de agua y solutos por el túbulo proximal.
3. Participa en la concentración y la dilución de la orina.
4. Aporta O<sub>2</sub>, nutrientes y hormonas a las células de la nefrona, y recoge CO<sub>2</sub>, líquidos y solutos reabsorbidos a la circulación general.
5. Aporta sustratos para su excreción en la orina (Barrett et al., 2010).

### **1.1.1 Autorregulación del flujo sanguíneo renal**

Como la mayoría de los órganos, los riñones regulan su flujo sanguíneo ajustando la resistencia vascular como respuesta a los cambios en la presión arterial (entre 80 y 180 mm Hg) para que permanezca relativamente constante (Barrett et al., 2010). La autorregulación del flujo sanguíneo va acompañada de la autorregulación de la filtración glomerular (FGR) de tal forma que la filtración permanece constante dentro de un amplio rango en los valores de las presiones arteriales. Para que esto sea posible, la presión del capilar glomerular no varía a pesar de que la presión arterial sí

lo haga. La autorregulación se consigue por los cambios en la resistencia vascular, principalmente por la arteriola aferente del riñón.

Existen dos mecanismos responsables de la autorregulación renal: uno de ellos es el mecanismo miogénico y el otro se conoce como retroalimentación tubuloglomerular. El primer mecanismo se relaciona con una propiedad intrínseca del MLV. Por ello, cuando la presión arterial disminuye, la arteriola aferente y el músculo liso se relajan y por el contrario, un incremento de la presión arterial induce que la arteriola aferente se distienda y se contraiga el músculo liso. Por otro lado, el mecanismo de retroalimentación tubuloglomerular consiste en que los cambios en la presión de perfusión alteran la FGR y por lo tanto, el flujo tubular, y las variaciones resultantes de la concentración de NaCl es detectada por la mácula densa del aparato yuxtaglomerular y convertida en una o varias señales para que la arteriola aferente se contraiga o se dilate. La mácula densa del aparato yuxtaglomerular es un grupo de células especializadas del túbulo distal que se encuentra junto a la arteriola aferente a medida que el túbulo distal se aproxima al glomérulo. Dichas células, detectan la osmolaridad de los solutos, en especial del NaCl. Algunos investigadores, han propuesto que la adenosina (la cual se considera un vasoconstrictor en el riñón), la angiotensina II producida localmente (como vasoconstrictor) o vasodilatadores como el NO, PGE<sub>2</sub> y prostaciclina están implicados en la retroalimentación tubular y autorregulación (Klabunde, 2012).

La autorregulación del FSR y de la FGR es un mecanismo eficaz para desacoplar la función renal y la presión arterial y asegurar que la excreción de solutos y líquidos permanece constante.

Se deben tener en cuenta tres aspectos con respecto a la autorregulación:

1. La autorregulación está ausente si la presión arterial es inferior a 90 mmHg.
2. La autorregulación no es perfecta; el FSR y la FGR cambian ligeramente a medida que varía la presión sanguínea.
3. A pesar de la autorregulación, la FGR y el FSR pueden alterarse por la acción de ciertas hormonas y por cambios en la actividad de los nervios simpáticos (Barrett et al., 2010).

### 1.1.2 Regulación neurohumoral del flujo sanguíneo renal

Los nervios renales regulan el flujo plasmático renal, la FGR y la reabsorción de agua y electrolitos por la nefrona. Los nervios proporcionan al riñón fibras nerviosas simpáticas que proceden del plexo celíaco. No hay inervación parasimpática. Las fibras adrenérgicas discurren adyacentes a las células del músculo liso de las ramas mayores de la arteria renal (arterias interlobar, arcuata e interlobular) y las arteriolas aferentes y eferentes. Además, los nervios simpáticos inervan las células granulares productoras de renina de la arteriola aferente. La secreción de renina se estimula por el aumento de la actividad simpática. Las fibras nerviosas también inervan el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el conducto colector; la activación de los nervios simpáticos aumenta la reabsorción de  $\text{Na}^+$  por estos segmentos de la nefrona. Las arteriolas aferentes y eferentes están inervadas por neuronas simpáticas, aunque el tono simpático es mínimo cuando el volumen de líquido extracelular es normal. Los nervios simpáticos liberan noradrenalina y dopamina, y la adrenalina es secretada por la médula adrenal. La noradrenalina y la adrenalina causan vasoconstricción al unirse a los adrenoceptores  $\alpha_1$ , que se localizan principalmente en las arteriolas aferentes. La activación de los adrenoceptores  $\alpha_1$  reduce la FGR y el FSR. La deshidratación o un fuerte estímulo emocional, como el miedo o el dolor, activan los nervios simpáticos y reducen la FGR y el FSR. La renalasa, una hormona que metaboliza las catecolaminas producidas por el riñón, facilita la degradación de las mismas.

La angiotensina II se produce sistémicamente y también de forma local en el riñón. Contrae las arteriolas aferentes y eferentes y reduce el FSR y la filtración glomerular. La arteriola eferente es más sensible a la angiotensina II que la arteriola aferente. Por ello, con bajas concentraciones de angiotensina II, predomina la contracción de la arteriola eferente, y la FGR y el FSR se reducen en proporción. Sin embargo, con altas concentraciones de angiotensina II, se produce una contracción tanto de la arteriola aferente como de la arteriola eferente, y la FGR y el FSR no se reducen de forma proporcionada. Teniendo en cuenta lo anterior, la noradrenalina, la adrenalina y la angiotensina II actúan juntas para reducir el FSR y la filtración glomerular, y por ello aumentan la presión sanguínea y el volumen del líquido extracelular (Barrett et al., 2010).

### 1.1.3 Regulación local del flujo sanguíneo renal

Las células endoteliales desempeñan un papel fundamental en la regulación de la resistencia de las arteriolas aferentes y eferentes al producir un número de hormonas paracrinas, que incluyen NO, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), endotelina 1 (ET-1) y angiotensina II. Estas hormonas regulan la concentración y la relajación de las células musculares lisas de las arteriolas aferentes y eferentes, y las células mesangiales. Las fuerzas de cizallamiento o *shear stress*, y numerosas hormonas vasoactivas, ACh, histamina, bradiquinina y ATP estimulan la liberación de NO del endotelio, que aumenta el FSR y la filtración glomerular. El NO, un factor relajante derivado del endotelio, es un vasodilatador importante en condiciones basales, y se opone a la vasoconstricción producida por la angiotensina II y las catecolaminas. Cuando el flujo sanguíneo aumenta, aumenta la producción de NO. Una producción aumentada de NO, produce la dilatación de las arteriolas aferentes y eferentes de los riñones. Mientras que unos niveles aumentados de NO reducen las resistencias periféricas totales, la inhibición de la producción de NO aumenta las resistencias periféricas totales.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) localizada en la superficie de las células endoteliales de la arteriola aferente y los capilares glomerulares, convierte la angiotensina I, una hormona inactiva, en angiotensina II, una hormona activa, que disminuye la FGR y el FSR. La angiotensina se produce localmente en las células glomerulares en la arteriola aferente y en las células del túbulo proximal. La secreción de la PGI<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub> por las células endoteliales, se estimula por la actividad de los nervios simpáticos y de la angiotensina II, y aumentan la FGR y el FSR. La ECA degrada y por ello inactiva la bradiquinina. Además, aumenta los niveles de angiotensina II y reduce los niveles de bradiquinina (Barrett et al., 2010).

La liberación de ET-1 por las células endoteliales disminuye la FGR y el FSR. La ET-1 es un potente vasoconstrictor segregado por las células endoteliales de los vasos renales, las células mesangiales y las células del túbulo distal como respuesta a la angiotensina II, bradiquinina, adrenalina y estrés de cizalladura endotelial. La ET-1 produce una profunda vasoconstricción de las arteriolas aferentes y eferentes, y reduce la FGR y el FSR. Aunque este potente vasoconstrictor puede no influir ni en FGR ni en el FSR en los sujetos en reposo, la producción de ET-1 está elevada en diversas

enfermedades glomerulares (por ejemplo, en la enfermedad renal asociada con la diabetes mellitus).

La kalicreína es una enzima proteolítica producida por el riñón. La kalicreína fragmenta el cininógeno circulante produciendo bradiquinina, que es un vasodilatador que actúa estimulando la liberación de NO y prostaglandinas. La bradiquinina aumenta la FGR y el FSR.

La adenosina se produce en el riñón, causa vasoconstricción de la arteriola aferente, por ello, reduce la FGR y el FSR y como se ha mencionado anteriormente, desempeña un papel fundamental en la retroalimentación tubuloglomerular.

La secreción del péptido natriurético atrial (ANP) por la aurícula cardíaca, y del péptido natriurético cerebral (BNP) por el ventrículo cardíaco, aumentan cuando se expande el volumen de líquido extracelular. Tanto ANP como BNP dilatan la arteriola aferente y contraen la arteriola eferente. Por ello, ANP y BNP producen una ligera elevación de la FGR con pequeños cambios en el FSR.

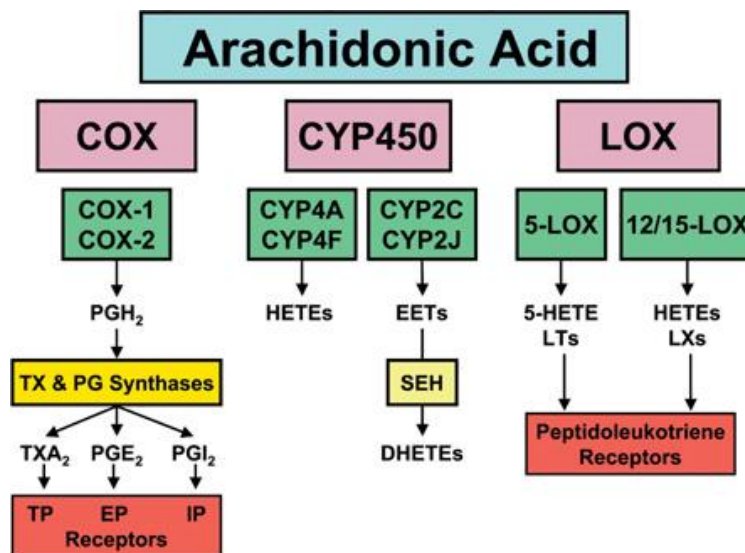
Las células liberan ATP al fluido renal intersticial. El ATP tiene un efecto dual sobre la FGR y el FSR. Bajo ciertas condiciones, el ATP contrae la arteriola aferente, reduce la FGR y el FSR y puede desempeñar un papel crucial en la retroalimentación tubuloglomerular. Por el contrario, el ATP puede estimular la producción de NO y aumentar la FGR y el FSR.

La liberación local de histamina modula el FSR durante el estado de reposo, y durante la inflamación y la lesión. La histamina disminuye las resistencias de las arteriolas aferentes y eferentes y, por ello, aumenta el FSR sin elevar la filtración glomerular.

El túbulo proximal produce la sustancia vasodilatadora dopamina, la cual, ejerce varias acciones en el riñón, como el aumento del FSR y la inhibición de la liberación de renina (Barrett et al., 2010).

### 1.1.3.1 Regulación del flujo sanguíneo renal por prostaglandinas

El término eicosanoides hace referencia a los metabolitos  $C_{20}$  que se generan por tres vías enzimáticas principales: la de la ciclooxigenasa (COX), la de la lipooxigenasa (LOX) y la del citocromo P450 (CYP450). Los principales eicosanoides biológicos derivan del ácido araquidónico liberado de la membrana de fosfolípidos mediante la acción de fosfolipasas. Con respecto a la función vascular renal, los eicosanoides biológicamente activos derivados de las células endoteliales y de las células del MLV, actúan como reguladores de la hemodinámica renal (Quilley et al., 1995; Imig, 2000a; Roman, 2002).



**Figura 3.** Metabolización del ácido araquidónico mediante las vías de la COX, CYP450 y LOX. Tomado de Imig (2006).

El efecto de cada prostanoides tiene lugar a diferentes niveles, incluyendo las reacciones enzimáticas catalizadas secuencialmente por la COX y la sintasa del prostanoides y la interacción con sus receptores para llevar a cabo sus funciones. Los prostanoides derivados de la COX actúan de forma autocrina o paracrina y pueden servir como tampones fisiológicos, protegiendo el riñón de cambios funcionales excesivos durante el estrés fisiológico. Gracias a dichas acciones, los prostanoides juegan un papel importante en el mantenimiento de la función renal, la homeostasis de los fluidos corporales y la presión sanguínea (Hao & Breyer, 2008).

Los prostanoides son un grupo de mediadores lípidos derivados del metabolismo enzimático del ácido araquidónico, en el cual participa la COX que es la principal diana terapéutica de las acciones de analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Vane, 1971; Oates, 1982; Smith, 1992). Los últimos estudios demuestran que los prostanoides derivados de la COX, también juegan un papel crucial en la participación de múltiples procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular y en el control de la homeostasis del organismo. Por otro lado, los prostanoides derivados de la COX también son importantes en la fisiopatología de la inflamación, el cáncer y la hipertensión (Smith, 1992; Herschman, 1996; Dubois et al., 1998; FitzGerald & Loll, 2001).

Los prostanoides se forman por la conversión del ácido araquidónico libre a  $PGH_2$  como molécula intermedia gracias a la COX a través de un proceso enzimático que conlleva dos pasos. Primero, la COX convierte al ácido araquidónico en  $PGG_2$  vía actividad de la bis-oxigenasa, y después la  $PGG_2$  que es inestable se va a transformar en la  $PGH_2$  mediante la actividad de la peroxidasa de la COX (Herschman, 1996). La  $PGH_2$  se metaboliza secuencialmente para dar lugar a prostanoides biológicamente activos, que incluyen a la  $PGE_2$ , la prostaciclina ( $PGI_2$ ), la  $PGF_{2\alpha}$ , la  $PGD_2$  y al tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) mediante distintas sintasas (Hao & Breyer, 2008).

En el riñón se expresan de forma constitutiva tanto la isoforma COX-1 como la isoforma COX-2, que contribuyen a la regulación de la función vascular (Imig, 2000a; Cheng & Harris, 2004). El segundo paso en la reacción enzimática tiene lugar mediante la intervención de las sintasas de PG y TX que convierten la  $PGH_2$  en sus metabolitos

activos. Dichos prostanoides pueden actuar posteriormente acoplados a los receptores de proteínas G para el control de la hemodinámica renal (Imig, 2000a; Breyer & Breyer, 2000b). El TXA<sub>2</sub>, la PGE<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) son metabolitos primarios de la COX que participan en la regulación del FSR y de la filtración glomerular (Quilley et al., 1995; Imig, 2000a; Breyer & Breyer, 2000b; Cheng & Harris, 2004).

Los prostanoides se degradan metabólicamente de forma rápida, lo cual limita que ejerzan sus efectos en la proximidad de sus lugares de síntesis, explicando su función autocrina o paracrina. Cada prostanoides actúa sobre receptores acoplados a proteínas G específicas y distintas de la superficie celular o sobre receptores nucleares tales como el receptor de peroxisoma proliferador activado PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ . Debido a que múltiples prostaglandinas pueden sintetizarse por la vía de la COX y que dichas prostaglandinas son capaces de unirse a distintos receptores, los efectos biológicos de los prostanoides derivados de la COX son diversos y complejos, dependiendo del prostanoides que se haya formado y del receptor al que haya sido capaz de unirse localmente; (Breyer & Breyer, 2000b; Lim & Dey, 2000; Bernardo et al., 2000; Narumiya & FitzGerald, 2001; Hao et al., 2002; Ward et al., 2004).

La PGH<sub>2</sub>, el producto del metabolismo del araquidonato mediado por la COX, es posteriormente metabolizada por las sintasas de prostanoides en los diferentes productos. Entre las sintasas de prostanoides, se incluyen la sintasa PGE (PGES), la prostaciclina sintasa (PGIS), la sintasa PGD (PGDS), la sintasa PGF (PGFS) y la tromboxano sintasa, responsables de la biosíntesis de PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y TXA<sub>2</sub>, respectivamente (Smith & Langenbach, 2001; FitzGerald, 2003). Al menos se han identificado tres sintasas PGE, las cuales son la sintasa 1 microsomal PGE (mPGES1), la sintasa 2 microsomal PGE (mPGES2) y la sintasa citosólica PGE (cPGES) (Jakobsson et al., 1999; Tanioka et al., 2000; Tanikawa et al., 2002). La primera de ellas, muestra una gran actividad catalítica relativa a otras PGESs (Jakobsson et al., 1999; Lazarus et al., 2002). Además, su expresión se induce por citoquinas y estímulos inflamatorios, a diferencia de la expresión tanto de la cPGES como de la mPGES2 que no es inducible (Murakami et al., 2002; Tanikawa et al., 2002). La PGDS cataliza la síntesis de PGD<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> (Urade & Eguchi, 2002). Existen dos tipos de PGDS, la tipo lipocalina PGDS (L-PGDS) y la hematopoyética PGDS (H-PGDS) (Urade & Hayaishi, 2000; Urade & Eguchi, 2002). La PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  también se sintetiza a partir de la PGH<sub>2</sub> por la 9,11

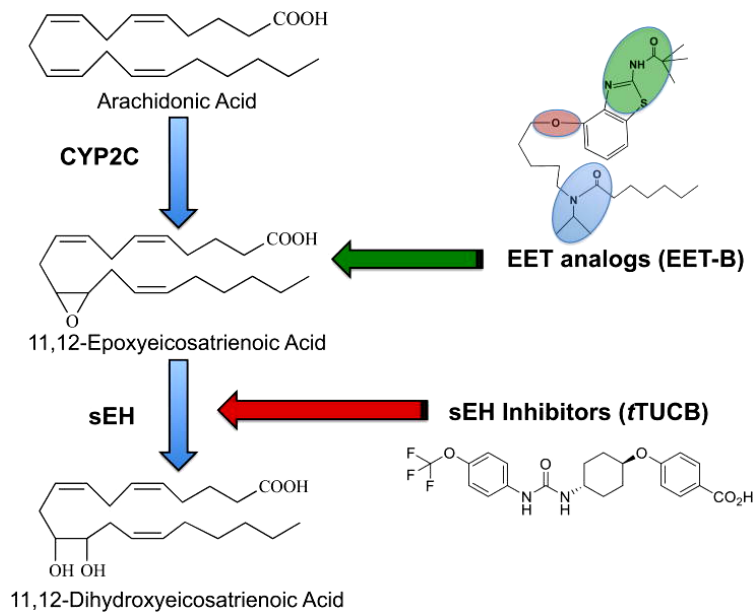
endoperóxido reductasa o de la PGE<sub>2</sub> por la PGE 9-reductasa (Lee & Levine, 1975; Westbrook & Jarabak, 1975; Watanabe, 2002).

La PGE<sub>2</sub> es el principal metabolito derivado de la COX en el riñón y actúa sobre los receptores EP (receptores de PGE<sub>2</sub>) para regular la resistencia vascular renal (Breyer & Breyer, 2000a; Breyer & Breyer, 2000b). A pesar de que la PGE<sub>2</sub> se ha demostrado que incrementa el FSR y la FGR, la activación de los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> producen la contracción en la vasculatura renal (Imig, 2000a; Breyer & Breyer, 2000a; Breyer & Breyer, 2000b; Tang et al., 2000; Audoly et al., 2001; Imig et al., 2002). Los receptores vasoconstrictores EP<sub>1</sub> actúan vía IP<sub>3</sub>, DAG y PKC, y los receptores EP<sub>3</sub> disminuyen los niveles cAMP. La activación del receptor EP<sub>2</sub> o EP<sub>4</sub> aumentan los niveles de cAMP vascular renal induciendo relajación (Chaudhari et al., 1990; Ruan et al., 1999; Breyer & Breyer, 2000b). Además de las acciones directas sobre los receptores EP del MLV renales, la PGE<sub>2</sub> estimula la liberación de renina a partir de células yuxtglomerulares (Jensen et al., 1996; Breyer & Breyer, 2000b; Schweda et al., 2004). Dicha estimulación la PGE<sub>2</sub> la lleva a cabo mediante la vía de activación de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> (Schweda et al., 2004). Las interacciones en la hemodinámica renal entre la PGE<sub>2</sub> y la angiotensina se han estudiado de forma extensa. La angiotensina aumenta la producción de PGE<sub>2</sub> por el riñón y la PGE<sub>2</sub> regula la vasoconstricción renal producida por la angiotensina (Chatziantoniou & Arendshorst, 1992a; Chatziantoniou & Arendshorst, 1992b; Navar et al., 1996; Imig & Deichmann, 1997; Purdy & Arendshorst, 1999; Imig, 2000a). La investigación de la regulación de los receptores de PGE<sub>2</sub> renal y del receptor vascular renal EP es de gran interés, debido a que los efectos vasculares de la PGE<sub>2</sub> están alterados en diversos estados de enfermedad renal. La PGI<sub>2</sub> ejerce sus acciones vasculares mediante la estimulación del receptor IP (receptor PGI<sub>2</sub>) que se encuentra a lo largo del riñón (Breyer & Breyer, 2000b). Los receptores de IP están acoplados a proteínas G y estimulan la generación intracelular de cAMP en los vasos preglomerulares (Purdy & Arendshorst, 2001). Como era de esperar, los análogos de PGI<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> relajan la vasculatura glomerular (Imig, 2000a; Breyer & Breyer, 2000b). En respuesta a la PGI<sub>2</sub> se produce una vasodilatación renal, la cual es menor a la generada por la activación de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> por la PGE<sub>2</sub> de I (Breyer & Breyer, 2000b). Al igual que la PGE<sub>2</sub>, se ha demostrado que la activación de PGI<sub>2</sub> de los receptores IP estimula la liberación de renina de las células yuxtglomerulares (Jensen et al., 1996). Las respuestas vasoconstrictoras renales también son disminuidas por la

PGI<sub>2</sub> y la activación del receptor IP (Navar et al., 1996; Imig, 2000a; Purdy & Arendshorst, 2001). La PGI<sub>2</sub> contribuye a la homeostasis vascular y ayuda a evitar la agregación plaquetaria en la circulación (Miyamoto et al., 2003; Jin et al., 2005). Alteraciones en la producción de PGI<sub>2</sub> vascular renal en estados de enfermedad, podrían contribuir a la progresión del daño renal. En particular, los cambios en el equilibrio entre los metabolitos de la COX, el vasoconstrictor y pro-agregante TXA<sub>2</sub> y el vasodilatador y antiagregante PGI<sub>2</sub>, parecen contribuir a la patología vascular renal en los estados de enfermedad (Tajiri et al., 1994). El TXA<sub>2</sub> es un vasoconstrictor renal que se produce a bajas concentraciones en el riñón en condiciones fisiológicas (Patrono et al., 1986; Imig, 2000a). Las células mesangiales y los podocitos glomerulares son los principales tipos de células renales que sintetizan TXA<sub>2</sub> (Imig, 2000a). Una vez producido, el TXA<sub>2</sub> actúa sobre los receptores TP (receptores de TXA<sub>2</sub>) para activar la PLC (fosfolipasa C), produciendo niveles elevados de IP<sub>3</sub> intracelular y la movilización de calcio de los almacenes intracelulares y la activación de canales de calcio de tipo L (Raychowdhury et al., 1994; Offermanns et al., 1994). La constricción de la arteriola aferente en respuesta al mimético de TXA<sub>2</sub>, U-44169, va a depender de la activación de canales de calcio tipo L (Hayashi et al., 1997). La activación del receptor TP de los canales de calcio tipo L, contribuye a la vasoconstricción renal en respuesta a la angiotensina (Navar et al., 1996; Imig, 2000a). Además, el TXA<sub>2</sub> es proagregante, estimula la producción de la matriz mesangial y se ha asociado con daño glomerular progresivo (Katayama et al., 1990). El TXA<sub>2</sub> y los receptores TP se han asociado e implicado en las alteraciones vasculares del glomérulo renal que ocurren durante diversos trastornos renales (Katayama et al., 1990; Quilley et al., 1995; Navar et al., 1996). Así, el TXA<sub>2</sub> y los receptores TP son dianas terapéuticas viables para el tratamiento de la disfunción vascular renal (Imig, 2006).

### 1.1.3.2 Regulación del flujo sanguíneo renal por derivados de las CYP

Las enzimas CYP450 se expresan en las estructuras vascular y tubular del riñón y presentan diversas funciones que dependen del producto obtenido del ácido araquidónico. Dichas enzimas tienen la capacidad de metabolizar el ácido araquidónico generando ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) (Capdevila & Falck, 2001; Spector et al., 2004).



**Figura 4.** El ácido araquidónico se convierte en ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) por la acción de las enzimas epoxigenasas CYP450 (CYP2C). Posteriormente los EETs se van a transformar en ácidos dihidroeicosatrienoicos (DHETEs) gracias a la intervención de la enzima hidrolasa epóxido soluble (sEH). Tomado de Imig (2015).

La producción de los metabolitos epóxido se realiza principalmente a través de la familia de la CYP2C, mientras que las familias de la CYP4A y CYP4F son las principales vías en la síntesis de los metabolitos de la hidrolasa. La expresión de la enzima CYP450 va a variar en función de los tipos de células renales y la regulación enzimática de esta vía participa en la hemodinámica renal (Imig, 2000b; Roman, 2002).

Las enzimas CYP4A hidroxilasa se localizan en las arteriolas renales, el glomérulo y los capilares de los vasos rectos, siendo las principales responsables de la generación de 20-HETE (Imig et al., 1996a; Roman, 2002). El 20-HETE contrae la arteriola aferente mediante la inhibición de los canales de calcio activados por  $K^+$  ( $K_{Ca}$ ), la despolarización de la membrana, la activación de los canales de calcio tipo L y un

incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Ma et al., 1993; Imig et al., 1996a; Roman, 2002). Además, el 20-HETE, principal metabolito del ácido araquidónico de la CYP4A, tiene un papel importante manteniendo la autorregulación del flujo sanguíneo (Imig et al., 1994; Zou et al., 1994a; Imig, 2000a; Roman, 2002). La autorregulación del FSR, como ya se ha dicho anteriormente, es la capacidad de mantener constantes el flujo sanguíneo y la tasa de FGR frente a los cambios que se produzcan en la presión sanguínea. Tanto el FSR como el flujo sanguíneo cortical, aumentan en respuesta al incremento de la presión arterial media en condiciones de inhibición de la CYP (Zou et al., 1994a). Dicho metabolito de la hidrolasa aumenta la resistencia vascular renal y puede influir en las acciones del NO sobre las células de MLV (Alonso-Galicia et al., 1997; Roman, 2002). El 20-HETE, contrae la arteriola aferente mediante el cierre de los canales de  $K^+$  de larga conductancia  $K_{Ca}$ , causando la despolarización de la membrana y un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Ma et al., 1993; Imig et al., 1996a; Imig, 2000a; Roman, 2002).

Experimentos con preparaciones de nefrona yuxtamedular, determinan que se atenúa la constricción de la arteriola aferente y que la presión capilar glomerular aumenta a medida que aumenta la presión arterial de 80 a 160 mm Hg (Imig et al., 1994). Otros estudios adicionales, establecen la participación de los metabolitos de las CYP en las respuestas miogénicas de la arteriola aferente y de la retroalimentación tubuloglomerular (Imig et al., 1994; Zou et al., 1994a; Zou et al., 1994b). El mecanismo miogénico en la microvasculatura renal en ausencia de la retroalimentación tubuloglomerular, disminuye en condiciones de inhibición de las CYP (Imig et al., 1994). Hay estudios que demuestran que la inhibición de la CYP, inhibe el mecanismo de retroalimentación tubuloglomerular y la adición de 20-HETE a la perfusión tubular, restaura dicho mecanismo (Zou et al., 1994b). Este hallazgo confirma el concepto de que los EETs no contribuyen a la autorregulación y sin embargo, el 20-HETE, metabolito de la hidroxilasa, sí lo hace en la autorregulación del FSR. Por otro lado, también se confirma que el 20-HETE, es un componente crucial en la respuesta de la arteriola aferente a los incrementos de la presión arterial y que por tanto, los EETs van a atenuar dicha vasoconstricción (Imig, 2013).

Tanto la inhibición de la CYP hidroxilasa como la inactivación de los receptores ATP P2X disminuyen la autorregulación en microvasos preglomerulares (Inscho et al., 1996; Inscho et al., 2003). Curiosamente, la inhibición de la hidroxilasa o el

antagonismo del 20-HETE atenúan la constricción de la arteriola aferente inicial e inhiben la constricción sostenida al agonista del receptor ATP P2 (Zhao et al., 2004a). Existen evidencias científicas que sostienen que el 20-HETE endógeno contribuye en la autorregulación de la arteriola aferente mediada por el receptor P2X mediante la entrada de calcio por las células del MLV (Imig, 2013).

En general, el 20-HETE es un factor importante autocrino que participa en la regulación del flujo renal y en la función de la arteriola aferente. Dicho esto, existe una conexión entre la activación del receptor ATP P2X, el 20-HETE y las respuestas autorreguladoras de la arteriola aferente (Imig, 2013).

El riñón tiene capacidad para generar EETs, los cuales, actúan en el transporte de la célula epitelial y en la hemodinámica renal (Jacobson et al., 1985; Capdevila & Falck, 2001; Imig, 2005). Las enzimas CYP2C son las principales responsables de la generación de EETs en el epitelio renal y la célula endotelial (Imig, 2005). En lo que respecta a la hemodinámica renal, algunos estudios concluyen que las enzimas COX pueden dar lugar a 5,6-EET y 8,9-EET como vasoconstrictores que actúan sobre los receptores de TXA<sub>2</sub> y a 11,12-EET y 14,15-EET que actúan como vasodilatadores (Imig et al., 1996b; Imig, 2005). Además, los EETs también pueden metabolizarse por la sEH en sus correspondientes dioles, ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DHETEs).

Las respuestas de la arteriola aferente a los EETs, en concreto al 11,12-EET y 14,15-EET, llevaron inicialmente a sugerir que dichos metabolitos podían ser *factores hiperpolarizantes derivados del endotelio* (EDHFs) (Imig et al., 1996b). Además, estudios posteriores determinaron que dichos metabolitos producen vasodilatación de las arteriolas aferentes mediante su acción directa en el MLV activando los canales K<sub>Ca</sub> de la célula muscular lisa renal y causando hiperpolarización (Zou et al., 1996; Campbell et al., 1996; Busse et al., 2002). Los EETs también contribuyen a la vasodilatación renal independientemente del NO y de la COX, y se ha sugerido que participan en la relajación microvascular renal mediada por bradiquinina, en respuesta a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Mombouli & Vanhoutte, 1995; Matsuda et al., 2004). Además, los microvasos renales aumentan la producción de EET en un 50% tras la estimulación con bradiquinina (Imig et al., 2001a). Parece ser que el 20-HETE y los EETs intervienen en las respuestas del receptor de purina. La adenosina

incrementa la generación de EET en la circulación renal y los EETs ayudan a que el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina medie la vasodilatación (Cheng et al., 2004).

Por otro lado, se han diseñado y sintetizado análogos de los EETs para aumentar la estabilidad y determinar la relación de la actividad con la estructura de los propios EETs (Sudhahar et al., 2010). Esto lleva a que primero los análogos de sulfonamida 11,12-EET y 14,15-EET evitan que se produzca la  $\beta$ -oxidación hacia el ácido carboxílico (Chen et al., 1998; Imig et al., 1999). Además, el uso de análogos del 11,12-EET permitió realizar estudios de señalización celular en los vasos renales y determinar si el cAMP y la proteína quinasa A (PKA) participan en la activación de los canales de K<sub>Ca</sub> (Imig et al., 1999; Imig et al., 2008). Experimentos adicionales en cultivos celulares del MLV renal, determinaron que los análogos del 11,12-EET incrementaban los niveles de cAMP pero no producían dicho incremento en el caso del cGMP, por lo que se confirma que el 11,12-EET estimula la vía cAMP/PKA provocando la activación de los canales de larga conductancia K<sub>Ca</sub> y la dilatación de la arteriola aferente (Imig et al., 2008).

La expresión endotelial de la CYP2J<sub>2</sub> y CYP2C8 humana aumenta la relajación en respuesta a la ACh de la arteriola aferente y disminuye la contracción en respuesta a la ET-1 (Lee et al., 2010). Estudios previos que utilizan inhibidores farmacológicos de la epoxigenasa, demuestran que los EETs contribuyen en la vasodilatación renal inducida por la ACh y a la vasoconstricción inducida por la ET-1 (Imig et al., 2000; Matsuda et al., 2004).

Las acciones de los EETs a nivel vascular y tubular renal para producir dilatación e incrementar la excreción de sodio, sugieren que los EETs son antihipertensivos. Esto lleva a la hipótesis de que la disminución de los niveles renales y vasculares de los EETs contribuye a la hipertensión, disfunción endotelial e insuficiencia renal. Otros estudios demuestran que el incremento de la degradación de los EETs por la sEH en el riñón, se asocia con disfunción vascular renal en hipertensión (Imig et al., 2002b; Zhao et al., 2004b). La expresión de la proteína vascular renal sEH pero no de la CYP epoxigenasa, se aumenta en la hipertensión renal (Imig et al., 2001b; Imig et al., 2002b). Se ha confirmado que el incremento del 20-HETE vascular renal está involucrado en la hipertensión y en pacientes humanos hipertensos se aprecia el

aumento de los niveles en plasma del 20-HETE (Roman, 2002; Minuz et al., 2008). Dichos resultados sugieren que el aumento de los niveles del 20-HETE se produce en hipertensión dependiente de la angiotensina mediante la activación de la ECA y de los receptores tipo 1 de angiotensina (Sodhi et al., 2010).

Las enzimas LOX metabolizan el ácido araquidónico para formar leucotrienos (LTs), HETEs y lipoxinas (LXs). La expresión de dichas enzimas en el tejido vascular, se encuentra altamente localizada con fuentes que incluyen plaquetas (12-LOX), monocitos/macrófagos (12/15-LOX) y neutrófilos (5-LOX) (Yamamoto, 1992; Funk et al., 1996; Brash, 1999; Natarajan & Nadler, 2004). Las células mesangiales glomerulares y las células endoteliales expresan enzimas LOX y producen  $LTA_4$ , 12-HETE y 15-HETE (Navar et al., 1996; Imig, 2000a; Natarajan & Nadler, 2004). Estos metabolitos tienen acciones inflamatorias, efectos de crecimiento en el MLV y regulan la hemodinámica renal (Imig, 2000a; Natarajan & Nadler, 2004). 12-HETE y 15-HETE contraen los vasos renales y las células mesangiales glomerulares (Imig, 2000a; Yiu et al., 2003). Así mismo, el 12-HETE disminuye el FSR y la FGR (Kato et al., 1992). Los LTs pueden elevar la permeabilidad de los capilares glomerulares y peritubulares y una elevada producción de LTs, contribuye a la aparición de proteinuria y nefritis intersticial (Imig, 2000a; Natarajan & Nadler, 2004; Kieran et al., 2004). Por lo tanto, los metabolitos derivados de las LOX intervienen en el daño glomerular y vascular renal asociado a hipertensión y diabetes. Las LXs, metabolitos también derivados de las LOX, contrarrestan las acciones vasculares renales e inflamatorias del 12-HETE, 15-HETE y LTs. Se ha demostrado que  $LXA_4$  se opone a la disminución del FSR y de la FGR mediada por la infusión intrarrenal de  $LTD_4$  (Badr et al., 1989). Esta acción se debe parcialmente a la activación de los receptores péptidoLT (Imig, 2000a; Kieran et al., 2004). La generación de LXs y LXs activados por aspirina, puede cambiar la respuesta celular glomerular de la inflamación a favor de la resolución y la inhibición del reclutamiento de monocitos (Kieran et al., 2004).

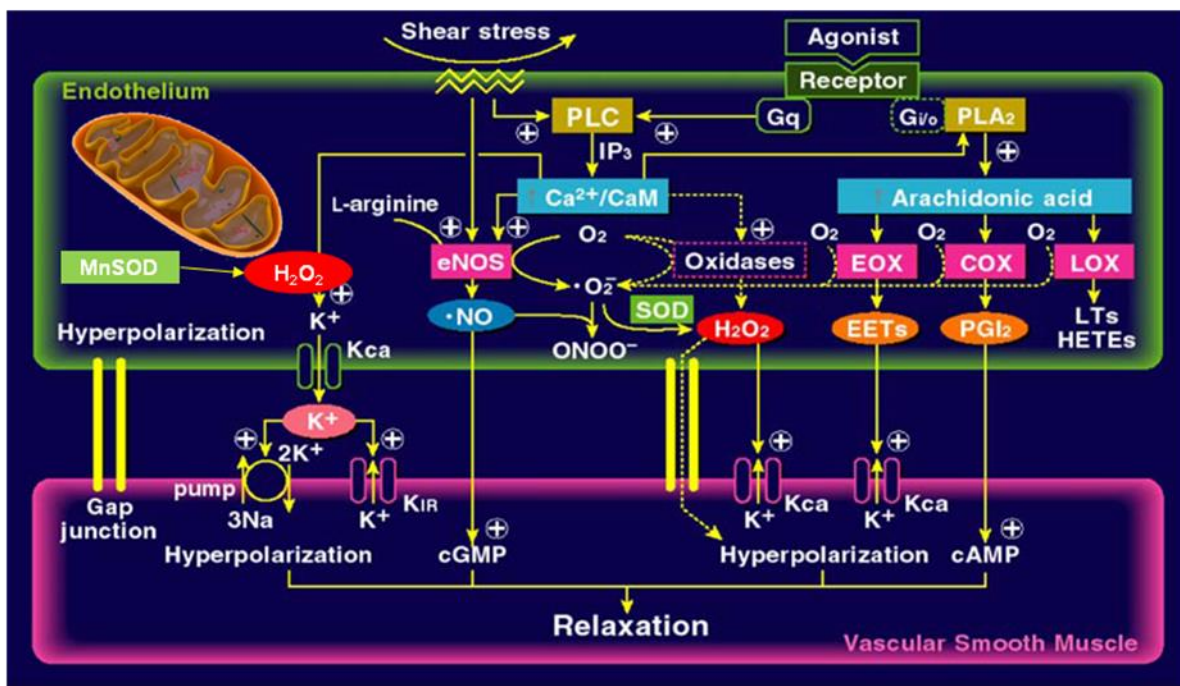
## 1.2 ENDOTELIO VASCULAR

El endotelio vascular es un órgano paracrino, autocrino y endocrino que juega un papel en la homeostasis mediante la secreción activa de moléculas vasoactivas y tróficas que intervienen en la vasomoción, en el crecimiento y proliferación de las células del endotelio y del MLV, en las interacciones endotelio-leucocito, en la agregación plaquetaria, en la coagulación, en la inflamación y en la permeabilidad (Poher & Sessa, 2007; Vanhoutte et al., 2009). Mediante la detección del *shear stress* inducido por el flujo sanguíneo o en respuesta a señales químicas, las células endoteliales pueden regular el tono vascular a través de la liberación de factores vasoactivos y tróficos que incluyen vasodilatadores como el NO, la PGI<sub>2</sub> y EDHFs. Algunos de estos vasodilatadores como el NO y la prostaciclina, tienen también acciones inhibitorias sobre el crecimiento celular, la coagulación y la inflamación (Poher & Sessa, 2007; Vanhoutte et al., 2009; Tousoulis et al., 2012). Por otro lado, las células endoteliales también son capaces de sintetizar vasoconstrictores, entre los cuales se encuentran, prostanoides como el TXA<sub>2</sub>, ROS y péptidos como la ET-1 que pueden tener acciones proliferativas a parte de inducir contracción (Vanhoutte et al., 2009). Las células endoteliales desempeñan un papel clave en la reacción inmunológica regulando el reclutamiento de leucocitos o por inducción de las moléculas de adhesión de leucocitos, la activación inflamatoria del endotelio que se produce en respuesta a las citoquinas inflamatorias y también a las ROS generadas en el proceso inflamatorio o bien por condiciones metabólicas alteradas (Poher & Sessa, 2007).

### 1.2.1 Función endotelial

El factor relajante derivado del endotelio (EDRF) mejor caracterizado es el NO, el cual activa la guanilato ciclasa soluble en las células del MLV que produce guanósil monofosfato cíclico (cGMP) iniciándose la relajación. Por otro lado, las células endoteliales también provocan la hiperpolarización del MLV subyacente, a través de un mecanismo que inicialmente se atribuyó a la liberación de factores hiperpolarizantes (EDHFs) transferibles liberados por las células endoteliales que difundían al MLV, pero que en la actualidad contempla además la hiperpolarización de las propias células endoteliales que se propagan a las células de MLV a través de las uniones *gap* mio-endoteliales y que se conocen con el nombre de *hiperpolarización*

derivada del endotelio (EDH) (De Wit & Griffith, 2010; Ellinsworth et al., 2016). La vasodilatación inducida por agonistas o por flujo que es independiente de NO y de prostaciclina es debida típicamente a la EDH del MLV subyacente. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los epóxidos EETs derivados del endotelio son importantes reguladores del potencial de membrana y del tono vascular en lechos como el coronario y son considerados como mediadores de las respuestas EDH (Ellinsworth et al., 2016). Por otra parte, además del TXA<sub>2</sub> la mayoría de los incrementos en la fuerza contráctil dependientes del endotelio se deben a la formación de prostanoides vasoconstrictores (endoperóxidos y PGI<sub>2</sub>) que activan los receptores TP de las células MLV (Vanhoutte et al., 2017).



**Figura 5.** El superóxido que proviene de las lipooxigenasas, ciclooxigenasas, epoxigenasas, NADPH oxidasas y de la óxido nítrico sintasa desacoplada se transforma en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gracias a la SOD citosólica. El superóxido que se genera dentro de la mitocondria se transforma también en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la SOD mitocondrial. Tomado de Shimokawa (2010).

### 1.2.1.1 Óxido Nítrico

La relajación dependiente del endotelio a la ACh, mediada por la activación de los receptores muscarínicos M3 (Furchgott & Zawadzki, 1980; Boulanger et al., 1994), tiene mayor interés en el ámbito farmacológico que fisiológico. De hecho, pocos vasos sanguíneos periféricos están inervados por los nervios colinérgicos, siendo los mismos, la fuente más probable de ACh. Cuando están presentes, las neuronas colinérgicas se localizan en la adventicia, lo que dificulta el acceso a las células endoteliales. Sin embargo, los leucocitos pueden proporcionar una fuente fisiológica de ACh. Además,

no todos los vasos sanguíneos aislados presentan relaciones dependientes del endotelio en respuesta a la ACh, posiblemente debido a la ausencia del inductor del mecanismo de la NO sintasa (NOSTRIN), que modula el tráfico de receptores M3 y su colocalización con la eNOS en las células endoteliales (Kovacevic et al., 2015).

De hecho, una serie de estímulos fisiológicos [fuerzas físicas, hormonas circulantes (catecolaminas, melanocortina, vasopresina), productos de las plaquetas (serotonina, adenosina difosfato), autacoides (histamina, bradiquinina, prostaciclina, prostaglandina E<sub>4</sub>) y la trombina] comparten con la ACh la capacidad de los cambios dependientes del endotelio en el tono de la musculatura lisa subyacente (Shimokawa et al., 1988a; Shimokawa et al., 1988b; Shimokawa et al., 1988c; Pearson & Vanhoutte, 1993; Tang et al., 2005; Stähli et al., 2006; Touyz, 2007).

Aunque el NO puede proceder de otras fuentes (Zhao et al., 2013), principalmente se produce por la isoforma constitutiva de la NO sintasa endotelial (eNOS), que puede ser activada (fosforilada) de forma dependiente de Ca<sup>2+</sup> como independiente de Ca<sup>2+</sup> (Marletta, 1989; Schini-Kerth & Vanhoutte, 1995; Moncada, 1997; Li et al., 2002; Dudzinski et al., 2006; Feron & Balligand, 2006; O'Rourke et al., 2006; Bauer & Sotníková, 2010; Michel & Vanhoutte, 2010; Maron & Michel, 2012; Toda et al., 2012).

El NO no sólo previene la constricción anormal (vasoespasma) de las arterias coronarias, lo que favorece la formación de coágulos intraluminales, sino que también inhibe la agregación plaquetaria, la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales y, por tanto, la adhesión y penetración de glóbulos blancos (macrófagos) y la liberación y acción del vasoconstrictor y del péptido mitogénico ET-1. La liberación protectora de NO es desencadenada por la presencia local de trombina y sustancias liberadas en el proceso de agregación plaquetaria (Vanhoutte et al., 2017).

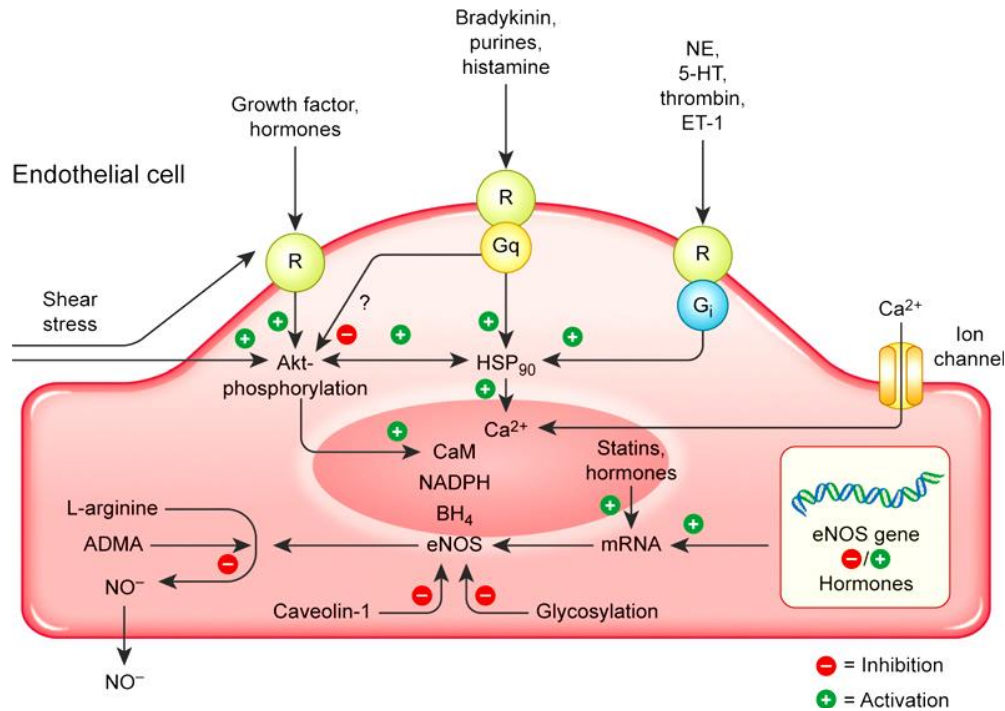
La serotonina (5-HT) y la adenosina difosfato (ADP) son los dos mediadores liberados por la agregación plaquetaria que pueden activar la eNOS y, por tanto, aumentar la producción de NO. La serotonina es la más importante y estimula los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1D</sub> de la membrana celular endotelial. La ADP por otro lado, es un contribuyente menor que actúa sobre los purinoceptores P<sub>2y</sub>. Si el endotelio

está ausente o existe disfunción endotelial, las relajaciones ya no se observan. De hecho, la agregación plaquetaria induce constricciones (vasoespasmos), porque se liberan vasoconstrictores como el TXA<sub>2</sub> y la serotonina (Vanhoutte et al., 2017).

La importancia fisiológica de las relajaciones dependientes del endotelio para los productos plaquetarios es obvia (Vanhoutte, 1988; Vanhoutte, 1996; Vanhoutte, 1997; Vanhoutte, 2002; Félétou & Vanhoutte, 2006; Vanhoutte, 2009a; Vanhoutte, 2009b). Por lo tanto, si la agregación plaquetaria ocurre en una arteria coronaria con un endotelio sano, la liberación de serotonina (y ADP) por las plaquetas y la producción local de trombina va a estimular a las células endoteliales para liberar NO. El mediador endotelial hará que el músculo liso subyacente se relaje, aumentando así el flujo sanguíneo e impidiendo de una forma mecánica la progresión en el proceso de coagulación. El NO también ejerce junto con la prostaciclina una inhibición inmediata de retroalimentación sobre las plaquetas (Radomski et al., 1987). Cuando la barrera endotelial se daña por una lesión, las plaquetas agregantes pueden llegar a las células del MLV y causar su contracción liberando TXA<sub>2</sub> y serotonina, iniciando la fase vascular de la hemostasia. La respuesta dependiente del endotelio a las plaquetas agregantes no se ejerce de la misma manera en todas las arterias, siendo las más relevantes en las circulaciones coronarias y cerebrales (Vanhoutte et al., 2017).

Tanto el aumento agudo y crónico del flujo como el consiguiente aumento de la fuerza de cizallamiento (*shear stress*) de la sangre en las células endoteliales, aumentan la expresión y la actividad de la eNOS (de forma independiente del Ca<sup>2+</sup>) y, por tanto, la liberación de EDRF/NO, pudiendo intervenir las respuestas mediadas por EDH (Rubanyi et al., 1986; Miller & Vanhoutte, 1988; Yan et al., 2007). El efecto inmediato de un aumento del *shear stress* sobre la liberación de NO, explica la dilatación mediada por flujo (FMD), un fenómeno que se suele utilizar para evaluar el estado funcional del endotelio en humanos. Sin embargo, existen varias limitaciones cuando se compara la vasodilatación mediada por flujo con la liberación de NO, particularmente en seres humanos. En primer lugar, se debe tener especial cuidado para limitar la variabilidad y asegurar la reproducibilidad (Charakida et al., 2013). En segundo lugar, en pacientes, los productos de la COX (Nohria et al., 2014), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kang et al., 2011a; Freed et al., 2014) u otros mediadores de EDH (Nohria et al., 2014) pueden contribuir a la respuesta en el aumento del *shear stress*. En tercer lugar, se debe considerar siempre la posibilidad

de que las disminuciones en las respuestas al *shear stress* o en los agentes vasodilatadores dependientes del endotelio puedan deberse a la liberación concomitante de vasoconstrictores derivados del endotelio o a una respuesta reducida (Kim et al., 1992; Schjerning et al., 2013) o anormal de las células del MLV al NO.



**Figura 6.** Posibles mecanismos por los que se regula la producción de NO en las células endoteliales. El NO se produce por la eNOS mediante la conversión de L-arginina. La actividad enzimática se regula mediante el complejo de estas proteínas en microdominios de la célula endotelial. La asociación con este complejo de la proteína HSP 90 aumenta la actividad enzimática. La estimulación de receptores específicos en la superficie endotelial (R) unidos a proteínas reguladoras de nucleótidos de guanina [que son sensibles (Gi) o insensibles (Gq) a la toxina pertussis] activa vías intracelulares que modulan la actividad de la eNOS posttraduccionalmente a través de la proteína HSP 90 o mediante la fosforilación mediada por Akt en Ser1177. La asociación de la eNOS con caveolin-1, fosforilación en Thr495 o glicosilación de la enzima reduce su actividad. Un metabolito de L-arginina, la dimetil arginina asimétrica (ADMA) disminuye la producción de NO a través de la unión competitiva a eNOS; +, indica estimulación; -, indica inhibición; ?, indica que la regulación de estas vías no se conoce. Modificada de Vanhoutte et al., (2017).

El efecto agudo del *shear stress* en el incremento de la liberación de NO implica diversos mecanismos (Davies, 1995; Liu et al., 2013a; Fleming, 2015): en la circulación coronaria humana, los vasodilatadores como la bradiquinina o ACh estimulan la liberación de NO a través de la activación de la eNOS dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina mediante un mecanismo acoplado a receptores de proteína G<sub>q</sub> (Shimokawa et al., 1991; Huang, 2009); el aumento de la liberación de NO mediante la activación inmediata de corrientes de K<sup>+</sup> a través de canales K<sub>Ca</sub> (Olesen et al., 1988; Ohno et al., 1993) seguido de una regulación al alza de los canales de potasio activados por calcio (KCa<sub>2.3</sub> y KCa<sub>3.1</sub>) vía proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina

(Takai et al., 2013); la activación del receptor de potencial transitorio endotelial (TRPV) que conducen al aumento del flujo de calcio y la estimulación de la eNOS (así como al inicio de la relajación mediada por EDH) (Olesen et al., 1988); y la modulación dependiente de caveolas de la transducción de la señal endotelial desde el *shear stress* hasta la producción y liberación de NO (Chai et al., 2013). Sin embargo, el incremento inducido por el *shear stress* en la liberación de NO puede inhibirse mediante la liberación de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) (Chai et al., 2015).

El efecto crónico del *shear stress* se debe a la regulación al alza de la eNOS, por lo que la tirosina quinasa c-Src acelera tanto la transcripción como la activación (fosforilación) de la enzima, dando lugar a una mayor liberación de NO en cada estimulación, explicando los efectos beneficiosos en la función endotelial al practicar deporte de forma regular (Miller & Vanhoutte, 1988). El impacto crónico del *shear stress* en la eNOS implica la transformación del factor de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la consiguiente activación del factor 2 de Krüppel-like (KLF2) (Davies et al., 2013).

Se ha demostrado que las células endoteliales, también de origen humano, contienen todos los ingredientes necesarios para producir y metabolizar la ACh (Olesen et al., 1988). La activación de un sistema endotelial colinérgico no neuronal que actúa de una manera autocrina para inducir la relajación dependiente del endotelio como se observa con frío moderado (Evora et al., 2007; Zou et al., 2015), puede proporcionar finalmente un papel fisiológico para el receptor muscarínico endotelial descubierto hace poco tiempo por Robert Furchgott.

En el humano, el precursor del NO es la L-arginina, un aminoácido semi-esencial ya que puede ser sintetizado de novo o a partir de L-citrulina, por lo que la disminución en la disponibilidad de L-arginina y L-citrulina puede contribuir a la deficiencia de NO (Getz & Reardon, 2006). Sin embargo, la administración de L-arginina puede favorecer las respuestas dependientes del endotelio en los seres humanos (Perticone et al., 2005), pero su suplementación ofrece poco beneficio terapéutico en pacientes con enfermedad vascular (Wilson et al., 2007). Por lo tanto, el aminoácido semiesencial es raro que sea un factor limitante en la producción endotelial de NO (Schini & Vanhoutte, 1991). Las excepciones pueden venir cuando las arginasas endoteliales, que compiten con la eNOS por su sustrato, son más activas (Ming et al.,

2004; Katusic, 2007; Chandra et al., 2012; Yao et al., 2013) o cuando el transportador de L-arginina (transportador de aminoácidos catiónico 1, CAT-1) es deficiente (Martens et al., 2014), aunque la concentración del precursor sea mayor en el medio extracelular que intracelular, pudiendo la misma no ser suficiente para la eNOS (Shin et al., 2011). A juzgar por los estudios de cultivos celulares, la continua exposición a la arginina puede incluso acelerar la senescencia endotelial (Scalera et al., 2009).

La biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH4), un cofactor esencial para la formación del NO por la eNOS, a partir de sepiapterina es catalizada por GTP-ciclohidrolasa I (GTPCH I) (Kang et al., 2011b). Los niveles crónicos bajos de BH4 circulantes disminuyen las relajaciones dependientes del endotelio (Moreau et al., 2012). Del mismo modo, la deficiencia de BH4 causada por la mutación o deleción de esta enzima, reduce las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por el NO, pudiendo revertirse por la administración de sepiapterina. La disminución de la producción de NO se compensa en parte por la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la eNOS desacoplada (Chuaiphichai et al., 2014). La suplementación con BH4 mejora la función endotelial en los animales hipertensos, así como en las mujeres postmenopáusicas (Kang et al., 2011b; Moreau et al., 2012).

Las hormonas sexuales afectan la función de las células endoteliales. Así, relajaciones dependientes del endotelio son más pronunciadas en las arterias de mujeres premenopáusicas que en los hombres (Dantas et al., 2004; Zuloaga et al., 2014), destacando el efecto protector que tienen los estrógenos en este aspecto (Moreau et al., 2012). Del mismo modo, a juzgar por la reducción de la vasodilatación mediada por el flujo, la respuesta endotelial se atenúa en las mujeres postmenopáusicas, una condición que se debe en parte a la deficiencia de BH4 (Moreau et al., 2012), y en parte al desarrollo de la disfunción endotelial. En los modelos experimentales animales, la ovariectomía *per se* no altera ni siquiera aumenta la expresión del mRNA ni la presencia de eNOS (Wassmann et al., 2001; Okano et al., 2006). La reintroducción crónica de los niveles fisiológicos de estrógenos, y la activación resultante del receptor de estrógeno endotelial  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) en los animales ovariectomizados aumentan las relajaciones dependientes del endotelio (Wassmann et al., 2001; Kang et al., 2011a; Chan et al., 2012; Tarhouni et al., 2013; Tarhouni et al., 2014), favorecen la remodelación mediada por el flujo sanguíneo de las arterias de resistencia (Tarhouni et al., 2013) y

aceleran la recuperación endotelial después de la lesión (Filipe et al., 2008). Aunque los efectos endoteliales del estrógeno implican principalmente la activación de la eNOS y una mayor producción de NO, la estimulación del ER $\alpha$  también puede aumentar la producción de prostaciclina y las respuestas mediadas por EDH (Chan et al., 2012; Wong et al., 2014; Kong et al., 2015). Una reducción del estrés oxidativo lleva a un aumento de la biodisponibilidad del NO derivado del endotelio y a un aumento de la respuesta de las células del MLV frente a los estímulos vasodilatadores (Wassmann et al., 2001). En el organismo intacto, una producción reducida del inhibidor endógeno de la eNOS, la dimetil arginina asimétrica (ADMA), puede contribuir a la mejora de la función endotelial gracias a los estrógenos (Monsalve et al., 2007).

Aunque las relajaciones mediadas por EDH también son más pronunciadas en las mujeres que en los hombres (Chan et al., 2012; Wong et al., 2014), es probable que los estrógenos ejerzan un efecto potenciador sobre la liberación de NO (resultado de un menor estrés oxidativo) ayudando a explicar por qué las mujeres están protegidas frente a la enfermedad coronaria, al menos hasta la edad de la menopausia.

Diversas hormonas van a modular también la función endotelial y la síntesis de NO. La insulina aumenta la expresión de la eNOS en células endoteliales nativas *in vitro* (Fisslthaler et al., 2003) y estimula la fosforilación de la enzima (Jang et al., 2013).

El heptapéptido angiotensina (1-7) se forma a partir de angiotensina II mediante la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) y activa los receptores Mas (Carey, 2013). En los seres humanos, la vasodilatación mediada por el flujo se relaciona con los niveles circulantes de angiotensina (1-7) (Sullivan et al., 2015). En las arterias aisladas, tanto la estimulación de ECA2 (usando un activador de molécula pequeña de la enzima *in vitro*) como la angiotensina exógena (1-7) potencian las relajaciones dependientes del endotelio, en particular aquellas inducidas por bradiquinina [debido a que el heptapéptido inhibe la enzima convertidora de angiotensina 1 (ECA1) que es el principal contribuyente de la degradación de la bradiquinina](Raffai et al., 2011). La administración crónica de angiotensina (1-7) reestablece las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por NO en respuesta a la ACh en las arterias de animales alimentados con una dieta rica en sal, un efecto que se debe a la activación del receptor Mas y a la disminución del estrés oxidativo (Raffai et al., 2011; Shenoy et al., 2014). Del

mismo modo, la administración crónica de una pequeña molécula activadora de ECA2 reduce la disfunción endotelial en los animales hipertensos y diabéticos (Shenoy et al., 2013; Shenoy et al., 2014).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) puede estimular la eNOS y el principal efecto de sus inhibidores es la aparición de hipertensión, lo que sugiere un papel fisiológico para el factor de crecimiento manteniendo el control endotelial normal del tono vasomotor (Facemire et al., 2009; Skinner et al., 2014).

La mayoría de los vasos sanguíneos están rodeados por una cantidad variable de tejido adiposo perivascular (PVAT), para proporcionar soporte mecánico para el vaso sanguíneo y servir como reserva de energía (Brown et al., 2014; Oriowo, 2015). Tras la estimulación por una variedad de agonistas o por estimulación eléctrica, el PVAT puede alterar el tono del MLV que rodea liberando factores relajantes derivados de adipocitos (ADRF) (Oriowo, 2015). Estos factores derivados de los adipocitos, denominados adipocinas (proteínas moduladoras que actúan localmente de una manera autocrina/paracrina o sistémicamente como hormonas), son transferibles en varias preparaciones arteriales y también en venas (Gollasch, 2012). Los candidatos propuestos como ADRF incluyen adiponectina, angiotensina 1-7, H<sub>2</sub>S, leptina, metilpalmitato, NO, omentina, prostaciclina y visfatina (Gollasch, 2012; Oriowo, 2015). La naturaleza química exacta del ADRF varía dependiendo del lecho vascular y del animal de interés. Los productos de peroxidación formados en la pared vascular regulan al alza la expresión del gen de la adiponectina en PVAT a través de un mecanismo dependiente del receptor- $\gamma$  de peroxisoma proliferador activado (PPAR $\gamma$ ) (Margaritis et al., 2013). Además, la adiponectina se ha identificado durante mucho tiempo como un sensibilizador de insulina que influye en el metabolismo de la glucosa y la grasa, pero la adipocina también ejerce acciones directas en la pared de los vasos sanguíneos (Xu & Vanhoutte, 2012; Meijer et al., 2013). Se asocia con T-cadherina y se une a los receptores de adiponectina 1 y 2 para moderar la disfunción endotelial (Xu & Vanhoutte, 2012). La adipocina lo hace mediante la inhibición de la quinasa inflamatoria Jun NH<sub>2</sub>-terminal y reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), promoviendo el acoplamiento y la actividad de la eNOS, aumentando la biodisponibilidad de BH<sub>4</sub> y NO, suprimiendo la activación de las células endoteliales y la apoptosis y promoviendo la reparación endotelial (Zhu et al., 2008;

Margaritis et al., 2013; Meijer et al., 2013). Los estudios epidemiológicos en diferentes grupos étnicos han identificado la deficiencia crónica de adiponectina (hipoadiponectinemia) como factor de riesgo independiente de disfunción endotelial, hipertensión, cardiopatía coronaria, infarto de miocardio y otras complicaciones cardiovasculares. La hipoadiponectinemia *per se* (independiente de la diabetes) se asocia con alteraciones de las vasodilataciones dependientes del endotelio mediadas por NO (Zhu et al., 2008).

La eritropoyetina (EPO) reduce el estrés oxidativo y facilita la producción de NO, previniendo de este modo la disfunción endotelial causada por el desacoplamiento de la eNOS tanto *in vivo* como *in vitro* (Yada et al., 2010; Kuriyama et al., 2014). El péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) no sólo mejora la respuesta vasodilatadora a la ACh (Basu et al., 2007), sino que también induce las hiperpolarizaciones y relajaciones dependientes del endotelio (Osto et al., 2015) y aumenta el reclutamiento microvascular dependiente de NO (Z. Dong et al., 2013). El péptido mejora las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por NO (Osto et al., 2015) y regula al alza la actividad y la expresión proteica de la eNOS en las células endoteliales humanas (L. Ding & Zhang, 2012). La inhibición crónica de la enzima responsable de su descomposición, dipeptidil peptidasa-4 (DPP4), corrige la disfunción endotelial (Liu et al., 2012a). En las células endoteliales humanas cultivadas, la melanocortina (una hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$ , MSH) activa los receptores de melanocortina 1 (MC1) produciendo un aumento en la expresión y fosforilación de la eNOS. Además, los seres humanos con una función débil MC1 tienen disminuidas las relajaciones mediadas por el flujo y un incremento en la rigidez arterial (Rinne et al., 2015). Estas observaciones sugieren que la hormona ejerce un papel fisiológico como protector endotelial.

Tanto el ejercicio esporádico como continuado, afectan profundamente a la reactividad vascular en las circulaciones de los músculos esqueléticos y coronarios, a través de la regulación al alza de la liberación de NO y las respuestas mediadas por EDH provocadas por el aumento del flujo sanguíneo y, por tanto, del *shear stress* (Bond et al., 2015).

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) normales se asocian con esfingosina 1-fosfato (S1P) y se unen a los receptores S1P de las células endoteliales, promoviendo la activación de eNOS e induciendo la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Tatematsu et al., 2013). Por lo tanto, altos niveles de HDL van a ser protectores contra la disfunción endotelial y la enfermedad vascular. Sin embargo, los HDL de pacientes con enfermedad coronaria pierden sus propiedades protectoras y se convierten en inhibidores de la eNOS (Kratzer et al., 2014; Lüscher et al., 2014). La ingesta de ácidos grasos  $\omega$ 3-insaturados potencia las relajaciones dependientes del endotelio de las arterias coronarias para evitar la agregación plaquetaria y como medida anti-aterogénica (Shimokawa et al., 1987; Shimokawa et al., 1988b; Sekikawa et al., 2008).

Los inhibidores de las sintasas de NO potencian de forma inmediata las respuestas mediadas por el EDCF (Yang et al., 2002). Esta es la razón por la cual, experimentalmente es común añadir inhibidores de la NOS, tales como la N $\omega$ -Nitro-L-arginina (L-NOARG) a las preparaciones para inhibir la producción de NO y aumentar la amplitud de las contracciones endoteliales. Sin embargo, el efecto del NO no sólo es agudo, sino que la exposición previa al NO endógeno liberado por las células endoteliales o a los donantes de NO exógeno, causa una inhibición a largo plazo de las contracciones derivadas del endotelio (Tang et al., 2005). Estas observaciones implican que cualquier condición que dé como resultado una menor biodisponibilidad del NO, favorecerá la aparición de contracciones mediadas por el EDCF y disfunción endotelial (Vanhoutte et al., 2009; Félétou et al., 2011). Así mismo, el EDCF puede reducir la relajación mediada por el EDRF (por ejemplo, de NO, prostaciclina, y EDH) mediante el incremento del tono en los vasos sanguíneos. En particular, el tromboxano A<sub>2</sub> puede modular varios componentes en la señalización central de la EDH, incluyendo la de la hiperpolarización (tanto de las células musculares lisas endoteliales como vasculares) mediada por la apertura de canales de potasio activados por calcio, así como la posterior conducción de hiperpolarización a través de uniones *gap* (Ellinsworth et al., 2014). Por otro lado, las contracciones dependientes del endotelio se hacen más prominentes con el envejecimiento (Iwama et al., 1992; Matsumoto et al., 2007). La respuesta obtenida en función de la edad, tiene lugar por un aumento del estrés oxidativo que resulta de la regulación al alza de las COX (Matsumoto et al., 2007). Además, se intensifica la expresión del gen de la prostaciclina sintasa con la edad (Numaguchi et al., 1999). Los inhibidores de la COX, administrados tanto *in vivo* como

*in vitro*, previenen o revierten respectivamente, la atenuación de las relajaciones dependientes del endotelio debidas al envejecimiento (Virdis et al., 2013). Por consiguiente, la indometacina aumenta las relajaciones en respuesta a la ACh en las arterias aisladas de los pacientes mayores, así como la respuesta vasodilatadora al agonista muscarínico en el antebrazo de los ancianos, lo que sugiere que la importancia de las respuestas mediadas por el EDCF también aumenta con la edad en humanos (Taddei et al., 1997).

### **1.2.1.2 Peróxido de hidrógeno**

Sustancias como los flavonoides y polifenoles (Xu et al., 2007; Xu et al., 2015; Liu et al., 2015), implicados en el aumento de la biodisponibilidad del NO en respuesta a los vasodilatadores dependientes del endotelio (Jang et al., 2013), presentan efectos protectores frente a la disfunción endotelial además de potenciar las respuestas mediadas por EDH, como resultado de sus propiedades antioxidantes evitando el desacoplamiento de la eNOS (Akar et al., 2011; Gordish & Beierwaltes, 2014), el incremento de los niveles de BH4 (Carrizzo et al., 2013), la fosforilación independiente de Ca<sup>2+</sup> de la eNOS (Ramirez-Sanchez et al., 2011) y la activación de los receptores de estrógenos entre otros procesos (Yurdagul et al., 2014).

El NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hiperpolarizante derivado del endotelio, los cuales provienen en condiciones fisiológicas, de aniones superóxido derivados de la NOS dismutados por la CuZn-SOD endotelial (Morikawa et al., 2003), desempeñan diversos papeles en la modulación del tono vascular en un determinado vaso sanguíneo en función del tamaño. De hecho, el NO es el vasodilatador predominante dependiente de endotelio en arterias de conducto, siendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los vasos de resistencia (Shimokawa, 2014). El mecanismo preciso por el cual el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaja el MLV subyacente, implica la inducción de la proteína quinasa G<sub>1α</sub> (PKG<sub>1α</sub>) dimerización y posterior activación de los canales de potasio activados por calcio de gran conductancia, induciendo la hiperpolarización y vasodilatación en vasos de resistencia murinos, así como en arteriolas coronarias humanas (Burgoyne et al., 2007; Pryszyzhna et al., 2012). Además, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también tiene propiedades vasodilatadoras en vasos coronarios de resistencia, por lo que las vasodilataciones alteradas mediadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conducen a disfunción microvascular coronaria (Crea et al., 2014). Dado que la resistencia vascular coronaria

es ejercida predominantemente por las pre-arteriolas (más de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro) y arteriolas (<100  $\mu\text{m}$ ) donde las respuestas mediadas por EDH se vuelven más importantes que las relajaciones mediadas por NO para el tono vascular, se acepta que la contribución de NO frente a EDH depende del tamaño, lo cual es esencial para el tratamiento de la enfermedad coronaria (Crea et al., 2014). A pesar de que las tres isoformas de NOS que incluyen la NOS neural (nNOS, NOS1), la NOS inducible (iNOS, NOS2) y la NOS endotelial (eNOS, NOS3) se expresan en el sistema cardiovascular, la eNOS es la isoforma de NOS predominante en los vasos sanguíneos (Förstermann & Li, 2011). Las sintasas de NO generan aniones superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) a partir de un dominio reductasa en condiciones fisiológicas (Stuehr et al., 2001), donde los  $\bullet\text{O}_2^-$  se convierten en  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar las respuestas mediadas por EDH. Basándonos en lo mencionado anteriormente, la eNOS puede ser la isoforma más importante en la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /EDH en el endotelio.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  derivado del endotelio actúa como factor EDH induciendo la vasodilatación descrita anteriormente, mientras que también provoca la vasoconstricción dependiente del endotelio mediante la liberación de tromboxano dependiente de la COX en arterias mesentéricas de rata (García-Redondo et al., 2009) y genera vasoconstricción cuando la hiperpolarización está comprometida en arterias mesentéricas de ratón perfundidas (Luccesi et al., 2005). Cuando se habla de ROS, incluyendo al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se considera por lo general que estos mediadores químicos son principalmente perjudiciales. Su función protectora ha atraído la atención en cuanto a la acumulación de pruebas de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  derivado del endotelio, participa en la vasodilatación dependiente del endotelio y por tanto contribuye a la homeostasis vascular a bajas concentraciones fisiológicamente relevantes (Matoba et al., 2000; Matoba et al., 2003; Morikawa et al., 2003; Yada et al., 2006). Según las evidencias científicas disponibles y la hipótesis inicial de la descripción del papel del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la EDH (Matoba et al., 2000; Vanhoutte, 2001), se considera actualmente que  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula de señalización fisiológica que actúa como mediador inductor de la EDH especialmente en la microcirculación y de esta forma modula la presión arterial (Prysyazhna et al., 2012), la vasodilatación coronaria metabólica (Yada et al., 2007) y las funciones metabólicas (Nakajima et al., 2012).

### 1.2.1.3 Prostanoides

Aunque la liberación de factores contráctiles derivados del endotelio (EDCF) puede ser tónica (Iwatani et al., 2008) o provocada por estiramiento repentino (Katusic et al., 1987), generalmente es iniciada por mediadores vasoactivos que actúan en la membrana celular, incluyendo la ACh (activación de receptores muscarínicos M3 endoteliales) (Boulanger et al., 1994) o adenosina di- y trifosfato (activadores de purinoceptores) (Koga et al., 1989). Estos mediadores activan la fosfolipasa A<sub>2</sub> independiente de calcio (iPLA<sub>2</sub>) que produce lisofosfolípidos, que a su vez abren canales de calcio que permiten la entrada de calcio extracelular activando posteriormente la fosfolipasa A<sub>2</sub> dependiente de calcio (cPLA<sub>2</sub>) (Wong et al., 2010a), lo que hace que el ácido araquidónico esté disponible para la COX endotelial, poniendo en marcha la liberación del EDCF. De acuerdo con estos hechos, las contracciones dependientes del endotelio son menos pronunciadas en la solución de baño con bajo contenido de calcio extracelular y están ausentes cuando se eliminan dichos iones (Wong et al., 2009). La reintroducción de calcio en la solución de baño restaura la contracción dependiente del endotelio en respuesta a la ACh (Wong et al., 2009).

La COX transforma el ácido araquidónico en endoperóxidos que se liberan durante las contracciones dependientes del endotelio. Dichos endoperóxidos *per se* pueden activar el MLV y, por lo tanto, se consideran candidatos del EDCF (Hirao et al., 2008). Los endoperóxidos que se difunden desde el endotelio podrían procesarse en prostaciclina en el MLV y luego activar los receptores TP, contribuyendo a la actividad vasoconstrictora de los metabolitos derivados de la COX endotelial (Zhou et al., 2013). Sin embargo, la mayoría de los endoperóxidos se convierten en las células endoteliales en prostaciclina, tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o prostaglandina F<sub>2α</sub> por sus correspondientes sintasas (Bos et al., 2004). Además, los estudios en arterias renales humanas confirman que la COX-2 endotelial, cataliza la formación de prostaglandina F<sub>2α</sub>, que es el EDCF predominante en esta preparación (Wong et al., 2009). Por lo tanto, la naturaleza de los EDCF varía entre las especies y los lechos vasculares. La expresión relativa de las distintas sintasas de prostaglandinas, el grado de estrés oxidativo y los mediadores vasoactivos implicados están entre algunos de los factores que pueden influir en la naturaleza química del (los) prostanoides que desencadenan las contracciones endoteliales. Las contracciones dependientes de la

COX derivadas del endotelio son inhibidas por los antagonistas de los receptores TP (Yang et al., 2003). Los receptores TP implicados son los del MLV e inician la respuesta contráctil (Yang et al., 2003). Es importante destacar, que la acidificación intracelular de las células endoteliales y las células del músculo liso inhibe la actividad de la eNOS y la relajación dependiente del endotelio (Boedtkjer et al., 2011).

#### 1.2.1.4 Endotelina-1

La ET-1, primer miembro de la familia de péptidos ET-1 inicialmente identificado en las células endoteliales (Yanagisawa et al., 1988), es un potente péptido vasoconstrictor y la isoforma más abundante en el sistema cardiovascular (Schiffrin, 1999). La ET-1 interactúa con dos receptores acoplados a proteínas G denominados ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Masaki et al., 1994). Tanto los receptores ET<sub>A</sub> como ET<sub>B</sub> están localizados en las células musculares lisas vasculares donde ejercen su acción vasoconstrictora, proliferativa e hipertrófica, pero en las arterias, predomina la acción vasoconstrictora del receptor (Rubanyi & Polokoff, 1994). En la pared vascular, los receptores ET<sub>B</sub> se expresan principalmente en las células endoteliales y su activación se asocia con la liberación del NO antiagregante, vasodilatador y antiproliferativo y la prostaciclina (De Nucci et al., 1988). Tanto *in vivo* como *in vitro*, estos efectos endoteliales de la ET-1 contrarrestan los efectos de la estimulación ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> sobre las células del MLV. Además de las células endoteliales, el receptor ET<sub>B</sub> se encuentra altamente expresado en el conducto colector renal donde contribuye a la regulación de la excreción de sodio y por lo tanto al mantenimiento de la presión arterial (Kohan et al., 2011). La estimulación de la producción del NO inhibe la expresión y la producción de ET-1 (Vanhoutte, 2000). Además, la vasoconstricción potente y sostenida ejercida por este péptido es totalmente inhibida tanto por el NO exógeno como por el NO derivado del endotelio, de manera dependiente de cGMP (Lillestol et al., 1998). Finalmente, cuando se libera, la ET-1 activa los receptores endoteliales ET<sub>B</sub> cercanos, los cuales están asociados a la producción de NO, incluso en las arterias coronarias humanas (Halcox et al., 2007). Por lo tanto, en condiciones normales, cualquier sobreproducción de ET-1 estaría compensada por el incremento de la liberación de NO, que disminuye la formación del péptido y reduce sus efectos vasoconstrictores y estimuladores del crecimiento (Vanhoutte, 2000). *In vivo*, el aumento sostenido de la presión arterial provocado por la administración puntual o crónica de varios inhibidores de la NOS se

reduce mediante antagonistas de  $ET_A$ , lo que confirma el papel del NO en la regulación de la liberación y la acción vasoconstrictora de la ET-1 (Banting et al., 1996). En seres humanos sanos, la inhibición sistémica de  $ET_B$  aumenta la resistencia periférica y la presión arterial (Strachan et al., 1999). En la mayoría de los estudios con sujetos sanos, la administración periférica de un antagonista de  $ET_A$  (generalmente BQ123) aumenta el flujo sanguíneo del antebrazo (McAuley et al., 2000), una respuesta que se ve atenuada por un antagonista de  $ET_B$  o un inhibidor de la NOS (Verhaar et al., 1998). Estos resultados sugieren que la producción y liberación constitutiva de ET-1, a través de una acción equilibrada sobre sus dos receptores, contribuye a la regulación del flujo sanguíneo regional y de la presión arterial (Vanhoutte et al., 2017).

### 1.2.2 Disfunción endotelial y enfermedad vascular

A pesar de que el endotelio se adapta a diversos estímulos en los que se incluyen el estrés mecánico, oxidativo y metabólico, la inflamación y la hipoxia, la disfunción endotelial es un evento vascular previo patológico en la disfunción vascular y representa una mala adaptación endotelial fenotípica que deriva en una disminución de la vasodilatación, la angiogénesis y la función barrera junto con la expresión elevada de los factores pro-inflamatorios y pro-trombóticos (Bakker et al., 2009; Vanhoutte et al., 2009). La disfunción endotelial se ha atribuido, entre otros factores, a la deficiencia de NO la cual se atribuye a diversos mecanismos potenciales que incluyen la disminución en la expresión y actividad de la enzima eNOS, el desacoplamiento de la misma debido a la falta de sustrato o cofactores y al incremento de la producción de  $\bullet O_2^-$  (Prieto et al., 2013).

Las células endoteliales cuentan con varias enzimas capaces de generar  $\bullet O_2^-$  entre las que se incluyen: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa-Nox), XO, COX y la propia eNOS, cuando se desacopla por la falta de sustrato (L-arginina) o la escasez de BH4 (Stuehr et al., 2001). Sin embargo, cantidades fisiológicas de radicales libres derivados de oxígeno (ROS) originados por la mitocondria, pueden activar la eNOS aumentando la producción de NO y favoreciendo las relajaciones dependientes de endotelio (Feng et al., 2010). Además, los  $\bullet O_2^-$  pueden dismutarse por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) a  $H_2O_2$ , el cual actúa como EDHF contribuyendo también a dichas relajaciones endoteliales. Sin

embargo, en condiciones patológicas, los  $\bullet\text{O}_2^-$  van a interactuar con el NO para dar lugar a peroxinitrito (Rubanyi & Vanhoutte, 1986; Miyagawa et al., 2007), reduciendo considerablemente la biodisponibilidad de NO (Montezano & Touyz, 2012). Además, las ROS producen la S-glutacionión de la eNOS inactivándola (Zhang et al., 2011). Aumentos en el estrés oxidativo [iniciado por ejemplo por la angiotensina II (Sasser et al., 2014), mercurio (Furieri et al., 2011), arsénico (Ellinsworth, 2015), 20-HETE (Cheng et al., 2012a),  $\beta$ -sitosterol (Yang et al., 2013), factor de crecimiento de fibroblasto 23 (Silswal et al., 2014), testosterona (Costa et al., 2015) o contaminación (Wauters et al., 2013)] están asociados con relajaciones dependientes del endotelio disminuidas. La inducción o sobreexpresión de HO-1 o el aporte exógeno de antioxidantes mejoran las relajaciones dependientes de endotelio (Cao et al., 2012), bien favoreciendo las respuestas mediadas por la EDH (Li et al., 2013) o bien evitando las contracciones dependientes del endotelio (Tang & Vanhoutte, 2009).

Por otro lado, la hipercolesterolemia tanto en seres humanos como en animales en general y altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) van acompañados de una disminución de las relajaciones dependientes de endotelio y dicha respuesta se restaura al normalizar los niveles de colesterol mediante tratamiento (Shimokawa & Vanhoutte, 1989; Vanhoutte, 1991). En la mayoría de los casos, los animales y humanos obesos muestran reducidas las relajaciones dependientes de endotelio mediadas por NO debido al aumento en la producción de ROS y a una menor fosforilación de la eNOS (Villalba et al., 2009; Cao et al., 2012; Prieto et al., 2013; Schäfer et al., 2013). La supresión del receptor de tipo Toll 4 (TLR4) o la sobreexpresión específica de los adipocitos de HO-1 atenúan la disfunción endotelial inducida por una dieta rica en grasas (Cao et al., 2012). Por otro lado, la obesidad inducida por dieta contribuye a la disfunción endotelial, donde las relajaciones mediadas por la EDH están alteradas, hay una mayor liberación de prostanoides vasoconstrictores derivados del endotelio (Schäfer et al., 2013) y el sistema de ET-1 se encuentra regulado al alza (Virdis et al., 2013). En este caso, se mejoran las respuestas dependientes de endotelio al perder peso y practicar ejercicio físico (Ungvari et al., 2008).

Ciertas adipocinas, cuando se liberan excesivamente a partir de tejido adiposo inflamado, en particular del PVAT, pueden reducir las relajaciones dependientes del endotelio. La quemerina a concentraciones bajas induce relajaciones dependientes del

endotelio, pero a altas concentraciones aumenta la producción de ROS (y por lo tanto disminuye la biodisponibilidad de NO). También puede provocar la contracción de las células musculares lisas vasculares al aumentar los niveles de calcio intracelular, una respuesta que se magnifica en la obesidad (Neves et al., 2015). Del mismo modo, aunque en condiciones fisiológicas, la leptina puede favorecer las respuestas relajantes endoteliales *ex vivo* mediante el incremento de la producción de NO (y EDH) (Schinzari et al., 2013; Jamroz-Wiśniewska et al., 2014), cuyo efecto no se observa en los pacientes con síndrome metabólico (Schinzari et al., 2013). Sin embargo, la hiperleptinemia reduce los niveles intracelulares de L-arginina y disminuye la biodisponibilidad de NO por aumento del estrés oxidativo que conduce al agotamiento del NO endotelial, al desacoplamiento de la eNOS y aumenta los niveles de peroxinitrito (Korda et al., 2008). La administración *in vivo* de la lipocalina-2 exógena reduce las relajaciones dependientes del endotelio a la insulina *ex vivo* (Liu et al., 2012b). La resistina también puede contribuir a la disfunción endotelial aumentando el estrés oxidativo y activando la proteína quinasa c-Jun NH2 terminal y la activada por mitógeno p38, dando lugar a la reducción de la expresión de eNOS y la producción de NO (Jamaluddin et al., 2012). La visfatina inhibe las relajaciones dependientes del endotelio mediante la estimulación de la Nox y aumenta la producción de ROS (Vallejo et al., 2011). Además de la interferencia con la función endotelial, las adipocinas liberadas del PVAT también reducen la capacidad del MLV para relajarse en respuesta a la adenosina (Noblet et al., 2015).

Los tejidos adiposos pueden producir ROS y así contribuir a la disfunción endotelial. Las subunidades de la Nox están localizadas en el citoplasma y la membrana celular de los adipocitos del PVAT (Gao et al., 2006; Wang et al., 2014a). La producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  por el PVAT es inhibida por difenilil iodonio (DPI) y potenciada por el estimulador de la enzima NADH (Gao et al., 2006). La formación de  $\bullet\text{O}_2^-$  estimulados en el PVAT puede reducir la biodisponibilidad de NO derivado del endotelio, llevando de este modo a un aumento en el tono vascular (Wang et al., 2014a). Las ROS derivadas del PVAT también modulan la liberación de adipocinas y aumentan la capacidad de respuesta de las células del MLV al EDCF reduciendo la renovación de los receptores TP (Wang et al., 2004). Finalmente, perjudican la señalización de adiponectina que normalmente aumenta la generación de NO y las relajaciones dependientes del endotelio (Wang et al., 2014a). Así, las ROS producidas

por el PVAT aumentan las contracciones dependientes del endotelio. Además de producir ROS, los tejidos adiposos, en particular el PVAT, pueden facilitar las contracciones de las células del MLV que rodean liberando mediadores de contracción derivados de adipocitos, incluyendo lipocalina-2, resistina, calpastatina, chemerina, angiotensinógeno, prostanoides vasoconstrictores, aniones superóxido y ET-1 (Gollasch, 2012). La ingesta elevada de grasas y la obesidad potencian la aparición de respuestas mediadas por el EDCF, posiblemente debido a la resistencia a la insulina, dando como resultado una mayor producción de radicales libres derivados del oxígeno, una regulación al alza de la expresión de los receptores TP y desencadenan la producción de ET-1 (Gollasch, 2012). La potenciación de las contracciones dependientes del endotelio en la obesidad, además del papel del PVAT, puede atribuirse a la activación de TLR4 por ácidos grasos saturados y/o lipopolisacáridos de endotoxina bacteriana (Liang et al., 2013). De hecho, la delección del TLR4 protege a los ratones contra la disfunción endotelial derivada de la obesidad, ya sea genéticamente o inducida por la dieta, tanto por potenciar relajaciones dependientes del endotelio como por disminuir las contracciones dependientes del endotelio (Liang et al., 2013). La activación del TLR4 promueve la transcripción de Nox1 y Nox4, generando una producción elevada de ROS; el aumento del nivel de ROS favorece el desacoplamiento de la eNOS, disminuye la producción de NO y su biodisponibilidad, altera las respuestas mediadas por la EDH y aumenta la actividad de COX-1 aumentando las contracciones mediadas por el EDCF (Liang et al., 2013).

En los animales y seres humanos obesos, el síndrome metabólico se caracteriza por la resistencia a la insulina, disminuyendo las relajaciones dependientes de endotelio mediadas por el NO debido a la reducción de la fosforilación de la eNOS (Osto et al., 2015). La disfunción endotelial y/o la resistencia a la insulina que acompaña a la obesidad, al síndrome metabólico y a la diabetes se ha atribuido a: una mayor producción de ROS por la Nox que conduce a daños en los receptores de insulina (Du et al., 2013), aumento de la fosforilación del sustrato de insulina (IRS)-1 en Ser307 (Nemoto et al., 2011), reducción de la producción de EETs por la CYP450 y aumento de la degradación de los ácidos grasos epóxicos por la sHE (Roche et al., 2015), regulación al alza de la proteína quinasa 2 acoplada a proteína G (GRK2) (Taguchi et al., 2014), sobreexpresión de la proteína quinasa C- $\beta$  (PKC $\beta$ ) e inducción de la expresión de ET-1 en el endotelio (Tabit et al., 2013), regulación al alza del factor de

transcripción FOXO-1 (Karki et al., 2015), activación pronunciada de los MR endoteliales por aldosterona (Schäfer et al., 2013), hipoadiponectinemia que desencadena la reducción en la regulación de la proteína adaptadora que media la señalización de la adiponectina (APPL1) (Xing et al., 2013), incremento de la actividad de la ECA1 (Feher et al., 2013), aumento de la producción del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) por el PVAT (Viridis et al., 2011), sobreactivación de TLR4 (Liang et al., 2013) y regulación a la baja de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) en las células del MLV (Cheng et al., 2014).

Cuando los niveles de homocisteína se encuentran elevados, se ven afectadas las vasodilataciones dependientes de la eNOS tanto *in vitro* como *in vivo*, presuntamente debido a la regulación al alza de la sEH y al incremento del estrés oxidativo (Heil et al., 2004; Zhang et al., 2012a) inhibiendo las relajaciones mediadas por la EDH (Heil et al., 2004). Por otro lado, la falta de ácido úrico conduce a la disfunción del transportador 1 de ácido úrico (URAT1) provocando disfunción endotelial en aquellos pacientes con hipouricemia debido a una vasodilatación mediada por flujo reducida (Sugihara et al., 2015).

Tanto en animales hipertensos como en seres humanos, la reducción de la biodisponibilidad de NO en respuesta a estímulos dependientes de endotelio se ha atribuido a mayores niveles circulantes de ADMA (Perticone et al., 2005). La aparición de disfunción en la vía del NO acompañada de un aumento en la presión arterial puede prevenirse mediante: activación de la quinona oxidoreductasa de la NADPH (Kim et al., 2011a), aumentando los niveles de BH4 (Kang et al., 2011b), inhibición de la arginasa (Johnson et al., 2005), activación de los canales TRPV1 (Hao et al., 2011), reducción de la señalización del TLR4 (Sollinger et al., 2014), mutación con cambio de sentido de la SOD extracelular (Beyer et al., 2014), supresión heterogénea de GRK2 (Avendaño et al., 2014), delección de caveolina-1 (Rath et al., 2009), activación de la ECA2 (Fraga-Silva et al., 2013), o transferencia genética de la variante asociada a la longevidad de BPIFB4 (Villa et al., 2015). Por el contrario, la aparición de disfunción endotelial asociada a hipertensión puede precipitarse por: deficiencia de histona dimetilasa (Pojoga et al., 2011), delección de la peptidil prolyl cis-trans isomerasa (Chiasson et al., 2011), delección de collectrina (homólogo de la ECA2) (Cechova et al., 2013), incremento del estimulante RhoA de la Rho-quinasa (por administración de

interleucina-17A) (Nguyen et al., 2013), delección de  $\alpha$ -CGRP (Smillie et al., 2014), supresión de proteína Rap1b (Lakshmikanthan et al., 2014), delección específica de endotelio de quinasa hepática B1 (LKB1) o administración de pentraxina 3 (PTX3) (Carrizzo et al., 2013). Además, en seres humanos que presentan hipertensión la disminución en la capacidad de respuesta de la ACh puede corregirse mediante la inhibición de las COXs (Virdis et al., 2013). En obesos hipertensos la regulación al alza del sistema de la ET-1 también participa en la disfunción endotelial (Cardillo et al., 2004). Las relajaciones dependientes del endotelio a la ACh se reducen y las contracciones dependientes del endotelio a la ACh son más pronunciadas en las arterias de la rata espontáneamente hipertensa (SHR) que en las de la WKY normotensa (Lüscher & Vanhoutte, 1986). Estos cambios pueden evitarse por los inhibidores de la COX y antagonistas de los receptores TP. El aumento de la producción de prostaglandinas vasoconstrictoras también contribuye a la disfunción endotelial provocada por el aumento de los niveles circulantes de aldosterona (Xavier et al., 2008). El aumento de la concentración intracelular de calcio endotelial causada por la ACh es mayor en las arterias de la SHR que en las de la WKY (Tang et al., 2007) y además, en la aorta de la cepa hipertensa se incrementa la expresión de COX-1 (Tang & Vanhoutte, 2008a). Estos resultados llevan a la conclusión de que la sobreexpresión de la enzima en las arterias de animales adultos hipertensos refleja el envejecimiento prematuro del endotelio en lugar de una predisposición genética. La producción de ROS endoteliales es también mayor en las arterias de la SHR que en las de la WKY (Tang et al., 2007), lo que implica que se favorezcan las respuestas mediadas por el EDCF. La expresión del gen de la prostaciclina sintasa es más abundante en las células endoteliales de la SHR que en el endotelio de la WKY, y la presencia de la proteína de la enzima se ve aumentada por la hipertensión (Tang & Vanhoutte, 2008a). Esto sugiere entonces que las respuestas mediadas por el EDCF también forman parte de la disfunción endotelial en la hipertensión en seres humanos.

En arterias de animales y seres humanos diabéticos la fosforilación de la eNOS está disminuida y las relajaciones dependientes de endotelio mediadas por NO están alteradas, como resultado de una situación de hiperglucemia crónica y la aparición de resistencia a la insulina (Sena et al., 2011; Tian et al., 2014). El proceso por el cual disminuyen las relajaciones dependientes de NO en diabetes incluye: reducción de la biodisponibilidad de BH4 y presencia de la eNOS desacoplada (Pannirselvam et al.,

2002), incremento de la actividad de la arginasa como resultado del aumento de la actividad de la Rho-quinasa (Ming et al., 2004; Yao et al., 2013), niveles elevados de ADMA (Lin et al., 2002), aumento de la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  y su unión al NO para aumentar la presencia de peroxinitrito (Pannirselvam et al., 2002; Sena et al., 2011), activación del NF $\kappa$ B (Liu et al., 2015), supresión de KLF2 por FOXO1 (Lee et al., 2013), regulación a la baja de la molécula de interacción con el estroma 1 (STIM1) y la proteína sarcoplásmica del retículo endoplasmático 3 causando una deficiencia del calcio intracelular endotelial (Estrada et al., 2012), sobreexpresión de los receptores RAGE y extinción de NO por productos de glicosilación avanzada (Tian et al., 2014), reducción de la presencia de apelina (Zhong et al., 2007), alteración del metabolismo en las células endoteliales (De Zeeuw et al., 2015), disminución de la secreción de adiponectina por el PVAT (Meijer et al., 2013). La disfunción endotelial diabética puede ser favorecida por la delección de la ECA2 (Patel et al., 2012) y la expresión de p22 $phox$  provocando disfunción a través de la señal extracelular regulada por la quinasa 1/2 (ERK1/2) y el mecanismo dependiente de la proteína quinasa activada por el mitógeno (MAPK) p38 (Kassan et al., 2014). Además de la reducción de la biodisponibilidad del NO, la alteración de las respuestas EDH y la producción de prostanoideos principalmente vasoconstrictores derivados del endotelio, posiblemente también la tetrafosfato adenosina (Up4A) (Matsumoto et al., 2014) y la ET-1 contribuyen a la disfunción endotelial en la diabetes. La hiperglucemia aumenta la expresión de ET-1 y su producción constitutiva por las células endoteliales (Park et al., 2000) y los niveles plasmáticos de ET-1 están elevados en pacientes con diabetes (Schneider et al., 2002). Además, en los pacientes con diabetes, la ET-1 endógena contribuye al mantenimiento del tono vascular basal y a la disfunción endotelial (Rafnsson et al., 2012). En estos pacientes, los antagonistas selectivos de ET<sub>A</sub> y ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub> mejoran las vasodilataciones dependientes del endotelio, mientras que el bloqueo de únicamente el ET<sub>B</sub> aumenta el flujo sanguíneo basal sin mejorar las respuestas dependientes del endotelio (Rafnsson et al., 2014). La ET-1 es un potente vasoconstrictor en el riñón y por lo tanto puede tener acciones opuestas sobre el agua y la regulación del sodio. La estimulación del ET<sub>B</sub> en el conducto colector impide la reabsorción de agua y sodio y por lo tanto la expansión volumétrica, la ET-1 contribuye también al tono de las arteriolas glomerulares aferentes y eferentes. Una vasoconstricción prolongada de estas arterias, predominantemente por la vía de activación de ET<sub>A</sub>, produce una disminución en el

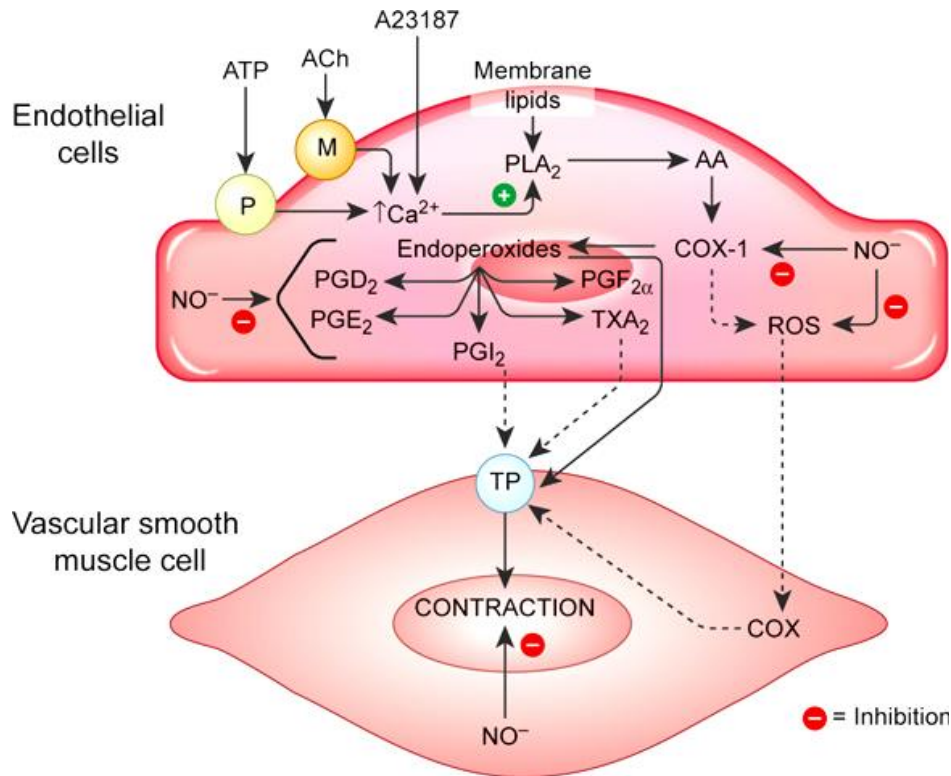
FSR y una reducción en la tasa de FGR asociada con una fracción de filtración incrementada, que conduce a la reabsorción de sodio y agua (Laffin & Bakris, 2015). Adicionalmente, la ET-1 aumenta la formación vascular de ROS, es un agente pro-inflamatorio y pro-fibrótico y promueve la remodelación vascular (Sánchez et al., 2014). Estos fenómenos están asociados con la hipertensión y la disfunción endotelial (Sandoval et al., 2014). La ET-1, a parte de su función como un péptido vasoactivo juega también un papel crucial en el proceso aterogénico mediante la mejora de la mitogénesis, induciendo la formación de la matriz extracelular y contribuyendo al desarrollo de la inflamación dentro de la pared de los vasos sanguíneos (Schiffrin, 1999). Por lo tanto, la ET-1 ha estado implicada en la generación de aterosclerosis (Bacon et al., 1996) y en la fisiopatología de numerosos trastornos de las arterias coronarias, incluyendo la disfunción endotelial coronaria (Lerman et al., 1995), el espasmo coronario (Toyo-oka et al., 1991), el infarto de miocardio (Miyachi et al., 1989) y la lesión de reperfusión miocárdica (Tamareille et al., 2013). La ET-1 induce la disfunción endotelial por la interferencia con la glucosa y el metabolismo de los lípidos, el aumento del estrés oxidativo, la interrupción de la vía del NO y la aceleración de los procesos inflamatorios (Kolettis et al., 2013). Sin embargo, en los pacientes con aterosclerosis, se incrementa la contribución de ET-1 endógena a la constricción activa de las arterias coronarias, especialmente en los sitios de estenosis (Kinlay et al., 2001).

La reducción en la generación de señales relajantes junto con el aumento de la secreción de EDCFs son las principales características de la disfunción endotelial (Wong & Vanhoutte, 2010). Aunque las células endoteliales pueden producir ET-1 (Yanagisawa et al., 1988; Vanhoutte, 1993) y otras sustancias vasoconstrictoras no prostanoideas (Cosentino et al., 1994), la evidencia científica sugiere que en la mayoría de las circunstancias (excepto en el caso de la resistencia a la insulina), las prostaglandinas vasoconstrictoras producidas por la COX en el endotelio son las responsables de las contracciones dependientes del endotelio (Félétou et al., 2011). La naturaleza del EDCF específico que desencadena las contracciones dependientes del endotelio depende en gran medida de la etiología de la enfermedad, de la especie animal escogida o del lecho vascular específico elegido para el estudio. Las contracciones dependientes del endotelio son más prominentes en las arterias de animales envejecidos, obesos o enfermos (por ejemplo, en hipertensión o en diabetes)

y en seres humanos en los que la función endotelial está alterada (Tang & Vanhoutte, 2010). Sin embargo, la aparición de contracciones dependientes del endotelio también puede ocurrir en arterias y venas de sujetos jóvenes y sanos (Wong et al., 2009).

Se han observado contracciones endoteliales dependientes de COX en respuesta a la ACh y otras sustancias vasoactivas (por ejemplo, ácido araquidónico, ATP, el ionóforo de calcio A23187) en vasos sanguíneos de diferentes especies (Lüscher & Vanhoutte, 1990). De hecho, la mayoría de las contracciones dependientes del endotelio se evitan por inhibidores no selectivos de COXs (Miller & Vanhoutte, 1985), mostrando el papel central de estas enzimas en el fenómeno. Los estudios de bioensayo indicaron que los prostanoïdes vasoconstrictores implicados son producidos por la COX endotelial en lugar de la del MLV (Yang et al., 2003). Se han identificado dos isoformas de la enzima en los vasos sanguíneos (Félétou et al., 2011). La COX-1 se expresa constitutivamente, mientras que la COX-2 es altamente inducible (Pritchard et al., 1994). Usando inhibidores selectivos de las dos isoformas de la enzima, experimentos de biología molecular y estudios con vasos sanguíneos de ratones genéticamente modificados, con los resultados obtenidos se sugiere que la COX-1 es la fuente principal del EDCE, al menos en las arterias de ratón (Zhou et al., 2013) y en la aorta de SHR y ratas diabéticas (Yang et al., 2003; Viridis et al., 2013). En estas arterias, la expresión de COX-1 está regulada al alza, lo que facilita la producción aumentada de prostanoïdes vasoconstrictores en el endotelio que se difunden para contraer el MLV subyacente (Tang & Vanhoutte, 2009). Las consecuencias de dicha regulación de la expresión de COX-1 en estas arterias pueden ser revertidas por inhibidores selectivos de esta isoforma. Sin embargo, en condiciones patológicas, incluyendo hipertensión, diabetes y obesidad, la expresión de COX-2 en las arterias se regula al alza (Pritchard et al., 1994). Además, la expresión de COX-2 aumenta con la edad y con el *shear stress* resultante del aumento del flujo pulsátil (Hendrickson et al., 1999). La COX-2 también se puede expresar constitutivamente, como es el caso del endotelio de las arterias renal, pulmonar y humana de rata y en células endoteliales cultivadas (Baber et al., 2003). En las situaciones en que la COX-2 endotelial está presente o inducida, los prostanoïdes generados por esta isoforma pueden provocar contracciones dependientes del endotelio, las cuales, se inhiben selectivamente por inhibidores de la COX-2, indicando que las contracciones dependientes del endotelio están mediadas por la regulación al alza de la COX-2 (Blanco-Rivero et al., 2005; Sánchez et al., 2010a; Liu et al., 2015). En la

hipertensión humana, la COX-2 está sobreexpresada y parece ser la principal isoforma responsable de la disfunción endotelial (Viridis et al., 2013). Por lo tanto, ambas isoformas COX pueden generar contracciones dependientes del endotelio (Vanhoutte, 2013).



**Figura 7.** Se ha propuesto que la contracción dependiente del endotelio esté compuesta por dos componentes: la generación de prostanoideos y ROS. Cada componente depende de la actividad de la COX-1 endotelial y de la estimulación de los receptores TP localizados en el músculo liso para inducir la contracción. AA, ácido araquidónico; ACh, acetilcolina; M, receptores muscarínicos; P, receptores purinérgicos; PGD<sub>2</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>; PGF<sub>2α</sub>, prostaglandina F<sub>2α</sub>; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>; ROS, especies reactivas del oxígeno; TXA<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>. Tomado de Vanhoutte et al., (2017).

Por otro lado, la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), que se consideraba que participaba sobre todo en el desarrollo embrionario y la formación de huesos y cartílagos, ejerce una amplia gama de actividades fisiopatológicas, incluyendo el comienzo y el mantenimiento de la disfunción endotelial (Wong et al., 2010b). Las enfermedades caracterizadas por un aumento de la producción de ROS (por ejemplo, en cánceres e hipertensión) van acompañadas de un incremento de los niveles celulares y circulantes de BMP4 (Guo & Dong, 2014). En el ratón, la infusión de BMP4 exógena perjudica las relajaciones inducidas por ACh *ex vivo* a través de la estimulación de la Nox, lo que conduce a la sobreexpresión de la COX-2 dependiente de ROS en las células endoteliales y produciendo la aparición de contracciones dependientes del

endotelio (Wong et al., 2010b). Dicha disfunción endotelial inducida por BMP4 está ausente en ratones deficientes de COX-2, apoyando este hecho que la isoforma inducible de COX es responsable de las relajaciones anormales dependientes del endotelio y del predominio de las respuestas mediadas por el EDCF (Wong et al., 2010b). El papel de la BMP4 estimulando la expresión de COX-2 mediante el aumento de la producción de ROS, también se ha confirmado en arterias de ratas hipertensas y en seres humanos, ya que la nogina, un antagonista de BMP4, mejora la función endotelial y reduce la expresión tanto de BMP4 como de COX-2 en arterias renales de ratas hipertensas y en pacientes humanos (Wong et al., 2010b).

La aspirina y el inhibidor del receptor TP terutrobán mejoran las respuestas a los estímulos de los vasodilatadores dependientes del endotelio en pacientes con CAD, lo que sugiere que los prostanoides derivados del endotelio contribuyen a la disfunción endotelial resultado de la enfermedad (Husain et al., 1998). La hipoxia es un importante regulador al alza de la síntesis de ET-1, aumentando la expresión génica del péptido en células endoteliales animales y humanas y aumentando su liberación en diversos lechos vasculares *in vivo* y, por lo tanto, incrementando también sus niveles circulantes (RaKugi et al., 1990).

Finalmente, la disfunción endotelial es una manifestación previa a la disfunción vascular que precede a complicaciones cardiometabólicas y resistencia a la insulina. Por dicho motivo, se propone una terapia combinada entre programas educativos efectivos y tratamientos farmacológicos que reduzcan el estrés oxidativo (Pierce et al., 2009) y la inflamación para prevenir complicaciones metabólicas y cardiovasculares asociadas a la obesidad (Prieto et al., 2013).

### 1.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

El aumento de los niveles de ROS juega un papel importante en la regulación del tono vascular y en la disfunción endotelial. Los aniones  $\bullet\text{O}_2^-$  inactivan eficazmente el NO, reduciendo así su biodisponibilidad y favoreciendo la aparición de contracciones dependientes del endotelio (Miyagawa et al., 2007). En particular, en condiciones de un elevado estrés oxidativo (por ejemplo, en presencia de altos niveles de glucosa), el  $\text{ONOO}^-$  se forma por la reacción de NO con aniones  $\bullet\text{O}_2^-$ , lo que conduce a la nitración de tirosina y posterior inactivación de la PGIS (Zou et al., 2002),

originando una producción compensatoria de prostaglandina  $E_2$  y  $F_{2\alpha}$  que posteriormente son responsables de las contracciones dependientes del endotelio (Gluais et al., 2005).

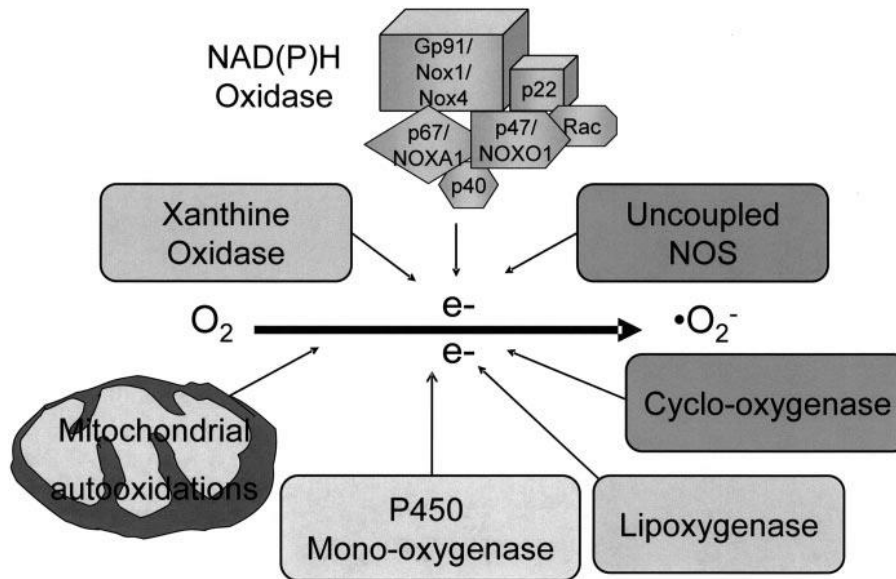
### 1.3.1 Generación y metabolismo de las ROS en la pared vascular

La familia ROS comprende muchas moléculas que tienen efectos diversos sobre la función celular, como la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, la modulación de la producción y descomposición de la matriz extracelular, la inactivación del NO y la estimulación de muchas quinasas y genes proinflamatorios (Mueller et al., 2005; Touyz, 2005; Harrison et al., 2006). Es importante destacar que muchas de estas acciones están asociadas con cambios patológicos observados en las enfermedades cardiovasculares. El término "estrés oxidativo" describe condiciones que implican un aumento de los niveles de ROS. Las ROS, también denominadas "especies derivadas del oxígeno" u "oxidantes", se producen como sustancias intermedias en las reacciones de reducción-oxidación (redox) que llevan el  $O_2$  a  $H_2O$ . Las ROS son entidades químicas reactivas que comprenden dos grupos principales: radicales libres (por ejemplo,  $\bullet O_2^-$ ,  $\bullet OH$ , NO) y derivados no radicales de  $O_2$  (por ejemplo,  $H_2O_2$ , ONOO $^-$ ) (Fridovich, 1997; Dröge, 2002). Un radical libre es cualquier especie capaz de existir de manera independiente que se compone de uno o más electrones no emparejados. El electrón desemparejado genera una elevada reactividad que hace inestable al radical. Los derivados que no tienen radicales son menos reactivos y más estables con una semivida más larga que los radicales libres. De las ROS generadas en las células cardiovasculares, el  $\bullet O_2^-$  y  $H_2O_2$  parecen ser particularmente importantes. En los sistemas biológicos, el  $\bullet O_2^-$  dura muy poco debido a su rápida reducción a  $H_2O_2$  por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Johnson & Giulivi, 2005). La carga negativa del anión superóxido hace que sea incapaz de cruzar las membranas celulares, excepto a través de canales iónicos. En contraste, el  $H_2O_2$  tiene una vida útil más larga que el  $\bullet O_2^-$ , es relativamente estable y se difunde fácilmente dentro y entre células. La principal fuente de  $H_2O_2$  en el tejido vascular es la dismutación del  $\bullet O_2^-$  pudiendo ser dicha reacción espontánea o catalizada por la SOD, de la cual hay tres isoformas en mamíferos: SOD de cobre/zinc (Cu-Zn SOD, SOD1), SOD mitocondrial (Mn SOD, SOD2) y SOD extracelular (ecSOD, SOD3) (Faraci & Didion, 2004; Mendez et al., 2005). La principal SOD vascular es eSOD. Las distintas propiedades entre el  $\bullet O_2^-$  y

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sus diferentes sitios de distribución significan que distintas ROS pueden activar diferentes vías de señalización, lo que conduce a respuestas funcionales divergentes y potencialmente opuestas. Por ejemplo, los niveles incrementados de  $\bullet\text{O}_2^-$  inactivan el vasodilatador NO que conduce a disfunción endotelial y vasoconstricción, característica de muchas enfermedades vasculares, incluida la hipertensión (Cai & Harrison, 2000; Tabet et al., 2004). Por otra parte, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como vasodilatador en algunos lechos vasculares, incluyendo arterias cerebrales, coronarias y mesentéricas (Matoba et al., 2000; Liu et al., 2003; Paravicini et al., 2004).

Las ROS son producidas por todos los tipos de células vasculares, incluyendo las células endoteliales, músculo liso y capa adventicia, y puede ser formadas por numerosas enzimas. Las fuentes enzimáticas de ROS que son importantes en la enfermedad vascular y la hipertensión son la XO, la NOS desacoplada y la NADPH oxidasa. La XO, que cataliza la oxidación de la hipoxantina y la xantina para formar  $\bullet\text{O}_2^-$ , está presente en el endotelio vascular (Lacy et al., 1998). Aunque el  $\bullet\text{O}_2^-$  derivado de la XO ha sido estudiado principalmente en el contexto de la enfermedad cardíaca, hay evidencias que sugieren su implicación en la disfunción vascular en la hipertensión. Las SHRs demuestran niveles elevados de XO endotelial y un aumento de la producción de ROS, que se asocian con el incremento del tono arteriolar (Suzuki et al., 1998). Esto puede estar mediado en parte a través de una vía suprarrenal, porque la adrenalectomía reduce la expresión de XO (DeLano et al., 2006). La disfunción endotelial en ratas transgénicas con sobreexpresión de renina y angiotensinógeno también se ha asociado con una actividad incrementada de XO (Mervaala et al., 2001). Además de los efectos sobre la vasculatura, la XO puede jugar un papel en el daño orgánico en la hipertensión. En modelos experimentales de hipertensión, la actividad de la XO aumenta en el riñón. En las SHRs, la inhibición a largo plazo de la XO con alopurinol redujo la actividad renal XO sin disminuir la presión sanguínea, lo que indica que el aumento de la producción renal de ROS fue consecuencia de la hipertensión y no de un factor contribuyente (Laakso et al., 1998). El hallazgo de que el alopurinol puede mejorar la hipertrofia cardíaca y renal en SHRs y retardar la progresión de la enfermedad renal en pacientes con enfermedad renal crónica e hipertensión (Siu et al., 2006), mientras que tiene un impacto mínimo sobre la presión arterial (Laakso et al., 2004), apoya un papel para la XO en el daño orgánico en hipertensos en lugar de en el desarrollo de la hipertensión *per se*. Esto puede estar

mediado a través de los efectos vasculares directos del ácido úrico producido por XO (Corry & Tuck, 2006).



**Figura 8.** Fuentes enzimáticas de  $\bullet\text{O}_2^-$ . Las principales enzimas responsables de la generación de ROS en la vasculatura incluyen NADPH oxidasa, xantina oxidasa, y NOS desacoplada. Tomado de Paravicini & Touyz (2008).

Las NOS también pueden contribuir a la producción de ROS, ya que las tres isoformas NOS han demostrado ser susceptibles del "desacoplamiento" que conduce a la formación de  $\bullet\text{O}_2^-$  (en lugar de NO) (Andrew & Mayer, 1999). Para la eNOS, este proceso se desencadena *in vitro* a través de la ausencia de los cofactores L-arginina y BH4 (Vásquez-Vivar et al., 1998). Se ha demostrado el desacoplamiento de la eNOS endotelial en la hipertensión inducida por la sal de acetato de deoxicorticosterona (DOCA) y en SHR. El tratamiento con BH4 mejora la presión arterial tanto en la hipertensión debida a la sal de DOCA como en las SHR (Hong et al., 2001; Landmesser et al., 2003). Si los efectos de la NOS desacoplada se deben a cambios en la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  o de NO, no está claro. Para esclarecer esto, se comparó la presión sanguínea y la función endotelial en ratones con sobreexpresión transgénica de eNOS dirigida al endotelio (eNOSTg) con otros ratones de camada en los que el acoplamiento de eNOS fue restaurado por endotelio adicional dirigido a la sobreexpresión de GTP ciclohidrolasa 1 (eNOS/GCH-Tg) para aumentar las concentraciones de BH4 endotelial (Adlam et al., 2007). La presión arterial se redujo igualmente en ambos genotipos, en comparación con los animales de tipo salvaje. Además, ambos ratones eNOS-Tg y

eNOS/GCH-Tg mostraron una vasorelajación dependiente de endotelio alterada de forma similar, demostrando que las respuestas vasorelajantes reducidas resultan de la desensibilización de la señalización mediada por cGMP y están asociadas con un aumento de la producción NO en lugar de cambios en la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  (Adlam et al., 2007). Sin embargo, otros autores han demostrado que los efectos vasculares del desacoplamiento de la eNOS se deben a una mayor producción de  $\bullet\text{O}_2^-$ . El aumento de las ROS vasculares puede inducir el desacoplamiento de la eNOS como consecuencia del aumento de la oxidación de la BH4 y la inhibición de la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (Widder et al., 2007). De hecho, se ha demostrado que la NADPH oxidasa provoca un desacoplamiento de la NOS endotelial y promueve la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  dependiente de XO (Landmesser et al., 2006).

La NADPH oxidasa es una enzima multi-subunidad que cataliza la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  por la reducción de un electrón de  $\text{O}_2$  empleando la NADPH o NADH como donador de electrones. La NADPH oxidasa se encuentra en los neutrófilos y tiene cinco subunidades: p47phox ("phox" significa fagocito oxidasa), p67phox, p40phox, p22phox y la subunidad catalítica gp91phox (también llamada Nox2) (Chabrashvili et al., 2002; Babior, 2004). En las células no estimuladas, p47phox, p67phox y p40phox se encuentran en el citosol, mientras que p22phox y gp91phox están en la membrana, donde se comportan como una flavoproteína heterodimérica, el citocromo b558. En la estimulación, p47phox se fosforila y las subunidades citosólicas forman un complejo que se trasloca a la membrana, donde se asocia con el citocromo b558 para ensamblar la oxidasa activa, que transfiere electrones del sustrato al  $\text{O}_2$ , formando  $\bullet\text{O}_2^-$  (Touyz et al., 2003a). La activación también requiere la participación de Rac 2 (o Rac 1) y Rap 1A (Bokoch & Zhao, 2006). Aunque las NADPH oxidasas fueron originalmente consideradas como enzimas expresadas sólo en células fagocíticas implicadas en la defensa del hospedador y la inmunidad innata, estudios científicos recientes indican que hay una familia entera de NADPH oxidasas, basada en el descubrimiento de homólogos de gp91phox (Cave et al., 2006; Geiszt, 2006). Los nuevos homólogos, junto con gp91phox, se denominan ahora familia de la Nox de NADPH oxidasas. La familia comprende siete miembros, incluyendo Nox1, Nox2 (anteriormente denominado "gp91phox"), Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2 (Griendling, 2006). Se expresan en muchos tejidos y median diversas funciones biológicas. Nox1 se encuentra en el colon y las células vasculares y juega un papel en el sistema inmunológico y el crecimiento

celular; Nox2 es la subunidad catalítica de la explosión respiratoria oxidativa en fagocitos, pero también se expresa en células vasculares, cardíacas, renales y neurales; Nox3 se encuentra en el tejido fetal y en el oído interno adulto y participa en la función vestibular; Nox4, originalmente denominado "Renox" (oxidasa renal), debido a su abundante presencia en el riñón, también se encuentra en las células vasculares y osteoclastos; y Nox5 es un homólogo dependiente de  $Ca^{2+}$ , que se encuentra en los testículos y el tejido linfoide, pero también en las células vasculares. Duox1 y 2 son Nox tiroideas implicadas en la biosíntesis de la hormona tiroidea. A pesar de que todas las proteínas Nox están presentes en roedores y humanos, el genoma de ratón y rata no contiene el gen *nox5*. Aunque los procesos de regulación y función de cada Nox aún no están claros, pero es evidente que las enzimas Nox son críticas para las respuestas biológicas normales y que contribuyen a enfermedades cardiovasculares y renales, incluyendo hipertensión y aterosclerosis (Paravicini & Touyz, 2008).

Cómo las moléculas de NADPH oxidasa interactúan en las células cardiovasculares y cómo generan  $\bullet O_2^-$  no se conoce completamente. Todos las Noxes parecen tener una necesidad obligatoria de p22phox (Ambasta et al., 2004; Kawahara, Ritsick et al., 2005). Considerando que Nox2 requiere p47phox y p67phox para su actividad, Nox1 puede interactuar con los recientemente identificados homólogos de p47phox y p67phox, llamados organizador Nox1 (NOXO1) y activador Nox1 (NOXA1), respectivamente (Cheng & Lambeth, 2005; Ambasta et al., 2006). La NADPH oxidasa vascular es sensible a varios factores de crecimiento (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico y TGF- $\beta$ ), citoquinas (TNF- $\alpha$ , interleucina 1 y factor de agregación plaquetaria), fuerzas mecánicas (estiramiento cíclico, laminar y *shear stress* oscilatorio) y factores metabólicos (hiperglucemia, hiperinsulinemia, ácidos grasos libres, productos finales de la glicación avanzada y agonistas de receptores acoplados a proteínas G (5-HT, trombina, bradiquinina, ET y Ang II) (Bayraktutan et al., 2000; Li & Shah, 2002; Lassegue & Clempus, 2003; Miller et al., 2006; Takeya & Sumimoto, 2006). La Ang II, a través de los receptores AT1, es un importante y potencial regulador de la NADPH oxidasa cardiovascular que activa a la misma mediante la estimulación de vías de señalización que implican c-Src p21<sup>Ras</sup>, proteína quinasa C, fosfolipasa D y fosfolipasa A<sub>2</sub> (Ushio-Fukai et al., 1998; Griendling et al., 2000; Seshiah et al., 2002). La Ang II también influye en la activación de la

NADPH oxidasa mediante la regulación transcripcional de las subunidades de la oxidasa (Touyz et al., 2002).

Los antioxidantes se definen como sustancias que, cuando están presentes a bajas concentraciones con relación a un sustrato oxidable, retrasan significativamente o previenen la oxidación de ese sustrato. Los organismos vivos han desarrollado una serie de defensas antioxidantes para mantener su supervivencia contra el estrés oxidativo. Estos mecanismos son diferentes en los compartimentos intracelular y extracelular y comprenden tipos enzimáticos y no enzimáticos. Los principales antioxidantes enzimáticos vasculares son la SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (Sindhu et al., 2005; Siu et al., 2005; Gongora et al., 2006). La SOD cataliza la dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ . De las tres isoformas de SOD, la SOD extracelular es la SOD vascular principal. Es producida y segregada por las células del MLV y se une a los glicosaminoglicanos en la matriz extracelular vascular en la superficie de las células endoteliales y desempeña un papel importante en la regulación del estado del oxidante en el intersticio vascular (Wassmann et al., 2004). El glutatión reducido juega un papel importante en la regulación del estado redox intracelular de las células vasculares proporcionando equivalentes reductores para muchas vías bioquímicas (Touyz et al., 2003b). La glutatión peroxidasa reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los peróxidos lipídicos a agua y alcoholes lipídicos, respectivamente, y a su vez oxida el glutatión a glutatión disulfuro. El sistema de glutatión peroxidasa/glutatión puede ser importante en el estrés oxidativo de bajo nivel. La catalasa es una enzima antioxidante intracelular que se encuentra principalmente en los peroxisomas celulares y en cierta medida en el citosol, que cataliza la reacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a agua y  $\text{O}_2$  (Cai, 2005). La catalasa es muy eficaz en concentraciones elevadas de estrés oxidativo y protege a las células del  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido dentro de la célula. La enzima es especialmente importante en el caso de que haya un contenido limitado de glutatión o una actividad reducida de glutatión peroxidasa. La tioredoxina reductasa es una enzima antioxidante que participa en procesos reductores celulares dependientes de tiol (Kajiyi et al., 2007). Numerosos antioxidantes inespecíficos, como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C), eliminan  $\text{OH}\cdot$  así como otros radicales (Shimokawa & Matoba, 2004). La baja biodisponibilidad antioxidante promueve el estrés oxidativo celular y ha sido implicada en el daño oxidativo asociado con la hipertensión (Wassmann et al., 2004).

Las ROS influyen en el crecimiento de las células vasculares, la migración, la proliferación y la activación (Touyz et al., 2003b; Cai, 2005). Desde el punto de vista fisiológico, las ROS derivadas de la NADPH oxidasa han sido implicadas en la regulación del tono vascular modulando directamente la vasodilatación (el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede tener acciones vasodilatadoras) o indirectamente disminuyendo la biodisponibilidad de NO mediante su unión al •O<sub>2</sub><sup>-</sup> para dar lugar al ONOO<sup>-</sup> (Shimokawa & Matoba, 2004; Kajiya et al., 2007). Las ROS, a través de la regulación del factor de hipoxia inducible 1 (HIF-1), también son importantes en la detección de O<sub>2</sub> (Goyal et al., 2004), que es esencial para mantener su homeostasis. En condiciones patológicas, las ROS están implicadas en la inflamación, disfunción endotelial, proliferación celular, migración y activación, deposición de matriz extracelular, fibrosis, angiogénesis y remodelación cardiovascular, procesos relevantes que contribuyen al remodelamiento cardiovascular y renal en la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes, el fallo cardíaco y la lesión de isquemia miocárdica por perfusión (Pawlak et al., 2004; San Martin et al., 2007). Estos efectos están mediados a través de la regulación redox sensible a múltiples moléculas de señalización y segundos mensajeros incluyendo las proteínas quinasas activadas por mitógenos, las proteínas tirosina fosfatasas, las tirosina quinasas, los genes proinflamatorios, los canales iónicos y el Ca<sup>2+</sup> (Kimura et al., 2005; Yoshioka et al., 2006; Hool & Corry, 2007).

Son diversos los mecanismos por los que las ROS originan disfunción endotelial. Las ROS se han identificado como EDCF *per se* en la arteria basilar canina (Katusic & Vanhoutte, 1989) y en la arteria renal de rata. Los radicales libres pueden presumiblemente difundir al MLV subyacente y activar la COX en las células del MLV (Katusic & Vanhoutte, 1989; Yang et al., 2002; Yang et al., 2003; Shi & Vanhoutte, 2008), produciendo así prostanoides que a su vez activan los receptores TP. Los radicales libres derivados del oxígeno pueden llegar a las células del MLV a través de los canales constituidos por las uniones *gap* mio-endoteliales (Tang & Vanhoutte, 2008b). Las ROS pueden amplificar en lugar de inducir directamente, contracciones dependientes del endotelio. Esta interpretación se basa en las observaciones de que en un número de arterias, los *scavengers* de ROS permeables a las células, tales como tempol, provocan de manera variable las contracciones dependientes del endotelio (Yang et al., 2002; Yang et al., 2003). En arterias como la aorta del ratón, las arterias renales de ratas hipertensas, un aumento de la producción de ROS estimula la COX-2 endotelial para

liberar más ROS y prostanoïdes que a su vez activan los receptores TP para producir la contracción de las células del MLV (Tian et al., 2012). Por lo tanto, las ROS actúan como un desencadenante para la liberación del EDCF que conduce a una mayor amplitud de las contracciones endoteliales resultantes. En el comienzo de las contracciones dependientes del endotelio generadas por las ROS, la ACh y A23187 provocan una gran producción de radicales libres endoteliales (Tang et al., 2007). Puesto que dicha producción es reducida por la indometacina, la COX parece ser una de las principales fuentes de aniones  $\bullet\text{O}_2^-$  en las células endoteliales (Tang et al., 2007). Esto aparentemente sucede también en el caso de la vasculatura del antebrazo humano, donde tanto los inhibidores de COX como los antioxidantes reducen la disfunción endotelial (Viridis et al., 2013). Otras enzimas generan ROS intracelular, incluyendo XO, NO sintasas desacopladas, oxidasas mitocondriales, lisil oxidasa y Nox. El estrés inducido por una respuesta proteica desacoplada (UPR) en el RE también produce ROS (Lenna et al., 2014). Las propiedades de eliminación de NO y la facilidad de las contracciones dependientes del endotelio ejercidas por ROS ayudan a entender por qué las sustancias que disminuyen el estrés oxidativo confieren protección vascular. Por ejemplo, la berberina (un alcaloide botánico purificado de los rizomas de *Coptidis*) inhibe el estrés del RE al activar la AMPK (Liu et al., 2015). En las arterias carótidas de SHR, la berberina inhibe la expresión de un número de proteínas relacionadas con el estrés del RE (incluyendo el factor de inicio de la traducción eucariota 2A, la proteína de unión a X-box 1 y la activación del factor de transcripción 2 y 6) y reduce la producción de ROS regulando a la baja la COX-2 (Liu et al., 2015). La defensa antioxidante natural representada por las proteínas desacopladas, puede capturar ROS de la mitocondria y reducir el estrés oxidativo (Liu et al., 2014). Por ejemplo, la sitagliptina [un inhibidor selectivo de la DPP4 que aumenta la expresión de la proteína desacoplada 2 (UCP2)] reduce la expresión de la COX-2 disminuyendo el estrés oxidativo en las arterias de SHR (Liu et al., 2014). Observaciones similares en aorta de ratones infundidos con angiotensina II indican que la sitagliptina normaliza la sobreproducción de ROS y atenúa las contracciones dependientes del endotelio, un efecto ausente en los ratones en los que se había eliminado el gen de UCP2 (Liu et al., 2014). En concordancia con lo mencionado anteriormente, la expresión de UCP2 se reduce en las arterias renales de SHR en comparación con la rata Wistar-Kyoto (WKY), y la sobreexpresión de UCP2 inhibe las contracciones dependientes de endotelio en el

primer caso (Liu et al., 2014). Por lo tanto, la UCP2 mitocondrial regula negativamente la producción de ROS intracelular y previene la aparición de contracciones dependientes del endotelio. Esta interpretación es consistente con la observación de que las contracciones dependientes del endotelio son atenuadas por *scavengers* de ROS de la mitocondria tales como la coenzima Q10 e idebenona (Liu et al., 2014). La HO-1 es otro regulador negativo de ROS intracelular que reduce la expresión y la actividad de la COX vascular en ratas diabéticas y, por tanto, influye en la producción de prostanoïdes vasoconstrictores (Wang et al., 2014). Compuestos tales como la hemina y dímero de tricarbonildiclororutenio II que inducen la expresión de HO-1 o liberan el monóxido de carbono producto de HO-1, respectivamente, suprimen la producción de ROS, inhiben la regulación al alza de la COX-2 y deterioran las contracciones dependientes del endotelio en la aorta de SHR (Wang et al., 2014). En conjunto, las ROS amplifican las contracciones dependientes del endotelio inactivando el NO, actuando como un EDCF *per se*, y/o regulando al alza la expresión y la actividad de las COX (Vanhoutte et al., 2017).

Las ROS influyen en muchos procesos fisiológicos incluyendo el sistema inmune, la biosíntesis hormonal, la fertilización, y la señalización celular. El aumento de la producción de ROS (denominado "*estrés oxidativo*") ha estado implicado en varias patologías como la hipertensión, aterosclerosis, diabetes y enfermedad renal crónica. Una fuente principal de ROS vascular y renal es una familia de NADPH oxidasas no fagocíticas, que incluye la Nox2, así como otras oxidasas de NADPH, tales como Nox1 y Nox4. Otras fuentes posibles incluyen las enzimas de transporte de electrones mitocondriales, XO, COX, LOX y NOS desacoplada. El ROS derivado de la oxidasa de NADPH desempeña un papel fisiológico en la regulación de la función endotelial y del tono vascular y un papel fisiopatológico en la disfunción endotelial, inflamación, hipertrofia, apoptosis, migración, fibrosis, angiogénesis y rarefacción, procesos importantes que anteceden al remodelado cardiovascular y renal en hipertensión y diabetes. Estos hallazgos han suscitado un gran interés debido a las posibilidades que ofrecen con respecto a las terapias contra la NADPH oxidasa no fagocítica para disminuir la generación de ROS y/o estrategias para aumentar la disponibilidad de óxido nítrico (NO) y antioxidantes que puedan ser útiles para minimizar la lesión vascular y la disfunción renal y, de esta forma prevenir o retroceder el daño de órganos diana asociado con la hipertensión y la diabetes (Paravicini & Touyz, 2008).

### 1.3.2 ROS y riñón

En el 2014, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) informaron que más del 10% de los adultos en los Estados Unidos tienen enfermedad renal crónica (ERC), de los cuales, el 30% de los individuos mayores de 65 años presentan alguna forma de insuficiencia renal. Los adultos con diabetes o hipertensión tienen un riesgo particularmente alto de desarrollar ERC. Aproximadamente uno de cada tres adultos con diabetes y uno de cada cinco adultos con hipertensión desarrollan ERC (CDC, 2014; Ratliff et al., 2016). Lamentablemente, el tratamiento de la insuficiencia renal no ha progresado en los últimos 70 años desde la introducción de la diálisis. Parte del problema de desarrollar tratamientos terapéuticos nuevos y más efectivos es que todavía no se entienden completamente todos los mecanismos moleculares que son responsables del progreso de la insuficiencia renal. Un paciente que sufre alguna forma de lesión renal aguda (LRA) tiene un alto riesgo de desarrollar ERC durante los 10-15 años siguientes. Las causas de la LRA son variables, al igual que las causas de la ERC. Mientras que la LRA es el resultado de un episodio agudo transitorio de daño sistémico, la ERC se produce generalmente debido a predisposición genética, síndrome o enfermedad que lleva a lesión renal secundaria o a un ataque previo de LRA. Sin embargo, en todos los casos de deterioro de la función renal, ya sea agudo o crónico, el estrés oxidativo juega un papel en el daño renal y ofrece un objetivo potencial para la intervención terapéutica. De hecho, el estrés oxidativo se ha relacionado con la patogénesis de una serie de enfermedades tales como enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas de la artritis (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer y Parkinson) y envejecimiento (Valko et al., 2007; Ratliff et al., 2016).

### 1.3.3 Estrés oxidativo y función vascular renal

El estrés oxidativo afecta directa e indirectamente a todas las facetas de la función renal, incluyendo la reactividad vascular y la hemodinámica renal, la FGR y la reabsorción y secreción tubulares en todos los segmentos de la nefrona. Durante la lesión o la enfermedad, la señalización del estrés oxidativo altera todos estos procesos y promueve rutas prodañinas que conducen a la apoptosis celular, necrosis, alteración

de la expresión génica, la progresión del daño tisular, la promoción de la fibrosis y la función renal anormal (Ratliff et al., 2016).

La reducción de un electrón de  $O_2$  da como resultado la generación de anión  $\bullet O_2^-$  y esto conduce a una variedad de ROS (Noiri et al., 2011). Como se ha mencionado anteriormente, el  $\bullet O_2^-$  es generado por varias enzimas oxidasas y por componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El anión  $\bullet O_2^-$  tiene propiedades reactivas bastante selectivas y difunde mal a través de las membranas biológicas debido a que se transporta principalmente a través de canales aniónicos. El anión  $\bullet O_2^-$  también se somete a dismutación (ya sea espontáneamente o mediante catálisis enzimática) para formar otra ROS, la especie no radical  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  también puede formarse por reducción directa de  $O_2$  por oxidasas. A diferencia del  $\bullet O_2^-$ , el  $H_2O_2$  tiene propiedades de transporte de la membrana similares al agua y esto le permite difundir a través de las membranas e influir en los sistemas reguladores en otros compartimentos celulares o células cercanas. El  $\bullet O_2^-$  libera  $Fe^{3+}$  de las proteínas hierro-azufre y ferritina, promoviendo así la generación de ROS adicionales. Una especie potencial es el radical  $\bullet OH$ , que se genera fácilmente por la reacción de Fenton de  $H_2O_2$  con  $Fe^{2+}$ . Los radicales  $\bullet OH$  atacan y reaccionan con casi todos los constituyentes celulares y generan radicales libres reactivos adicionales. Además, también pueden formarse especies reactivas similares al radical  $\bullet OH$  a partir de la descomposición de RNS como  $ONOO^-$ , que se genera a partir de la reacción de  $\bullet O_2^-$  con NO. Las especies reactivas similares al  $\bullet OH$  reaccionan con los componentes celulares, tales como los ácidos grasos insaturados en los lípidos y los ácidos nucleicos, y promueven la peroxidación de los lípidos y el daño del ADN mitocondrial y nuclear. El ácido hipocloroso (HOCl) es otra ROS, que es liposoluble y extremadamente reactivo. El HOCl se forma por mieloperoxidasa de células fagocíticas cuando metaboliza el  $H_2O_2$ . En presencia de nitrito, la mieloperoxidasa reacciona para generar especies altamente reactivas (tales como el dióxido de nitrógeno [ $\bullet NO_2$ ]), que se comportan de manera similar al  $ONOO^-$  al promover la nitración de tirosina y otras reacciones. Los bajos niveles de ROS tienen importantes funciones en la señalización de las células, pero a medida que aumentan sus niveles, las ROS participan activamente en procesos fisiopatológicos que incluyen la inducción de diversas formas de muerte celular. Las RNS derivados del radical libre de NO (incluyendo  $\bullet NO_2$ ,  $ONOO^-$  y otras RNS) son factores adicionales en la fisiopatología renal. El NO está formado por las diversas

isoformas de la NOS que utilizan L-arginina,  $O_2$ , y otros cofactores, como la  $BH_4$ , para producir NO. El radical libre de NO es muy selectivo en sus propiedades reactivas y puede pasar a formar otras RNS, incluyendo  $ONOO^-$ , que se forma por la reacción de NO con  $\bullet O_2^-$ . A menudo se observa que las RNS interactúan con componentes celulares, incluyendo grupos tiol y ácidos grasos insaturados, para promover la regulación a través de procesos tales como tiol (RSH) u oxidación de lípidos u otras modificaciones, como la nitrosación (RSNO) o nitración (RSNO<sub>2</sub>). Aunque algunas de estas interacciones son parte de la señalización, a medida que aumentan los niveles de RNS, éstas contribuyen activamente a los procesos patológicos en los sistemas cardiovascular y renal (Ratliff et al., 2016).

Las primeras enzimas intrínsecas que combaten el estrés oxidativo son las isoformas de SOD catalizando, como ya se ha comentado, la dismutación del  $\bullet O_2^-$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Matés, 2000). Las tres isoformas de SOD se encuentran constitutivamente en el riñón y se localizan en la mitocondria, el citoplasma y el espacio extracelular donde está anclada por su dominio de unión a la heparina (Folz et al., 1997; Nozik-Grayck et al., 2005; Zelko & Folz, 2005). De las isoformas de SOD, la MnSOD (SOD2) está presente en las mitocondrias, la CuZn-SOD (SOD1 y SOD3) en el citosol y el espacio extracelular, respectivamente (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999; Matés, 2000). La isoforma de la SOD1 representa hasta un 80% de la actividad total de la SOD en el riñón de los mamíferos (Marklund, 1984), pero sólo alrededor de un tercio de la actividad de la misma se ejerce en los vasos renales, lo que evita la interrupción de la señalización del NO (Carlström et al., 2010). Esto pone de manifiesto el lugar en el que las ROS y RNS se generan en la célula e indica que el estrés oxidativo producido por las mitocondrias desempeña un papel vital en la patogénesis de la enfermedad e insuficiencia renal.

Tras la acción de la SOD, la cual genera  $H_2O_2$  a partir de  $\bullet O_2^-$ , las peroxidasas y catalasa posteriormente van a convertir el  $H_2O_2$  en  $O_2$  y/o  $H_2O$ . La catalasa está presente en todas las células aerobias y en el riñón cuenta con una elevada expresión (Deisseroth & Dounce, 1970). Además, la catalasa desempeña un papel crítico en la reducción de ROS y la prevención de la peroxidación de lípidos. La deficiencia de catalasa da lugar a la acumulación de ROS mitocondrial, un efecto que conduce al deterioro funcional de las mitocondrias (Hwang et al., 2012). Otras defensas de vital

importancia incluyen el glutatión y los sistemas de peroxidasa de tiorredoxina. Las enzimas de dichos sistemas están distribuidas por toda la célula, incluso en las mitocondrias, el citoplasma y el núcleo (Oberley et al., 2001; Ebrahimian & Touyz, 2008). Los sistemas de glutatión y tiorredoxina han estado implicados tanto en la regulación de redox celular como en muchos mecanismos de señalización, controlando procesos tales como la síntesis de ADN, proliferación celular y apoptosis (Fukai, 2009). Se ha informado que además de los niveles reducidos de SOD y catalasa, la glutatión también está disminuida en un modelo de rata con nefropatía diabética (Chander et al., 2004) y en pacientes con ERC. Por el contrario, se ha demostrado que el incremento de los niveles de catalasa y glutatión proporciona resistencia frente al  $H_2O_2$  en las células epiteliales tubulares renales (Goligorsky et al., 1993). Otras moléculas que actúan como antioxidantes e influyen en la función renal son el ácido ascórbico (vitamina C), el tocoferol (vitamina E), la cisteína (Jackson et al., 2002; Day, 2009) y el indicador más sensible del estrés celular, la HO-1 (Poss & Tonegawa, 1997). Mientras que los antioxidantes juegan un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis fisiológica y fisiopatológica de los tejidos y las células asociado con la prevención de la acumulación de ROS y RNS, cuando su capacidad de neutralización es superada por el estrés oxidativo, como consecuencia se generan daños patológicos en los tejidos. Por ejemplo, la desregulación de antioxidantes, particularmente de la catalasa y peroxidasa, da como resultado la acumulación de  $H_2O_2$ , que puede reaccionar con metales de transición para formar posteriormente especies altamente reactivas y dañinas, tales como el radical  $\bullet OH$ . Además, los estudios indican que la sobreproducción de  $\bullet O_2^-$ , principalmente por la NADPH oxidasa y mitocondria, y el metabolismo del  $\bullet O_2^-$  reducido por la SOD y otros antioxidantes, pueden iniciar o potenciar el desarrollo de la hipertensión (Araujo & Wilcox, 2014). En este punto, la producción de  $\bullet O_2^-$  y ROS inducida por NADPH oxidasa se eleva en las células del MLV de arterias de resistencia renal y en leucocitos infiltrados, lo que provoca un aumento de la ADMA plasmática y la peroxidación lipídica. A medida que los efectos continúan aumentando, los daños en los riñones progresan y la función renal disminuye (Wanget al., 2009).

El papel de las ROS y RNS se considera un factor crítico implicado en la iniciación y la progresión de varias enfermedades y lesiones renales en mamíferos, incluyendo la nefropatía diabética, insuficiencia renal relacionada con hipertensión,

insuficiencia por isquemia-reperusión (IRI), nefropatía inducida por tóxicos y varias formas de síndromes inflamatorios (Shalamanova et al., 2007; Cachofeiro et al., 2008). Hay generación de ROS y RNS tanto en células tubulares renales como vasculares durante numerosas tensiones tisulares y celulares. En el riñón y los sistemas vasculares, hay muchas fuentes de ROS y RNS que se producen durante condiciones fisiológicas y patológicas, pero las principales fuentes de generación de estrés oxidativo en el riñón provienen de la NADPH oxidasa y la mitocondria (Brodsky et al., 2002; Ohsaki et al., 2012). Sin embargo, al estresarse las células y los tejidos, el equilibrio entre la generación y eliminación de ROS y RNS se pierde debido al aumento de la formación de ROS/RNS y/o a la disminución de la actividad antioxidante, provocando la acumulación de estas moléculas. A medida que aumentan los niveles de ROS y RNS, se produce daño celular y la función tisular se ve afectada.

Las NADPH oxidasas, junto con las mitocondrias, son los principales productores de  $\bullet\text{O}_2^-$  y son las principales fuentes de alteración de la señalización celular (Pieczenik & Neustadt, 2007). A medida que la NADPH oxidasa transfiere electrones de NADPH, éstos reaccionan con  $\text{O}_2$  para formar  $\bullet\text{O}_2^-$ , que normalmente se convierte rápidamente en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Todos los componentes necesarios para que actúe la NADPH oxidasa están presentes en el riñón, incluso la presencia de cuatro isoformas diferentes de esta oxidasa: Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5. La expresión de los distintos componentes de la isoforma de NADPH oxidasa ha sido observada a lo largo de la corteza y la médula del riñón de mamíferos (incluso humanos), incluyendo en el mesangio, túbulos contorneados proximales, túbulos contorneados distales, conducto colector, mácula densa (Fujii et al., 2007; Orient et al., 2007), endotelio y células del MLV (Araujo & Wilcox, 2014). La NADPH oxidasa se localiza en la membrana plasmática y genera superóxido para la señalización redox de procesos tales como la proliferación celular y la interacción con el sistema inmune que incluye dirigir la apoptosis fagocitótica de los microbios invasores (Ma, 2014). De las isoformas de NADPH oxidasa en el riñón, Nox4 es la isoforma que más se expresa (Geiszt et al., 2000), produciendo grandes cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  constitutivamente (Thallas-Bonke et al., 2015). La actividad de NADPH oxidasa (incluyendo la inducción de la expresión de Nox2) puede estimularse mediante Ang II (Hattori et al., 2005) y citoquinas proinflamatorias tales como interferón gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ). Informes recientes indican que

la isoforma Nox5 también puede influir en la fisiología tubular y contribuir a glomerulopatías (Holterman et al., 2015).

Las mitocondrias en las células renales normalmente producen bajos niveles de ROS, que se cree que desempeñan un papel en los procesos de señalización celular, como la detección de hipoxia. Sin embargo, la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  en las mitocondrias se ve potenciada por una serie de estímulos fisiopatológicos, que incluyen la Ang II, TNF $\alpha$ , adhesión de integrinas, diabetes y niveles elevados de glucosa, LDL oxidada y  $\bullet\text{O}_2^-$  generado por la NADPH oxidasa (Brodsky et al., 2002; Thomas et al., 2008). Estos estímulos aumentan la generación de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial al afectar los sistemas reguladores intracelulares que aumentan el calcio intracelular, abren los canales de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  mitocondriales y aumentan el potencial de membrana. Como resultado, la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  se produce en el complejo I y el complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondriales. Además, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los productos de oxidación de lípidos también pueden aumentar la generación de ROS mitocondrial en las células renales. También se demostró que las células endoteliales contienen una isoforma de NOS mitocondrial que es capaz de generar  $\bullet\text{O}_2^-$  durante el estrés (Brodsky et al., 2002). Los niveles de  $\bullet\text{O}_2^-$  se mantienen normalmente a niveles bajos en la matriz mitocondrial debido a su conversión a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la Mn-SOD (SOD2) mitocondrial. Sin embargo, es crítico para que el  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial excesivo sea neutralizado para prevenir daño a las mitocondrias. Si no se neutraliza el  $\bullet\text{O}_2^-$ , causa estrés oxidativo mitocondrial al interrumpir las uniones hierro-azufre, liberando hierro y promoviendo procesos que deterioran la función mitocondrial. Si la generación de  $\bullet\text{O}_2^-$  y ROS es excesiva en las mitocondrias, los canales de la membrana mitocondrial (incluyendo los canales aniónicos en la membrana interna) se abren (Lemasters et al., 1998), produciendo el colapso del potencial de membrana mitocondrial y la posterior generación de ROS por la cadena de transporte de electrones (Wang et al., 2008). El estrés oxidativo se agrava por la reducción de los niveles de SOD2. Por ejemplo, en los pacientes con ERC, SOD2 se regula a la baja en neutrófilos durante el estrés, causando mayor generación de ROS debido a la disfunción de neutrófilos que presentan estos pacientes (Olsson et al., 2011). A medida que la generación de  $\bullet\text{O}_2^-$  y ROS en la mitocondria continúa, se induce la acumulación de la UCP2 (Robey & Hay, 2006). El aumento de UCP2 conduce a la migración de protones hacia el interior lo que interfiere con la función de la ATP sintasa y reduce la síntesis de ATP (Noiri et al., 2011), un

efecto que perjudicaría los procesos de reabsorción dependiente de ATP en las células epiteliales tubulares renales. Si estos efectos son suficientemente graves, se producirá autofagia, apoptosis o necrosis en estas células (Pushpa-rekha et al., 1995).

Los efectos de las ROS y RNS dentro del riñón durante la enfermedad y/o insuficiencia parecen estar coordinados espacial y temporalmente con posibles factores múltiples. Todas las células asociadas con la vasculatura renal, incluyendo células endoteliales, las células del MLV, fibroblastos adventiciales y células inflamatorias residentes e infiltradas, parecen ser capaces de producir niveles de ROS y/o RNS que promueven la fisiopatología. Mientras que la generación de ROS y la señalización influyen en la reabsorción de Na<sup>+</sup> en las células tubulares a través de la nefrona, tiene efectos directos sobre la vasorreactividad en los vasos renales con aumento de ROS asociado con la resistencia vascular renal (RVR) (Welch et al., 2001). El estrés oxidativo vascular desempeña un papel crítico en la progresión del daño renal durante la enfermedad. El endotelio es particularmente vulnerable al estrés oxidativo y experimenta un cambio en el fenotipo ya que los niveles de ROS en y alrededor de los vasos sanguíneos se hacen moderados a severos. Este efecto adverso sobre el endotelio promueve la inflamación, incluyendo la producción de citoquinas mejorada y la expresión de moléculas de adhesión superficial (Li & Shah, 2004) que promueven eficazmente la remodelación vascular.

El NO también juega un papel crítico en el endotelio durante la enfermedad renal y el estrés oxidativo. Los bajos niveles de NO (generados por eNOS) inducen la expresión de genes antioxidativos, protegen a las células endoteliales renales y mesangiales de la apoptosis y la fibrosis (Walpen et al., 2001; Dreieicher et al., 2009) y promueven la hemodinámica renal normal. En las células endoteliales, además de estar anclada a la membrana celular, la eNOS también puede presentarse en la cara citosólica de la membrana mitocondrial externa (Gao et al., 2004). Las concentraciones fisiológicas de NO en las células inhiben la cyt-c oxidasa (Brown, 1995), pudiendo alterar potencialmente la generación de ROS mitocondrial. El aumento moderado de las ROS en la mitocondria estabiliza el factor inducible por hipoxia (HIF) en las células endoteliales (Guzy et al., 2005) y estimula el factor nuclear eritroide 2 (NRF-2) (Piantadosi & Suliman, 2006), efectos que son a la vez protectores contra el estrés oxidativo y renoprotectores (Higgins et al., 2007; Nangaku & Eckardt, 2007). El factor

de transcripción NRF-2 se desactiva habitualmente en un complejo inhibitorio con la proteína asociada a ECH-1 de tipo Kelch (Keap-1). Una vez que el estrés oxidativo aumenta y Keap-1 se oxida, se libera NRF-2 y se une a la región promotora del factor respiratorio nuclear 1 (NRF-1). La unión a NRF-2 promueve la expresión de numerosas moléculas antioxidantes, incluyendo varias enzimas de los sistemas de glutatión y tiorredoxina, SOD, catalasa, HO-1 y otras moléculas antioxidantes. Además, la estimulación inducida por ROS de NRF-1 promueve la activación del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) y la estimulación de la replicación/transcripción y biogénesis del ADN mitocondrial (Wu et al., 1999; Gleyzer et al., 2005), efectos dirigidos a prevenir el daño tisular. La reducción de la actividad de NRF-2 se ha implicado en la progresión de la insuficiencia renal en un modelo de ratón de la ERC (Kim et al., 2011b). Durante la hipertensión y la ERC hay una mayor producción de ROS en el riñón debido a la elevada actividad de la NADPH oxidasa, el incremento de la respiración mitocondrial y la disminución de la eficiencia en el uso de O<sub>2</sub> para el transporte de Na<sup>+</sup> (Welch et al., 2001; Araujo & Wilcox, 2014). El aumento del nivel de ROS disminuye el NO derivado del endotelio funcional al desacoplar las enzimas NOS. Esta reducción del NO derivado del endotelio es primordial en la progresión de la patogénesis hemodinámica renal debido a la pérdida de la capacidad del NO para inducir la vasodilatación y contrarrestar la acción de vasoconstrictores tales como Ang II, ET-1 y flujo del sistema nervioso simpático. A medida que la biodisponibilidad NO continúa disminuyendo, debido a su reacción con •O<sub>2</sub><sup>-</sup> y posterior formación de ONOO<sup>-</sup>, la RVR aumenta y la natriuresis de presión mediada por NO se atenúa (Wilcox, 2005; Vaziri & Rodríguez-Iturbe, 2006). Si la reducción del NO persiste, la disfunción endotelial se produce y es seguida por el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales (Hamilton et al., 2001; Halcox et al., 2002).

Durante el período inicial de inflamación, el mesangio glomerular reacciona generando •O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente por la NADPH oxidasa (Pfeilschifter & Beck, 2011). Durante ciertos estados de enfermedad cuando hay niveles elevados circulantes de glucosa, Ang II y aldosterona (Shibata et al., 2007), estos factores inducen además la generación de ROS en células mesangiales (Lee et al., 2003; Sachse & Wolf, 2007). En el caso de Ang II y aldosterona, la actividad de la NADPH oxidasa (Nox1) y la producción de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> se induce por la vía de estimulación del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) y de los MRs, respectivamente (Hua et al., 2012). El aumento de los niveles

de ROS induce a los podocitos glomerulares y células mesangiales a generar Ang II y reforzar la retroalimentación que promueve más generación de ROS (Lodha et al., 2002). A medida que la generación de ROS perdura, el estrés oxidativo mitocondrial aumenta (Lodha et al., 2002) y diversas vías de quinasa se estimulan en células mesangiales, incluyendo la PKC (Lassègue et al., 2001), la proteína quinasa B (PKB)/Akt (Gorin et al., 2003), PDK-1 (Block et al., 2008) y JNK (G. Ding et al., 2007). La actividad quinasa estimulada altera la expresión génica en células mesangiales. La generación constante de ROS y las vías de señalización resultantes inducen la modificación de ROS de podocitos y proteínas glomerulares como se demostró en pacientes con ERC (Cohen et al., 2002). Un informe reciente demostró que las ROS también pueden influir directamente en la permeabilidad de la membrana basal glomerular y alterar la FGR (Sverrisson et al., 2015). Si la generación de ROS continúa empeorando, el estrés oxidativo promueve la autofagia y la apoptosis en los podocitos y las células mesangiales (Böhler et al., 2000; Moreno-Manzano et al., 2000), la estimulación de vías profibróticas y la aparición de glomerulosclerosis, y la interrupción de la barrera de FGR que conduce a la proteinuria (Sverrisson et al., 2015).

A medida que la inflamación avanza en el riñón murino, las células mesangiales y endoteliales con estrés ayudan a reclutar leucocitos en las regiones glomerular y perivascular mediante la liberación de ROS y cito/quimioquinas proinflamatorias, incluyendo la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), RANTES (citoquina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación) y molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM) (Satriano et al., 1997). En consecuencia, los leucocitos se infiltran en el riñón y contribuyen significativamente al medio oxidativo prodañino. A pesar de la contribución de ROS por las células endoteliales y mesangiales, la principal fuente de estrés oxidativo y nitrosante en el glomérulo y perivascular durante la insuficiencia renal, como la asociada con sepsis, deriva de las células inmunes invasoras. Los leucocitos infiltrados (incluidos los neutrófilos y los macrófagos) invaden el glomérulo y los segmentos perivasculares, liberan grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el TNF $\alpha$  y sufren una explosión respiratoria, que incluye la liberación elevada de  $\bullet\text{O}_2^-$  por mieloperoxidasa (principalmente por la NADPH oxidasa), especies similares a radicales  $\bullet\text{OH}$ , HOCL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO (vía óxido nítrico sintasa inducible [iNOS]) y NO<sub>2</sub> (Rosen et al., 2002). Las células mieloides y los macrófagos que entran en el riñón de la

circulación también liberan citoquinas proinflamatorias debido a la activación inducida por ROS de los inflammasomas (Cruz et al., 2007; Allen et al., 2009). La expresión de iNOS está regulada al alza en células mesangiales de rata durante el estrés por varias citoquinas (incluyendo IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ ) (Eberhardt et al., 1996), endotoxinas (LPS), factor de crecimiento fibroblástico básico (Kunz et al., 1997) y por generadores de ROS, incluyendo el sistema hipoxantina/xantina oxidasa (Beck et al., 1998). Los altos niveles de NO generado por iNOS median efectos proinflamatorios mediante la activación del NF $\kappa$ B y la proteína activadora 1 (AP-1) regulando la transcripción y promoviendo aún más la producción de iNOS y la proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2) (Mühl & Pfeilschifter, 1995; Walpen et al., 2001). La actividad de la iNOS continúa elevando los eventos tóxicos inducidos por RNS en el riñón mediante la nitración de proteínas y lípidos (Pfeilschifter et al., 2002), un efecto que avanza aún más el daño renal en la rata (Peresleni et al., 1996; Goligorsky et al., 2002). Existe controversia sobre el papel del NO generado por iNOS en el glomérulo. Varios laboratorios que usan modelos murinos han informado que el NO y el RNS participan en la muerte apoptótica y necrótica en las células mesangiales (Böhler et al., 2000; Moreno-Manzano et al., 2000), dando como resultado la pérdida de células mesangiales, la acumulación de la matriz y la progresión de la glomerulonefritis (Weinberg et al., 1994; Narita et al., 1995). En cambio, otros informes han indicado que el ONOO $^-$  y las tensiones nitrosantes ejercen sólo efectos tóxicos mínimos sobre las células mesangiales debido a los potenciales mecanismos intrínsecos de defensa frente a las RNS en estas células (Sandau et al., 1997) y que la inhibición de iNOS en su lugar provoca un aumento de deposición de fibronectina, hiper celularidad y proteinuria (Westenfeld et al., 2002; Satriano et al., 2006). La discrepancia de los efectos del NO parece estar relacionada con su concentración. Por ejemplo, el NO media los efectos renoprotectores en un rango de concentración específico cuando sus niveles son bajos, pero como la producción de NO inducida por iNOS aumenta a concentraciones patológicas, se pierden sus efectos protectores y se produce daño. En comparación, las células endoteliales vasculares han demostrado una susceptibilidad particular a los efectos tóxicos del ONOO $^-$ . A diferencia de las células mesangiales, las células endoteliales en el glomérulo y las estructuras perivasculares no parecen tener un sistema de protección comparable contra el estrés nitrosante (Pfeilschifter & Beck, 2011). A pesar de los informes contradictorios, parece que la generación de NO y ROS continúa desempeñando un

papel en su ciclo de retroalimentación que mejora la generación y liberación de  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en leucocitos y células mesangiales glomerulares. A medida que avanza la lesión de los tejidos y progresa la inflamación, los niveles circulantes y locales de las citoquinas de los tejidos como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Radeke et al., 1990) siguen aumentando, la NADPH oxidasa en las células renales es estimulada y la producción de ROS se vuelve aún más pronunciada. Estos procesos amplifican los procesos proinflamatorios y el daño tisular, causando remodelación citoesquelética y vascular, fibrosis (Bonventre, 1993) y posible insuficiencia renal. Después de un estrés oxidativo prolongado, se produce cambio eventual en el balance del NO producido en comparación con ROS y RNS en el glomérulo renal de tal forma que la generación de ROS y RNS se reemplaza por un dominio en la producción de NO en células mesangiales (Pfeilschifter et al., 2002). Se cree que el cambio resulta de la amplificación inducida por ROS de la expresión de iNOS inducida por citoquinas y posterior generación de NO en células mesangiales (Pfeilschifter & Beck, 2011). Como resultado, la generación de ROS por NADPH oxidasa es reprimida por la presencia de altas cantidades de NO generado (Plesková et al., 2006), que controla la expresión del homólogo Nox1 de NADPH oxidasa a través de mecanismos dependientes de cGMP. Posteriormente, la producción de NO se ralentiza debido al agotamiento de cofactores de la NOS y/o la inhibición de iNOS mediada por NO (Pfeilschifter & Beck, 2011).

Hay otras fuentes de ROS en el riñón. El desacoplamiento de eNOS aparece en la generación de  $\bullet\text{O}_2^-$  durante condiciones patológicas, como la diabetes y la inflamación, cuando la disponibilidad de biopterina se reduce debido a su oxidación (Crabtree et al., 2008). El retículo endoplasmático (RE) genera ROS como un subproducto del acoplamiento y oxidación de proteínas (Malhotra & Kaufman, 2007). La degradación de los ácidos grasos por los peroxisomas explica la generación de  $\bullet\text{O}_2^-$  (Vasko & Goligorsky, 2013). Los defectos en la vía del poliol producen ROS mientras reducen la síntesis de glutatión. Las enzimas XO, LOX y COX, también contribuyen a la generación de ROS en el riñón. Se demostró que la COX-2 puede mejorar la producción de ROS y, posteriormente, mejorar la apoptosis en células mesangiales y células de túbulo proximal cultivadas (PTCs). Otros factores que contribuyen al estrés oxidativo en el riñón incluyen iones metálicos tales como  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . El hierro redox activo cataliza (a través de la reacción de Haber-Weiss) el daño oxidativo a proteínas y lípidos (peroxidación lipídica), eventos que están asociados con

la enfermedad renal y su gravedad (Monnier et al., 2011). De hecho, el nivel de peroxidación lipídica en el riñón se utiliza normalmente como un marcador para la gravedad del daño renal y puede ayudar a los médicos a comprobar el estado de los riñones para el trasplante. El aumento de la peroxidación lipídica y la posterior formación y acumulación renal de productos finales de lipoxidación desencadenan vías proinflamatorias que incluyen la activación del receptor para productos finales de glicación avanzada (Iacobini et al., 2009). Los aminoácidos que contienen grupos sulfhidrilo, tales como cisteína y metionina, son los principales objetivos de oxidación debido a la susceptibilidad de sus grupos tiol a ser oxidados. Los grupos sulfhidrilo en estos aminoácidos pueden oxidarse fácilmente mediante HOCl, peróxidos y  $\text{ONOO}^-$  (Monnier et al., 2011). La tirosina, el triptófano, la arginina, la prolina, la lisina y la histidina también son susceptibles a la oxidación (Ma, 2014), mientras que la lisina es particularmente susceptible a la modificación debido a la peroxidación de lípidos (Halliwell & Gutteridge, 1989). La modificación oxidativa post-traslacional de las proteínas de estos aminoácidos puede alterar la función de la proteína. Además de la modificación de la proteína, las ROS y RNS pueden oxidar los carbohidratos (produciendo productos finales de glicación avanzada [AGEs]) y dañar el ADN. Existe una fuerte correlación en pacientes humanos con enfermedad renal grave y niveles elevados de AGEs (Beisswenger et al., 1993; Miyata et al., 2000). Las enzimas circulantes y celulares inducen productos de peroxidación lipídica en el riñón y/o se unen a receptores, activan vías de señalización intracelular, incluyendo NF $\kappa$ B, y posteriormente activan la producción de citoquinas y ROS (Schmidt et al., 2000; Peppas et al., 2004). Estos efectos proinflamatorios se agravan al igual que los sistemas antioxidantes intracelulares, incluyendo el sistema glutatión, un efecto que promueve además el daño renal.

Los efectos de ROS y RNS también inducen daño renal influyendo en la expresión génica a nivel transcripcional y alterando la función de la proteína a través de modificaciones postraduccionales (Bogdan, 2001; Pfeilschifter et al., 2003). La expresión génica alterada resulta de la inducción de varios factores de transcripción redox sensibles (incluyendo NF $\kappa$ B, AP-1 y HIF-1) y la oxidación, nitración y nitrosación de las 500 quinasas potenciales y 200 fosfatasa contenidas en las células del riñón humano (Bogdan, 2001; Pfeilschifter et al., 2003). El estrés oxidativo disminuye la regulación de la proteína tirosina fosfatasa, mientras que la regulación de las proteínas

tirosina quinasas, incluyendo las vías de la MAPK JNK y p42/p44 (ERK-1/ERK-2) (Bogdan, 2001), aunque el NO inducido por la activación de la guanilato ciclasa soluble y la generación de cGMP desencadena procesos de fosforilación que pueden contrarrestar algunos de estos efectos. Las concentraciones elevadas de glucosa, como ocurre durante la nefropatía diabética, conducen a un aumento de ROS en las células mesangiales a través de la activación de PKC (las ROS también puede mejorar directamente la actividad PKC constituyendo un vínculo de retroalimentación positiva) (Ha & Lee, 2000). La señalización de la PKC estimulada por ROS, posteriormente activó las MAPK en las células mesangiales y endoteliales, seguido por la activación de los factores de transcripción, NFκB y AP-1, expresión alterada de MCP-1 y metaloproteasa 9 (Gauer et al., 2008) y estimulación de los efectos proinflamatorios de las proteínas de choque térmico (HSPs) (Polla et al., 1998) y osteopontina (Gorin et al., 2003). La regulación al alza de las ROS del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) en las células mesangial y endotelial estimula la señalización SMAD y, posteriormente, aumenta la expresión del colágeno 1, 3 y 4, fibronectina, y el inhibidor del activador del plasminógeno 1, atenuando la actividad de los factores de degradación de la matriz extracelular (Iglesias-De La Cruz et al., 2001; Osman et al., 2009). Está bien documentado que la activación de estas vías de señalización conduce a una mejor proliferación de células mesangiales y a una hiper celularidad, una mayor formación de la matriz mesangial y una fibrosis renal en mamíferos. La glomerulosclerosis también es el resultado de la generación de ROS como resultado de la señalización de aldosterona y Ang II, que activa la MAPK p38 y promueve la proliferación de células del MLV y mesangiales, producción de fibronectina y colágeno y posterior expansión fibrótica de la matriz extracelular (Miyata et al., 2005; Fujimoto et al., 2008).

La insuficiencia crónica de vitamina D, se asocia con una vasodilatación mediada por flujo reducida en humanos (Sokol et al, 2012). Así mismo, la delección del receptor de vitamina D (VDR) del endotelio, atenúa las relajaciones dependientes del endotelio en el ratón (Ni et al., 2014). Por el contrario, la suplementación con vitamina D mejora la función endotelial en pacientes con enfermedad renal (Zoccali et al., 2014). La mejora de la función endotelial se atribuye al aumento de la expresión/actividad de la eNOS y a una mayor producción de NO junto con la inhibición del aumento del estrés oxidativo causado por la angiotensina II endógena (Martínez-Miguel et al., 2014;

Ni et al., 2014). Además, tanto la administración aguda como crónica de vitamina D, reducen las contracciones dependientes del endotelio mediadas por prostanoides *ex vivo* (Wong et al., 2008). Sin embargo, el efecto positivo de la vitamina D sobre la función endotelial, puede ser compensado por una regulación al alza de la producción o acción de la ET-1 (Martínez-Miguel et al., 2014). Por otra parte, los estudios epidemiológicos implican que un nivel bajo de vitamina D se asocia con un deterioro de la función vascular (Hashemi et al., 2015). El tratamiento crónico con calcitriol, la forma activa de la vitamina D, reduce la amplitud de las contracciones dependientes del endotelio *ex vivo* en las arterias de ratas hipertensas. La protección inducida por calcitriol, implica la activación del VDR que conduce a la regulación negativa de la expresión de receptores AT1 y subunidades de la Nox, lo que a su vez, evita la sobreproducción de ROS (Dong et al., 2012). Esta regulación, también se acompaña de una expresión reducida de mRNA de COX-1 y presencia de proteína, así como por una presión arterial baja. Estos cambios se han confirmado en las arterias renales humanas pero sin embargo, no se observan en animales normotensos (Dong et al., 2012). Por lo tanto, los individuos hipertensos con deficiencia de vitamina D pueden ser más propensos a la disfunción endotelial caracterizada por el aumento de la aparición de contracciones dependientes del endotelio (Vanhoutte et al., 2017).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



El endotelio es un órgano endocrino que contribuye a la homeostasis vascular liberando diferentes sustancias vasoactivas y tróficas como son el NO, la PGI<sub>2</sub> y el EDHF. Además de su papel en la patogénesis de la enfermedad vascular, las ROS pueden actuar como moléculas de señalización fisiológicas en la pared vascular y se ha descrito que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está involucrado en las respuestas relajantes de tipo EDH en las arteriolas coronarias (Shimokawa, 2010) donde es liberado en respuesta al flujo y a los agonistas y causa hiperpolarización del MLV mediante la activación de K<sub>Ca</sub> (Shimokawa, 2010). Se han propuesto como fuentes de generación de ROS en el endotelio en condiciones fisiológicas la mitocondria, las NADPH oxidasas endoteliales y las CYP (Liu et al., 2003; Larsen et al., 2009; Liu et al., 2013;).

Una fracción sustancial de las respuestas relajantes dependientes del endotelio de las arterias renales está mediada por un factor no-NO no-prostanoide de naturaleza desconocida que causa hiperpolarización del MLV (Büssemaker et al., 2003).

La obesidad es un problema de salud público a nivel mundial cuya prevalencia está en continuo crecimiento y se asocia con el desarrollo de resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia y diabetes tipo II en su conjunto conocidos como síndrome metabólico. La obesidad y el síndrome metabólico incrementan el riesgo de complicaciones diabéticas tales como la nefropatía y la enfermedad renal crónica (Kramer et al., 2005). Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes sugieren que la ERC puede desarrollarse en individuos obesos no diabéticos y que la obesidad representa un factor de riesgo de enfermedad renal independiente de diabetes, hipertensión y otras comorbilidades (De Vries et al., 2014).

Tanto la COX-1 como la COX-2 se expresan constitutivamente en el riñón y los metabolitos derivados de la COX juegan un papel esencial en la hemodinámica renal y en la función tubular (Imig, 2006). Sin embargo, la COX-2 es una enzima inducible en la inflamación y ha sido implicada en la respuesta inflamatoria renal en el curso de la obesidad. La expresión de la COX está aumentada tanto en microvasos renales como en la corteza y los glomérulos renales y asociada a la lesión renal; el tratamiento con inhibidores de la COX-2 disminuye la expresión renal de citoquinas inflamatorias, reduce la albuminuria y alivia la glomeruloesclerosis en el riñón de modelos

experimentas de obesidad (Dey et al., 2004a). Sin embargo, la contribución específica de la COX-2 a la disfunción endotelial renal no se conoce.

Está establecido que el estrés oxidativo es el vínculo común entre las principales vías patogénicas durante el desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares en la diabetes, incluyendo la nefropatía diabética (Forbes et al., 2008). En el riñón, la producción de ROS derivadas de la mitocondria inducidas por la hiperglucemia en el curso de la diabetes, induce el incremento en la expresión de la COX-2 en las células mesangiales (Kiritoshi et al., 2003), y las relaciones entre la COX-2 y las ROS han sido estudiadas en arterias renales y arterias de otros lechos vasculares donde se ha demostrado que dicha enzima es una fuente importante de producción de ROS en condiciones de enfermedad vascular, tales como la diabetes (Shi et al., 2008) y la hipertensión (Tian et al., 2012). El estrés oxidativo, es un factor patogénico clave en el desarrollo de la disfunción endotelial y la enfermedad vascular asociadas a la obesidad (Prieto et al., 2013). Sin embargo, las relaciones específicas entre el estrés oxidativo renal, la COX-2 y la disfunción endotelial no han sido determinadas en el riñón en el curso de la obesidad.

Por todo lo expuesto, con el objetivo general de valorar el papel de las ROS en la función endotelial renal normal y el papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada a la obesidad, los objetivos específicos del presente trabajo han sido:

1. Evaluar si el  $H_2O_2$  está implicado en las respuestas relajantes dependientes del endotelio de las arterias intrarrenales.
2. Determinar las posibles fuentes endoteliales de generación de ROS involucradas en las respuestas relajantes de las arterias renales.
3. Caracterizar los mecanismos de acción vascular de ROS como el  $H_2O_2$  tanto a nivel del endotelio como del MLV renal.
4. Valorar la posible disfunción endotelial y fuentes de estrés oxidativo en arterias renales de un modelo experimental de obesidad genética/síndrome metabólico.
5. Determinar el papel de la COX-2 como fuente de estrés oxidativo y en la disfunción endotelial de arterias renales en la obesidad.

### **3. RESULTADOS**



**3.1 CYP epoxygenase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries**

**Mercedes Muñoz**, Maria Elvira López-Oliva, Estéfano Pinilla, María Pilar Martínez, Ana Sánchez, Claudia Rodríguez, Albino García-Sacristán, Medardo Hernández, Luis Rivera, Dolores Prieto





Contents lists available at ScienceDirect

## Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

Original article

CYP epoxygenase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries

Mercedes Muñoz<sup>a</sup>, Maria Elvira López-Oliva<sup>a</sup>, Estéfano Pinilla<sup>a,1</sup>, María Pilar Martínez<sup>b,1</sup>, Ana Sánchez<sup>a</sup>, Claudia Rodríguez<sup>a</sup>, Albino García-Sacristán<sup>a</sup>, Medardo Hernández<sup>a</sup>, Luis Rivera<sup>a</sup>, Dolores Prieto<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain<sup>b</sup> Departamento de Anatomía and Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Endothelium  
Renal arteries  
Cytochrome P450 (CYP) Endothelium-derived-hyperpolarization (EDH)

## ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) like hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) are involved in the in endothelium-derived hyperpolarization (EDH)-type relaxant responses of coronary and mesenteric arterioles. The role of ROS in kidney vascular function has mainly been investigated in the context of harmful ROS generation associated to kidney disease. The present study was sought to investigate whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-dependent relaxations of intrarenal arteries as well the possible endothelial sources of ROS generation involved in these responses. Under conditions of cyclooxygenase (COX) and nitric oxide (NO) synthase inhibition, acetylcholine (ACh) induced relaxations and stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release that were reduced by catalase and by the glutathione peroxidase (GPx) mimetic ebselen in rat renal interlobar arteries, suggesting the involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the endothelium-dependent responses. ACh relaxations were also blunted by the CYP2C inhibitor sulfaphenazole and by the NADPH oxidase inhibitor apocynin. Acetylcholine stimulated both superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production that were reduced by sulfaphenazole and apocynin. Expression of the antioxidant enzyme CuZnSOD and of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reducing enzymes catalase and GPx-1 was found in both intrarenal arteries and renal cortex. On the other hand, exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaxed renal arteries by decreasing vascular smooth muscle (VSM) intracellular calcium concentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and markedly enhanced endothelial K<sub>Ca</sub> currents in freshly isolated renal endothelial cells. CYP2C11 and CYP2C23 epoxygenases were highly expressed in interlobar renal arteries and renal cortex, respectively, and were co-localized with eNOS in renal endothelial cells. These results demonstrate that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the EDH-type relaxant responses of renal arteries and that CYP 2C epoxygenases are physiologically relevant endothelial sources of vasodilator H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the kidney.

## 1. Introduction

Healthy endothelium is an endocrine organ that contributes to vascular homeostasis by actively secreting vasoactive and trophic molecules that affect vasomotion, cell growth and proliferation, platelet adhesion, inflammation and permeability. In response to flow-induced shear stress and to chemical signals, endothelial cells release vasodilators such as nitric oxide (NO), cyclooxygenase (COX)-derived prosta-cyclin (PGI<sub>2</sub>) and the so-called endothelium-derived hyperpolarizing

factors (EDHFs), the latter mainly involved in endothelium-dependent relaxations of small arteries and arterioles [1,2]. The nature of the EDHF has long time been a matter of debate, but various candidates including K<sup>+</sup> ions, cytochrome P450 (CYP) epoxygenases-derived epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and myoendothelial gap junction electrical communication are currently accepted as mediators of the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and arterial vasodilatation [1–3].

Besides its role in the pathogenesis of cardiovascular disease,

Abbreviations: ACh, acetylcholine; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, calcium intracellular concentration; COX, cyclooxygenase; CYP, cytochrome P450; DHETE, dihydroxyeicosatetraenoic acid; EC, endothelial cell; EDH, endothelium-derived-hyperpolarization; EDHFs, endothelium-derived hyperpolarizing factors; EETs, epoxyeicosatrienoic acids; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ER, endoplasmic reticulum; GPx, glutathione peroxidase; HETEs, hydroxyeicosatetraenoic acids; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; K<sub>Ca</sub>, calcium-activated potassium channels; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; Nox, NADPH oxidase enzymes; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide; PGI<sub>2</sub>, prostacyclin; Phe, phenylephrine; PSS, physiological saline solution; ROS, reactive oxygen species; sHE, soluble epoxide hydrolase; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase; SOD, superoxide dismutase; VSM, vascular smooth muscle

Corresponding author.

E-mail address: [dprieto@ucm.es](mailto:dprieto@ucm.es) (D. Prieto).<sup>1</sup>  
Equal contribution.<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.031>

Received 7 December 2016; Received in revised form 31 January 2017; Accepted 13 February 2017

Available online 14 February 2017

0891-5849/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

reactive oxygen species (ROS) can act as physiological signaling molecules in the vascular wall and have been involved in the endothelium-dependent responses of certain vascular beds.  $\text{H}_2\text{O}_2$  was first demonstrated to mediate EDH responses in mesenteric arteries [4,5] and later in porcine and human coronary arterioles [6–8].  $\text{H}_2\text{O}_2$  released from the endothelium in response to flow and agonists causes hyperpolarization of vascular smooth muscle (VSM) through activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) [6,9] and of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump [10]. Moreover,  $\text{H}_2\text{O}_2$  potentiates the EDH-type response by promoting  $\text{Ca}^{2+}$  release from endothelial cell stores [11,12]. Endothelial NOS (eNOS) was initially reported to be crucial in the synthesis of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , since  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced by endothelial cells upon stimulation with ACh was markedly reduced in eNOS-knockout mice [4]. However, the mitochondria [13], the endothelial NADPH oxidases [14] and the CYP epoxygenases [15] are also important sources of ROS in the vascular wall including both superoxide ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the latter being involved in the endothelium-dependent vasodilatation in re-sponse to flow and agonists of coronary and mesenteric arterioles. The role of ROS in kidney vascular function has mainly been investigated in the context of harmful NADPH oxidase- and mitochondria-derived ROS generation in diabetes and obesity-associated kidney disease [16,17], but little is known about the involvement of ROS species such as  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the endothelium-dependent vasodilatation of renal vessels.

The kidney has a significant content of CYP enzymes that generate hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and EETs with important actions on epithelial cell transport and renal hemodynamics [18]. CYP2C23 is the major epoxygenase enzyme in the kidney and CYP2C23-derived 11,12-EETs dilate rat interlobular and afferent arterioles [19] and are involved in the endothelium-dependent responses to bradykinin in afferent arterioles [20]. Assessment of the functional consequences of CYP expression in renal vessels and in general in the vasculature has mainly been focused on the vascular effects of EETs production. However, CYP epoxygenases can generate  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and other ROS during the CYP reaction cycle [21] and therefore might represent a physiologically relevant source of vascular  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation. In coronary arteries, CYP 2C9 epoxygenase has been identified as an EDHF synthase and generates endothelial constrictor  $\text{O}_2^{\bullet-}$  that modulates vascular tone by counterbalancing endothelial NO-mediated relaxations [15]. However, in mesenteric microvessels from insulin resistant obese Zucker rats, down-regulation of CYP epoxygenases was found to be associated with impaired non-NO-mediated vasodilator function suggesting an involvement of CYP-derived metabolites in the EDH-mediated vasodilator responses [22].

A substantial fraction of the endothelium-dependent responses of human and porcine renal interlobar arteries is mediated by a non-NO non-prostanoid relaxing factor and associated to VSM hyperpolarization [23]. However, involvement of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the endothelial relaxant responses of renal arteries has not yet been characterized neither have been the enzymatic sources of  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation in the renal endothelium. The present study was sought to investigate whether  $\text{H}_2\text{O}_2$  is involved in the endothelium-dependent relaxations of rat intrarenal arteries as well the possible endothelial sources of ROS generation involved in these responses.

## 2. Methods

### 2.1. Animal model

All animal care and experimental protocols conformed to the European Union Guidelines for the Care and the Use of Laboratory Animals (European Union Directive 2010/63/EU) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Madrid Complutense University. Wistar rats were housed at the Pharmacy School animal care facility and maintained on standard chow and water ad libitum, until they were used for study, at 16–18 weeks of age.

Animals were killed by cervical dislocation and exsanguination, the kidneys were quickly removed and placed in cold (4 °C) physiological saline solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 119,  $\text{NaHCO}_3$  25, KCl 4.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.17,  $\text{MgSO}_4$  1.18,  $\text{CaCl}_2$  1.5, EDTA 0.027 and glucose 11, continuously gassed with a mixture of 5%  $\text{CO}_2$ /95%  $\text{O}_2$  to maintain pH at 7.4.

### 2.2. Dissection of microvessels and mounting

Renal interlobar arteries, second- or third order branches of the renal artery from Wistar rats, were carefully dissected by removing the medullary connective tissue, as described previously [24] and mounted in parallel in double microvascular myographs (Danish Myotechnology, Denmark) by inserting two 40  $\mu\text{m}$  tungsten wires into the vessel lumen (Fig. S1). After mounting the arteries were equilibrated for 30 min in PSS maintained at 37 °C. The relationship between passive wall tension and internal circumference was determined for each individual artery and from this, the internal circumference,  $L_{100}$  corresponding to a transmural pressure of 100 mmHg for a relaxed vessel in situ was calculated. The arteries were set to an internal diameter  $L_1$  equal to 0.9 times  $L_{100}$  ( $L_1 = 0.9 \times L_{100}$ ), since force development is close to maximal at this internal circumference.

### 2.3. Experimental procedures for the functional experiments

At the beginning of each experiment, arteries were challenged twice with 120 mM  $\text{K}^+$  (KPSS) in order to test vessel viability. The relaxant effects of acetylcholine (ACh) and of the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) were assessed by adding cumulative concentrations of these agents on arteries precontracted with phenylephrine (Phe) (0.1–0.5  $\mu\text{M}$ ) [4,5,24–27]. In rat intrarenal and coronary arterioles, addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations up to 100  $\mu\text{M}$  elicits reproducible vasoactive responses [24,27]. A range of low  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations [1 nM to 1  $\mu\text{M}$ ] was used in order to obtain relaxant responses [24]. The relaxations to exogenous ACh were further obtained in the absence and presence of the catalase enzyme which catalyzes decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200 UI/ml) [27], of the glutathione peroxidase (GPx) mimetic ebselen (0.3  $\mu\text{M}$ ) [25], of the NADPH oxidase inhibitor apocynin (30  $\mu\text{M}$ ) [26,27], of the general COX inhibitor indomethacin (Indo, 1  $\mu\text{M}$ ) and of the NOS synthase inhibitor (L-NOARG, 100  $\mu\text{M}$ ) [4,24,27]. The effects of the specific inhibitor of CYP2C epoxygenases 4-amino-N-(1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl) benzenesulfonamide (sulfaphenazole, 1  $\mu\text{M}$ ) [15] and of the soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitor 1-trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl) urea, N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidin-yl]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-urea (TPPU, 0.01  $\mu\text{M}$ ) were also assessed in renal arteries of Wistar rats under conditions of NOS and COX inhibition. The endothelium-dependent vasoactive effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  were assessed on interlobar arteries precontracted with either Phe or 60 mM  $\text{K}^+$ . The drugs were added to the myograph chamber 30 min before a second concentration-response curve was performed, and the Phe concentration was adjusted to match the contraction during the first control curve assessment.

### 2.4. Measurement of superoxide production by chemiluminescence

Changes in basal and ACh-stimulated levels of superoxide were detected by lucigenin-enhanced chemiluminescence in renal arteries and in renal cortex, as previously described [24,26]. A cortex sample and 6–8 segments of the renal interlobar arteries about 4–5 mm long from each Wistar Rat were dissected and equilibrated in PSS for 30 min at room temperature and then incubated in the absence (controls) and presence of the CYP2C9 inhibitor sulfaphenazole (1  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37 °C. The arteries and the cortex samples were then transferred to microtiter plate wells containing 5  $\mu\text{M}$  bis-N-methylacridinium nitrate (lucigenin) in the absence and presence of different ROS sources inhibitors and of stimulation of ROS sources with NADPH or ACh

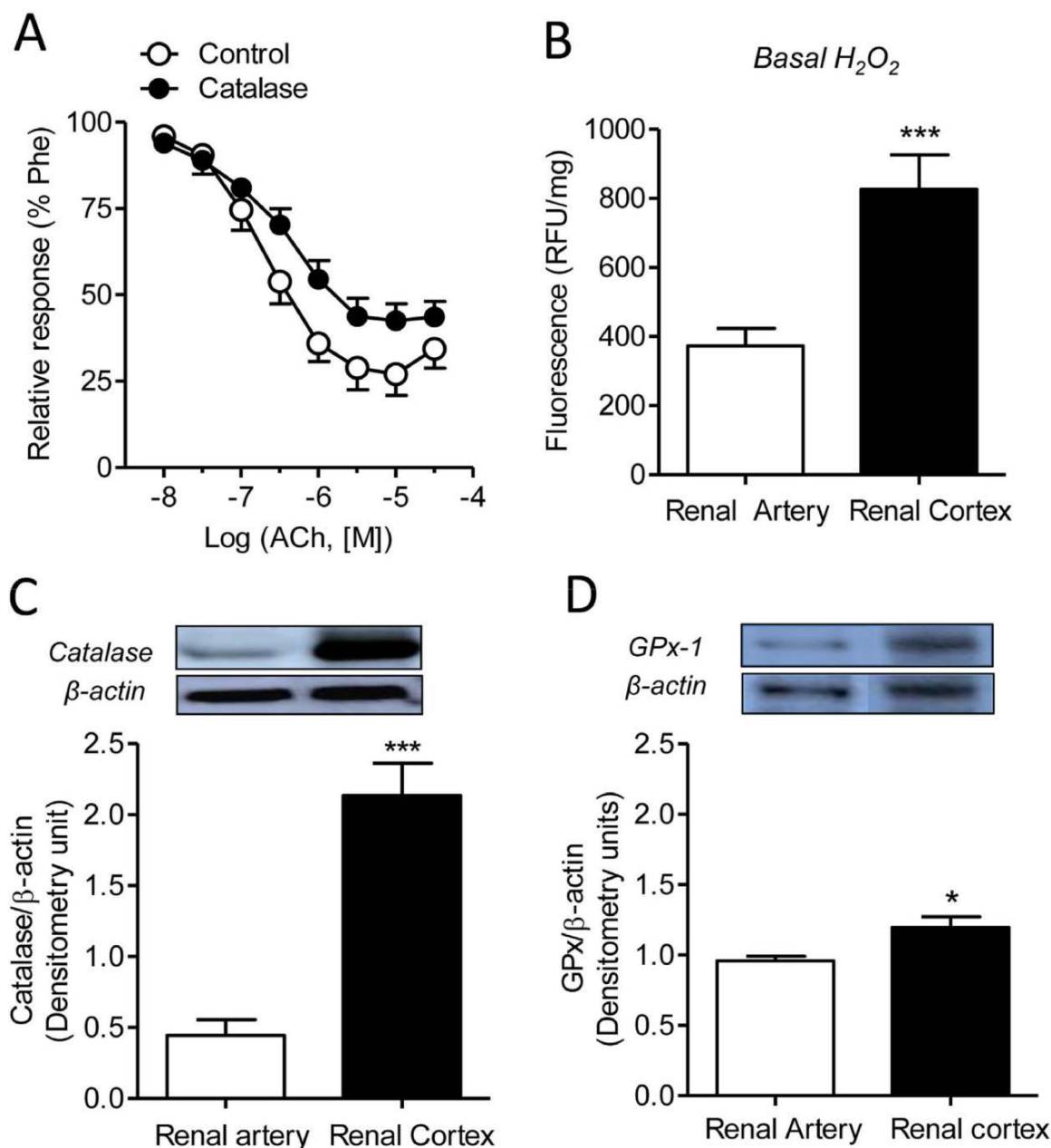


Fig. 1. Effect of catalase on the relaxant responses to ACh and basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and catalase protein levels in kidney vascular and cortical tissues. (A) Average inhibitory effect of catalase (200 U/ml) on the relaxations elicited by ACh in rat renal interlobar arteries. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean ± SEM of 7 arteries. (B) Basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in renal arteries and renal cortex measured by Amplex Red fluorescence assay. Results are expressed in relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue. Bars represent mean ± SEM of 7–11 animals. Statistically significant differences were calculated by unpaired Student's t-test \*\*\*P < 0.001, versus renal arteries. (C, D). Expression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reducing enzymes in renal tissue. Western blots analysis for catalase (C) and glutathione peroxidase 1 (GPx-1) (D) protein levels in renal arteries and renal cortex. Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the catalase or GPx-1 band vs that of β-actin from the sample. Data are shown as the mean ± SEM of 4 animals. Significant differences were analyzed using paired t-test \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001, versus renal arteries.

whose were added previously to determination. Chemiluminescence was measured in a luminometer (BMG Fluostar Optima), and for calculation baseline values were subtracted from the counting values under the different experimental conditions and superoxide production was normalized to dry tissue weight.

2.5. Measurement of hydrogen peroxide by Amplex Red

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured by Amplex Red H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay Kit (Life Technologies) in renal arteries and in renal cortex. Cortex samples and 6–8 segments of the renal interlobar arteries about 4–5 mm long from each Wistar rat were dissected and equilibrated in HEPES-physiological saline solution (PSS) for 30 min at room temperature and then

incubated in the absence (controls) and presence of catalase (200 U/ ml) or the CYP2C inhibitor sulfaphenazole (1 μM) for 30 min at 37 °C. The arteries and the cortex samples were then transferred to microtiter plate black wells containing 10 mM final concentration (Amplex Red) and 10 U/ml final concentration (horseradish peroxidase) in the absence and presence of different ROS sources inhibitors and some samples were stimulated with either NADPH or ACh just prior to determination. Fluorescence was measured in a fluorimeter (BMG Fluostar Optima), using an excitation filter of 544 nm and an emission filter of 590 nm. Background fluorescence was subtracted from the counting values under the different experimental conditions and hydrogen peroxide production was normalized to dry tissue weight and before starting the measure gain is was adjusted. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Table 1

Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging with catalase or glutathione peroxidase mimetic ebselen, and NOS or COX inhibition on the vasodilator responses to acetylcholine (ACh) in renal arteries.

	ACh			
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	n	I <sub>1</sub>
Control	6.70 ± 0.08	73 ± 6	7	229 ± 17
+Catalase	6.41 ± 0.14 <sup>b</sup>	56 ± 5 <sup>c</sup>	7	229 ± 17
Control	6.95 ± 0.09	73 ± 6	11	255 ± 14
+L-NOARG	6.58 ± 0.11 <sup>b</sup>	35 ± 6 <sup>b</sup>	11	255 ± 14
+L-NOARG+Catalase	6.62 ± 0.37 <sup>a</sup>	12 ± 3 <sup>b†</sup>	10	247 ± 12
Control	6.66 ± 0.16	77 ± 4	8	258 ± 22
+Indo	6.54 ± 0.16 <sup>a</sup>	78 ± 4	8	258 ± 22
+Indo+Catalase	6.40 ± 0.12 <sup>a</sup>	72 ± 5	8	258 ± 22
+Indo+Catalase+L-NOARG	6.52 ± 0.17	17 ± 9 <sup>c</sup>	8	233 ± 20
Control	6.94 ± 0.28	60 ± 4	7	238 ± 26
+L-NOARG+Indo+Catalase	6.49 ± 0.27	32 ± 7 <sup>b</sup>	7	238 ± 26
Control	6.81 ± 0.16	66 ± 6	7	267 ± 16
+L-NOARG+Indo+Ebselen	6.88 ± 0.09	46 ± 5 <sup>a</sup>	6	266 ± 16

Values represent mean ± S.E.M. of the number n of individual arteries, 1–2 per animal. pEC<sub>50</sub> is  $-\log EC_{50}$ , being the agonist concentration giving half-maximal relaxation; E<sub>max</sub>=maximal relaxation (% Phe). Significant differences were analyzed by ANOVA or paired Student t-test.

<sup>a</sup> P < 0.05, versus control before treatment.

<sup>b</sup> P < 0.01, versus control before treatment.

<sup>c</sup> P < 0.001, versus control before treatment.

<sup>†</sup> P < 0.05 vs L-NOARG-treated.

concentration was calculated from a calibration curve which was generated with increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0–10 μM).

## 2.6. Measurements of intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)

Simultaneous measurements of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and force were performed in intact renal arteries segments by Fura2-AM fluorescence as previously described [27,28]. Renal arteries were incubated in the dark in PSS containing the indicator 4 μM Fura-2-AM and 0.05% Cremophor EL for a 1 h period at 37 °C. Then arteries were washed three times in PSS to remove remaining Fura-2-AM, and the solution was changed to PSS with fresh Fura-2-AM for another 45 min. After Fura-2-AM loading, arteries were washed for 45 min in PSS. Experiments were performed in PSS at 37 °C continuously gassed with a mixture of 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub> to maintain pH at 7.4. The myograph was mounted on an inverted microscope (Zeiss Axiovert S100 TV) equipped for dual excitation wavelength microfluorimetry (Deltascan, Photon Technology International).

The arteries were illuminated with alternating 340 and 380 nm light using a monochromator-based system (Deltascan, PTI). The fluorescence emission was collected through a 510 nm filter using photo-multiplier and monitored together with the tension. At the end of each experiment, Ca<sup>2+</sup>-insensitive signals were determined after quenching with 25 mM Mn<sup>2+</sup>, and the values obtained were subtracted from those obtained during the experiment. The ratio of fluorescence at 340 and 380 nm (F340/F380) corrected for autofluorescence was taken as a measure of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

Arteries were initially stimulated with KPSS in order to test vessel viability. Then, cumulative concentration-response curves to either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-6</sup> M) or to ACh (10<sup>-8</sup> to 10<sup>-5</sup> M) under conditions of NOS and COX inhibition in the absence and presence of catalase were evaluated in renal arteries pre-contracted with Phe.

## 2.7. Patch-clamp experiments

Intrarenal artery endothelial cells (ECs) were isolated from rat kidneys as described earlier [29,30]. In brief, intrarenal arteries were cut open longitudinally and incubated in trypsin/EDTA (0.25%/0.02%)

in PBS without Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (Biochrom KG, Berlin, Germany) for 30 min at 37 °C. Subsequently, EC were scraped and aspirated from the luminal side using a pipette tip and seeded on a μ-Dish35 mm low (ibidi GmbH, Martinsried, Germany). Before performing patch-clamp experiments, μ-dishes containing isolated intrarenal artery ECs were continuously perfused (0.5 ml/min) at room temperature (21–25 °C), with an extra-cellular solution (for composition see below). Drugs were dissolved in the extracellular solution and applied to the recording μ-dish via a gravity-fed U-tube microperfusion system connected to a vacuum. Freshly isolated cells were used for electrophysiological measurements/recordings within the next 6 h.

Membrane currents were recorded under the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using an Axon Multiclamp 700A amplifier, and pClamp 10 software (Molecular Devices, CA, USA). Whole cell currents were recorded using voltage ramps (–100 to 160 mV, 600 ms) and a holding potential (V<sub>h</sub>) of –50 mV [31]. Amplitudes of K<sup>+</sup> outward currents were measured and normalized to the maximal amplitude of the current in control condition (I/Imax). The standard pipette solution was composed of (in mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 EGTA, 1.71 CaCl<sub>2</sub> (1 μM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>free</sub>) and 5 HEPES (adjusted to pH 7.2 with K(OH)). Calcium was present at the mentioned concentration in the pipette solution to activate K<sub>Ca</sub> currents. Patch pipettes had resistances of 4–7 MΩ. In all experiments, the extracellular solution was composed of (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose and 10 HEPES (adjusted to pH 7.4 with NaOH) [29].

## 2.8. Western blotting analysis of CYP and SOD isoforms levels

Interlobar arteries and renal cortex from Wistar rats (n=8) were homogenized on ice in lyses buffer containing 10 mM Tris–HCl (pH 7.4), 1% SDS, 1 mM sodium vanadate and 0.01% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, Madrid, Spain). After centrifugation at 15,000×g for 20 min at 4 °C, proteins in the supernatants were quantified by the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Madrid Spain). For each sample, 30–80 μg protein/lane was separated in a 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and, after migration, were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare, Madrid, Spain). Non-specific binding was blocked by 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. For immunodetection, the membranes were incubated overnight at 4 °C with the polyclonal primary antibodies: anti-SOD1 (1/4000), anti-catalase (1/1000) and anti-GPx-1 (1/1000) (Santa Cruz Biotechnology, Quimigen, Madrid, Spain), anti-CYP2C11 (1/1000) and anti-CYP2C23 (1/2500) (Abcam, Bristol, UK). The blots were also probed for β-actin (1/50,000) as the loading control using a mouse monoclonal antibody (Sigma Aldrich, Madrid, Spain). The membranes were then washed in 0.05% Tween-20, incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature, and then washed and visualized by chemiluminescence (ECL Select-kit, GE Healthcare, Madrid, Spain) on ImageQuant LAS 500 imaging system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Relative levels of immunoreactive proteins were quantified using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain). Densitometry units were normalized to β-actin.

## 2.9. Immunohistochemistry

Tissue samples from the kidneys containing the interlobar arteries and samples of renal cortex from Wistar rats were immersion-fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate-buffer (PB), cryoprotected in 30% sucrose in PB and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Transversal Section 5 μm thick were obtained by means of a cryostat and preincubated in 10% normal goat serum in PB containing 0.3% Triton-X-100 for 2–3 h. Then, CYP enzymes expression in the vascular wall of renal arteries was determined by immunofluorescence by incubating renal sections from Wistar rats with a rabbit monoclonal anti-CYP2C11 (Abcam, Bristol, UK) or a rabbit anti-CYP2C23 (Abcam,

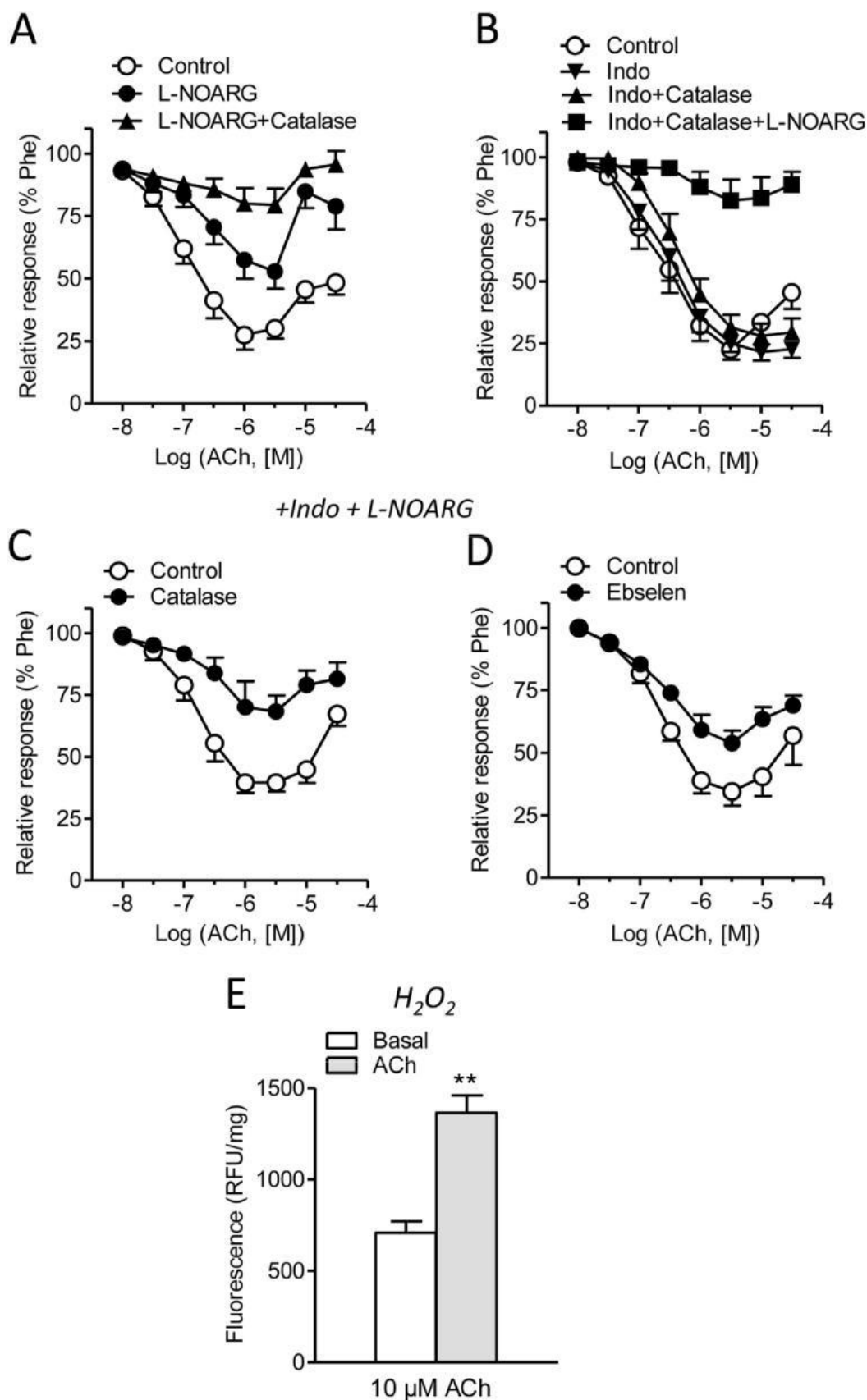


Fig. 2.  $H_2O_2$  is involved in the non-NO non-prostanoid endothelium-dependent relaxant responses of intrarenal arteries. Effects of (A) the NOS synthase inhibitor L-NOARG (100  $\mu$ M) alone or plus catalase (200 UI/ml) and (B) the non-selective COX inhibitor indomethacin (Indo, 1  $\mu$ M) alone or plus catalase plus catalase and L-NOARG on the average relaxant responses to ACh in renal arteries. (C, D) Relaxations to ACh under conditions of NOS and COX blockade are largely inhibited by catalase (C) and by the GPx mimetic ebselen (0.3  $\mu$ M) in renal interlobar arteries. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 7–11 arteries. (D) Basal and ACh-stimulated levels of  $H_2O_2$  production measured by Amplex Red fluorescence assay in renal arteries. Results are expressed in relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue. Bars represent mean  $\pm$  SEM of 5 animals. Statistically significant differences were calculated by unpaired Student's t-test \*\* $P < 0.01$  versus basal levels.

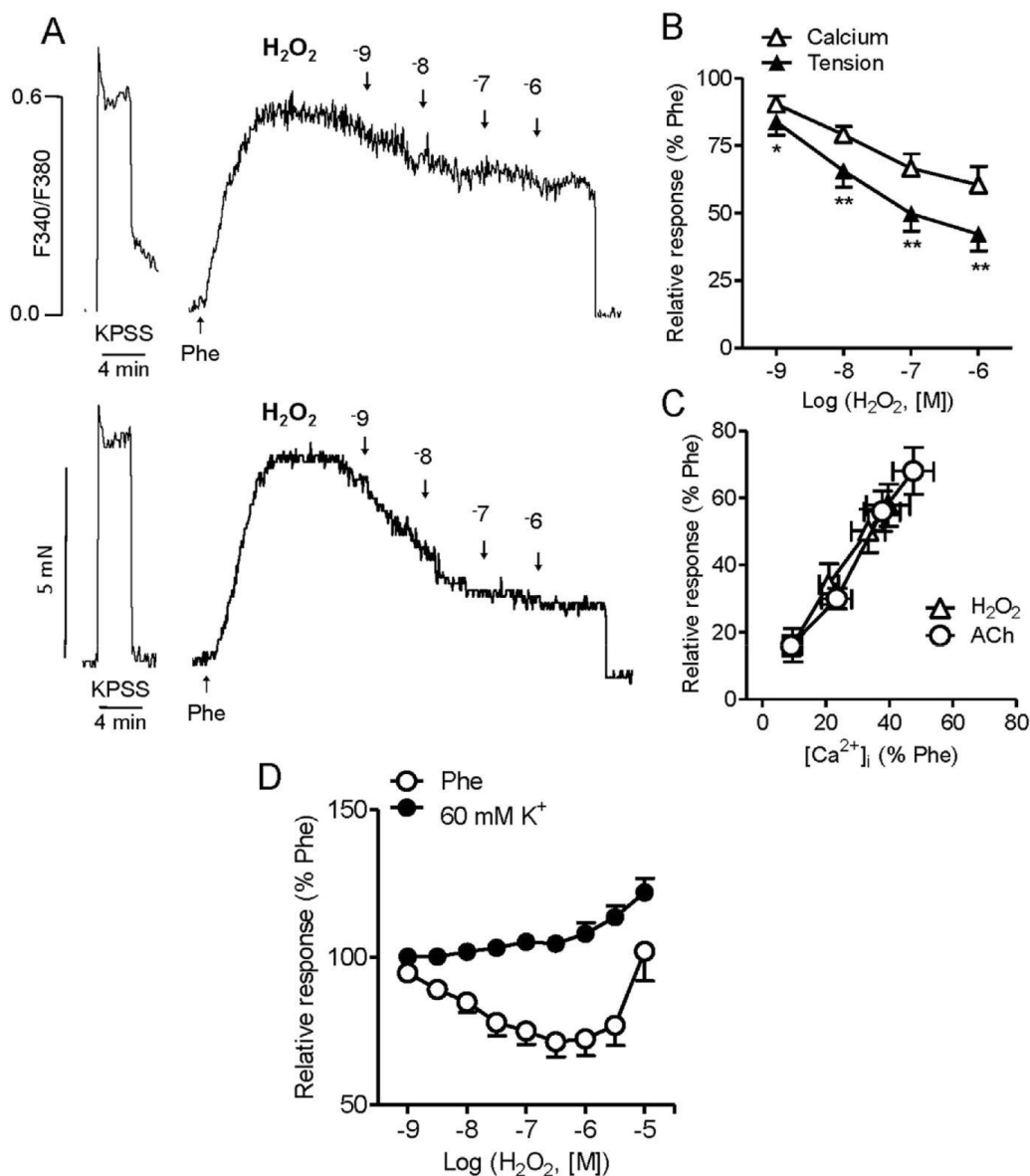


Fig. 3. Exogenous  $H_2O_2$  relaxes renal VSM through both  $Ca^{2+}$ -dependent and  $Ca^{2+}$ -independent mechanisms. (A) Representative traces showing simultaneous recordings of  $[Ca^{2+}]_i$  and tension and the effects of  $H_2O_2$  in intrarenal arteries. Relaxations in response to  $H_2O_2$  were accompanied by decreases of  $[Ca^{2+}]_i$ . Average (B) concentration-dependent decreases in  $[Ca^{2+}]_i$  and relaxations in response to  $H_2O_2$  and (C)  $[Ca^{2+}]_i$ -tension relationships for the effect of  $H_2O_2$  and ACh in renal arteries. Results are expressed as percentage of the increases in  $[Ca^{2+}]_i$  or tension induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 6 arteries, 1 per animal. Statistical significance was calculated by paired Student's t-test \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus tension values (B). (D) Relaxations to  $H_2O_2$  in arteries precontracted with Phe were abolished and turned into contractions in the same arteries precontracted with 60 mM  $K^+$ . Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 6 arteries.

Bristol, UK) diluted at 1:100 and 1:200, respectively, and a mouse monoclonal anti endothelial NO synthase (eNOS) (Chemicon International Inc) diluted at 1:500 for 48 h, washed and allowed to react with a goat secondary serum (Chemicon International Inc) (anti-rabbit for the CYP2C11 and for the CYP2C23) diluted 1:400 for 2 h at room temperature. Secondary antibodies used were Alexa Fluor 594 (red) and Alexa Fluor 488 (green). No immunoreactivity could be detected in sections incubated in the absence of the primary antisera. Preadsorption with CYP proteins showed no cross-reactivity to the antibodies.

2.10. Data presentation and statistical analysis

Results are expressed as either  $N m^{-1}$  of tension or as a percent of the responses to either Phe or KPSS in each artery, as means  $\pm$  SEM of 5–30 arteries (1–2 from each animal) for the functional experiments and results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue and relative fluorescence units per mg of tissue in arterial segments and in each cortex

sample, as means  $\pm$  SEM of 4–22 animals for the measurement of super-oxide production and  $H_2O_2$  production respectively. The statistical differences between means were analyzed by using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons involving more than two groups or by paired or unpaired Student's t-test for comparison between two groups. Probability levels lower than 5% were considered significant. All calculations were made using a standard software package (Prism 4.0, GraphPad, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Involvement of  $H_2O_2$  in the non-NO non-prostanoid endothelium-dependent relaxations of intrarenal arteries

Endothelial function was assessed by the vasodilator responses to ACh in rat renal interlobar arteries. In arteries precontracted with Phe, ACh induced dose-dependent relaxations followed by contractions at

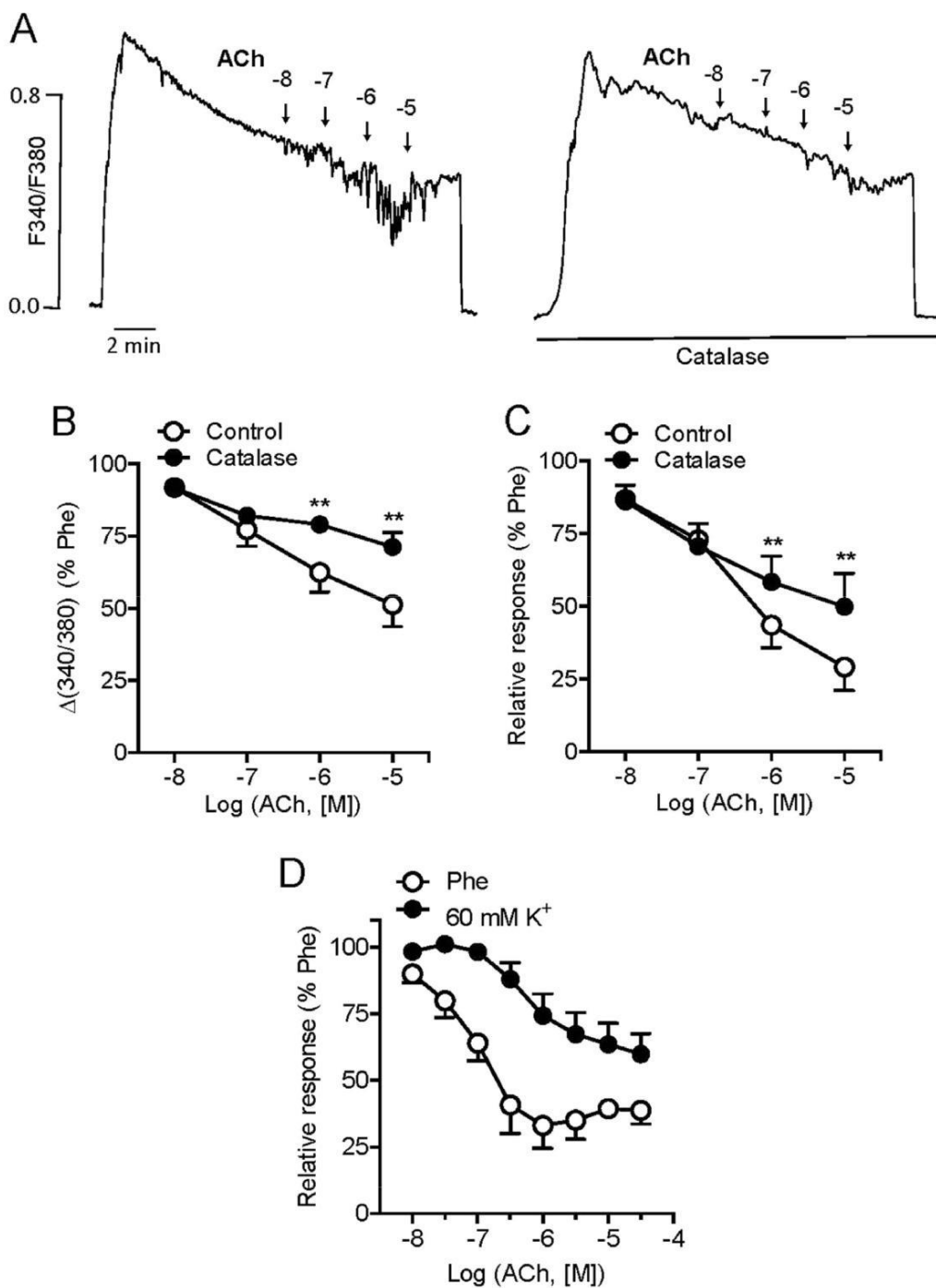


Fig. 4. ACh elicits decreases in renal VSM  $[Ca^{2+}]_i$  and relaxations sensitive to catalase and reduced by high extracellular  $K^+$ . (A) Original recordings showing ACh-induced decreases in VSM  $[Ca^{2+}]_i$  that were blunted by catalase in intact renal interlobar arteries. (B, C) Average inhibitory effect of catalase on (B) the decreases in  $[Ca^{2+}]_i$  and (C) the relaxations to ACh in renal interlobar arteries. (D) Relaxations to ACh were markedly reduced in the arteries precontracted with 60 mM  $K^+$ . Results are expressed as percentage of the increases in  $[Ca^{2+}]_i$  or tension induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 6 arteries. Statistically significant differences were calculated by paired Student's t-test  $**P < 0.01$  versus basal levels.

the higher concentrations. Treatment for 30 min with the  $H_2O_2$  scavenger catalase (200 UI/ml) significantly inhibited the relaxant responses elicited by ACh in a second concentration-response curve (Fig. 1A, Table 1). Basal production of  $H_2O_2$  assessed by Amplex Red assay was detected in rat isolated small interlobar arteries,  $H_2O_2$  levels being about half those of samples from the highly metabolic active renal cortex (Fig. 1B). Western blot analysis showed the expression of the  $H_2O_2$  scavenging enzymes catalase and GPx-1 in the renal arterial wall. Catalase protein levels in rat intrarenal arteries were lower and averaged about one third of those in renal cortex (Fig. 1C), while

expression of GPx-1 was similar in renal arteries and cortex (Fig. 1D). Collectively these data suggest that  $H_2O_2$  is involved in the endothelium-dependent relaxations of rat intrarenal arteries.

Since eNOS was initially shown to be a source of endothelial-derived  $H_2O_2$ , in mesenteric arterioles [4], experiments were performed under conditions of NOS or COX inhibition and/or  $H_2O_2$ -scavenging, in order to dissect the functional components of the ACh relaxant responses in rat intrarenal arteries. Treatment with L-NOARG (100  $\mu$ M) significantly reduced ACh-evoked relaxations, and further incubation with L-NOARG plus catalase produced an additional inhibi-

tion of the ACh responses (Fig. 2A, Table 1), suggesting that a main part of the relaxation is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> not derived from NOS. On the other hand, blockade of COX with indomethacin did not affect relaxations to the lower doses of ACh but enhanced those to the higher concentrations, thus confirming a COX-dependent endothelial contractile component [24]; combined treatment with indomethacin plus catalase moderately inhibited ACh relaxant responses (Fig. 2B, Table 1). Under conditions of NOS and COX blockade, catalase and the GPx mimetic ebselen reduced the relaxations induced by ACh (Fig. 2C and D; Table 1), which supports a role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the non-NO non-prostanoid endothelium-dependent relaxations of rat intrarenal arteries. Accordingly, ACh stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in arteries treated with L-NOARG and indomethacin (Fig. 2E) thus confirming the involvement of endothelial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in renal vasodilator responses.

3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduces VSM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and relaxes intrarenal arteries

Simultaneous measurements of VSM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and tension were performed to further investigate the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in renal endothelium-dependent vasodilatation and the effect of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was assessed in arteries precontracted with Ph. Increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 nM to 1 μM) elicited relaxations that were accompanied by simultaneous decreases in VSM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Fig. 3A and B). However, relaxations evoked by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were larger than the corresponding

decreases in VSM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> at the same concentrations (Fig. 3B) and the tension-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> relationships for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and also for ACh suggest the involvement of Ca<sup>2+</sup> desensitization mechanisms (Fig. 3C). The relaxation elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was abolished and turned into vasoconstriction to the higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations when raising the extracellular K<sup>+</sup> concentration (Fig. 3D), suggesting that K<sup>+</sup> efflux and hyperpolarization mechanisms are in part responsible for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaxant effects in renal arteries. ACh induced decreases in VSM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> along with relaxations and both were inhibited by catalase (Fig. 4A–C) indicating that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in these responses. This relaxant response to ACh was markedly reduced when raising extracellular K<sup>+</sup> suggesting hyperpolarizing mechanisms.

3.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances endothelial K<sup>+</sup> currents in ECs from intrarenal arteries by promoting intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization

Since H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been reported to potentiate Ca<sup>2+</sup> release from endothelial stores leading to the opening of hyperpolarizing endothelial K<sub>Ca</sub> channels [11], ‘whole-cell’ patch-clamp experiments were performed to assess whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has an effect on these currents in freshly isolated ECs from intrarenal arteries. In single cells, a voltage-ramp from -100 to +160 mV, 600 ms (V<sub>h</sub> = -50 mV) and 1 μM Ca<sup>2+</sup> into the patch-pipette activated K<sup>+</sup> outward currents that were voltage-dependent and showed outward rectification at the more positive

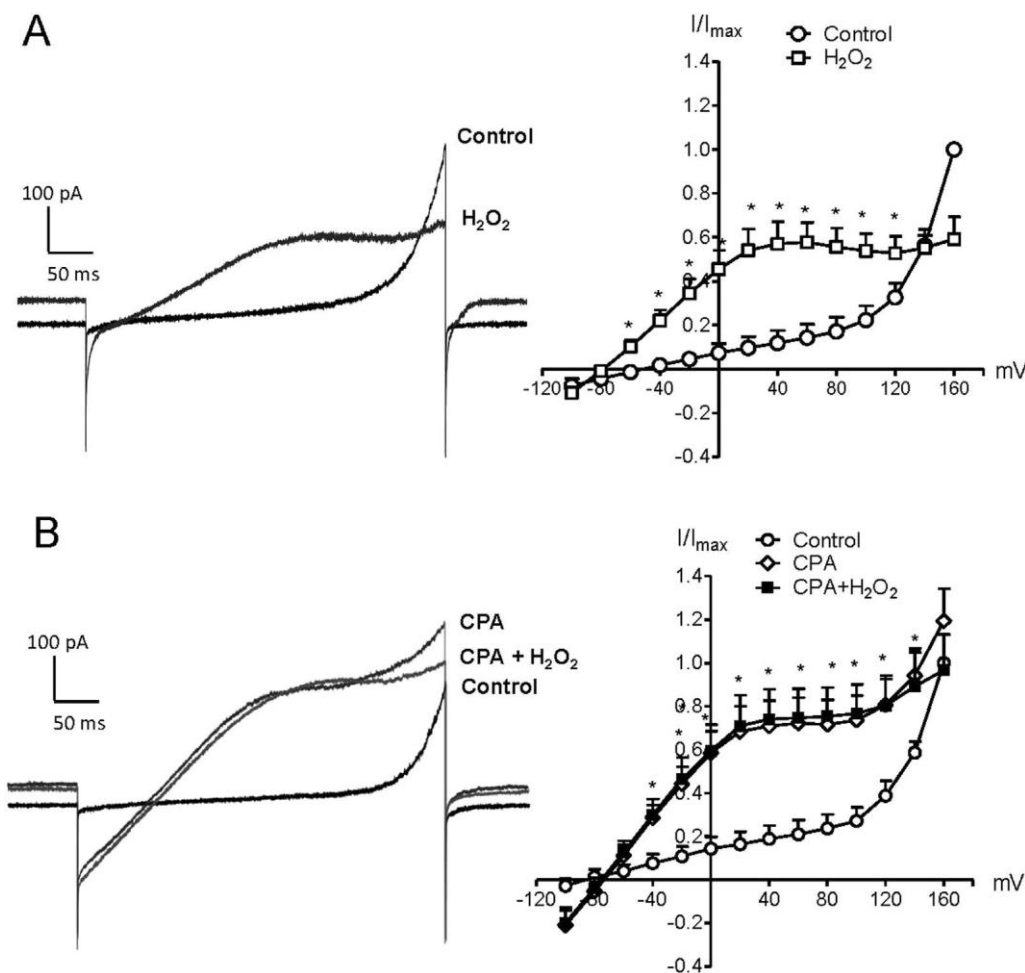


Fig. 5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates K<sup>+</sup> currents in isolated renal endothelial cells. (A, B) Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the SERCA inhibitor CPA alone or combined with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the outward currents recorded under the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in endothelial cells freshly isolated from rat intrarenal arteries. Whole cell currents were recorded using voltage ramps (-100 to 160 mV, 600 ms) and a holding potential (V<sub>h</sub>) of -50 mV. Original current recordings (left) and average values (right) of (A) the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM) after 10 min application and (B) effect of CPA (10 μM) after 10 min alone or combined with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on outward currents of isolated renal endothelial cells. Amplitudes of K<sup>+</sup> outward currents were measured and normalized to the maximal amplitude of the current in control condition (I/I<sub>max</sub>). Statistical significance was calculated by paired Student's t-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test \*P < 0.01 versus control currents in the absence of treatment.

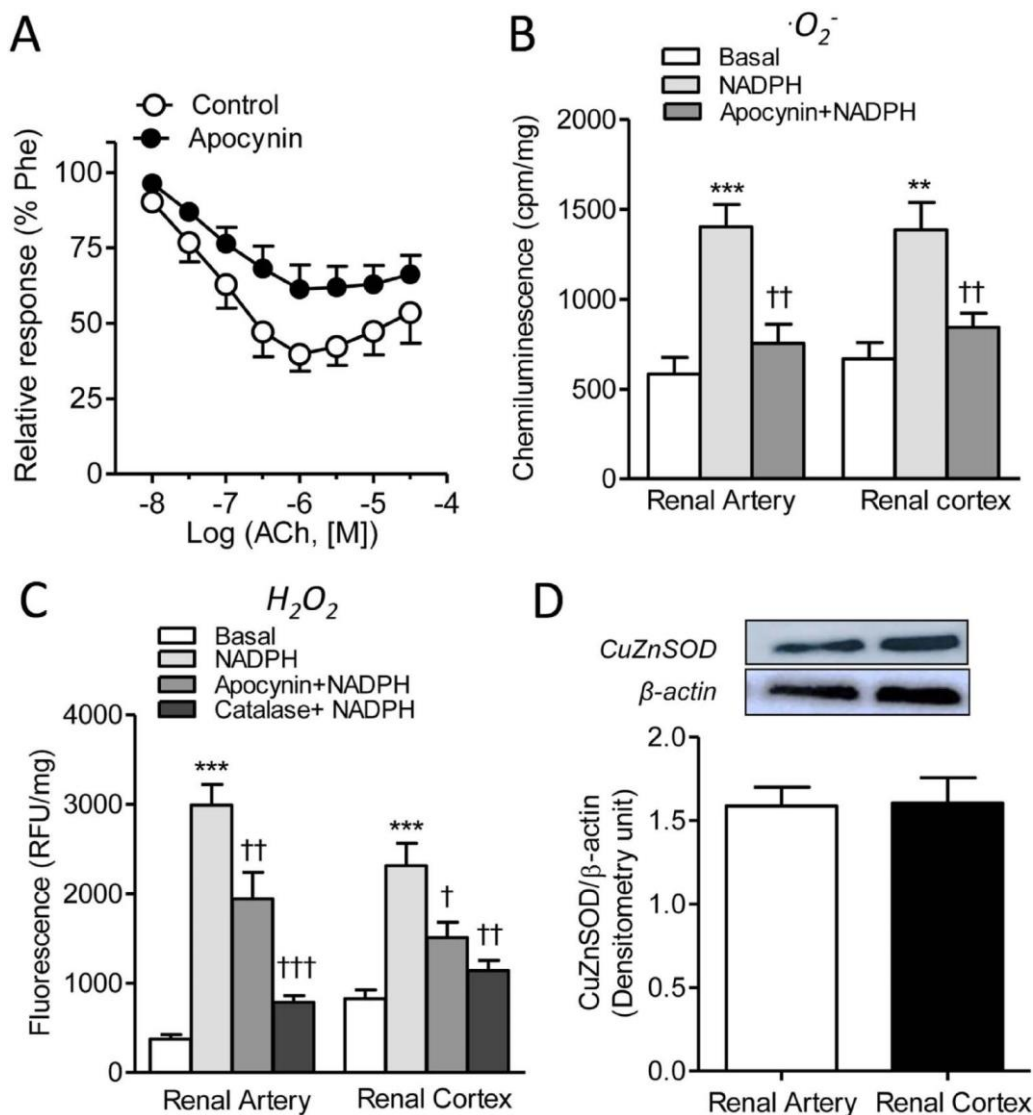


Fig. 6. NADPH oxidase is a source of ROS generation in intrarenal arteries. (A) Effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin (30  $\mu$ M) on the relaxant responses to ACh of rat renal interlobar arteries under conditions of NOS and COX blockade. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 7–8 arteries. (B, C) Basal and NADPH-stimulated levels  $O_2^{\cdot -}$  (B) and  $H_2O_2$  (C) measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence (B) and by Amplex Red fluorescence (C) in renal arteries and renal cortex. NADPH-stimulated levels of superoxide and  $H_2O_2$  production were reduced by apocynin (B, C) and catalase (C). Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue for chemiluminescence and in relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue for fluorescence. Bars represent mean  $\pm$  SEM of 6–11 animals. Significant differences were analyzed using unpaired t-test  $^{\dagger}P < 0.05$  versus NADPH-treated in renal cortex and using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a posteriori test  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  versus control before treatment,  $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ ;  $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$  versus NADPH-treated. (D) Western blots analysis for cytosolic CuZnSOD protein levels were in renal arteries and renal cortex. Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the CuZnSOD band vs that of  $\beta$ -actin from the sample. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 4 animals.

membrane potentials (Fig. 5A), corresponding to the basic electrophysiological properties of  $K_{Ca1.1}$  channels. Addition of 10  $\mu$ M  $H_2O_2$  to the perfusate induced an increase in baseline current and further application of a voltage-ramp elicited a significant increase in the amplitude (to  $0.57 \pm 0.11$  at +40 mV,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) and a change in the shape of the outward currents, resembling  $K_{Ca3.1}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents (Fig. 5A); however,  $H_2O_2$  significantly inhibited the outward rectifying currents amplitude (to  $0.59 \pm 0.11$  at +160 mV,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5A), as earlier reported in porcine renal endothelium in situ [32]. Furthermore,  $H_2O_2$ -induced currents shown time dependence and reached the maximal effect and stabilized at 10–15 min (Fig. S2).

As the effect of  $H_2O_2$  on outward currents has been ascribed to the mobilization of  $Ca^{2+}$  from ER stores leading to activation of  $K_{Ca}$  channels [11], we assessed the effect of the SERCA inhibitor cyclopia-zonic acid (CPA), which mobilizes intracellular  $Ca^{2+}$  by depleting ER  $Ca^{2+}$  stores, on outward currents of renal ECs. Addition of 10  $\mu$ M CPA

to the perfusate induced a similar significant increase in the baseline current as 10  $\mu$ M  $H_2O_2$ . Application of a voltage-ramp evoked a marked increase in the amplitude and a change in the shape of the outward currents similar to that evoked by 10  $\mu$ M  $H_2O_2$  ( $0.71 \pm 0.13$  at +40 mV,  $n=6$ ,  $p < 0.05$ ), without significantly affecting the outward rectifying currents ( $1.19 \pm 0.16$  at +160 mV) (Fig. 5B). In the presence of CPA,  $H_2O_2$  did not further modify either the amplitude of the currents ( $0.74 \pm 0.15$  at +40 mV,  $n=6$ , n.s.), or the outward rectifying currents ( $0.97 \pm 0.20$  at +160 mV,  $n=6$ , n.s.) (Fig. 5B).

### 3.4. Role of NADPH oxidase in the $H_2O_2$ -mediated endothelium-dependent relaxations of renal arteries

In order to evaluate the possible endothelial sources of ROS generation involved in the endothelium-dependent relaxations of rat intrarenal arteries, the effect of the non-selective NADPH inhibitor

Table 2

Effect of inhibition of NADPH oxidase with apocynin, of CYP2C9 with sulfaphenazole and of the soluble epoxide hydrolase with TPPU on the vasorelaxation in response to acetylcholine (ACh) of renal arteries.

	ACh			
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	n	I
Control	6.68 ± 0.27	60 ± 6	7	252 ± 19
+Apocynin	7.22 ± 0.20	39 ± 9 <sup>a</sup>	7	252 ± 19
Control	7.40 ± 0.08	58 ± 7	6	262 ± 15
+Sulfaphenazol	7.03 ± 0.05 <sup>b</sup>	39 ± 7 <sup>b</sup>	6	262 ± 15
+Sulfaph+Catalase	6.51 ± 0.33 <sup>b</sup>	27 ± 6 <sup>b</sup>	6	262 ± 15
Control	7.00 ± 0.12	68 ± 5	6	243 ± 25
+TPPU	6.85 ± 0.17	49 ± 7 <sup>b</sup>	6	243 ± 25
Control	6.69 ± 0.23	56 ± 3	6	246 ± 20
+Apocynin+Sulfaph	6.86 ± 0.29	24 ± 3 <sup>b</sup>	6	246 ± 20

Values represent mean ± S.E.M. of the number n of individual arteries, 1–2 per animal. pEC<sub>50</sub> is  $-\log EC_{50}$ , being the agonist concentration giving half-maximal relaxation; E<sub>max</sub>=maximal relaxation (% Phe). Significant differences were analyzed by paired Student t-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

<sup>a</sup> P < 0.05, versus control before treatment.

<sup>b</sup> P < 0.01, versus control before treatment.

apocynin was assessed on the relaxant responses to ACh. Under conditions of NOS and COX blockade, treatment with apocynin inhibited ACh relaxant responses (Fig. 6A, Table 2). Basal  $O_2^{\bullet -}$  and  $H_2O_2$  generation assessed by lucigenin chemiluminescence and Amplex Red fluorescence assays, respectively, were markedly enhanced by NADPH addition and blunted by both apocynin and catalase in both renal interlobar arteries and renal cortex (Fig. 6B and C), thus confirming that NADPH oxidase-derived  $O_2^{\bullet -}$  and  $H_2O_2$  are generated in both renal cortical and arterial tissue under physiological conditions. Furthermore, Western blot analysis demonstrated that protein levels of the cytosolic CuZnSOD catalyzing enzyme that dismutates  $O_2^{\bullet -}$  to  $H_2O_2$ , were high in renal arteries and similar to those in the renal cortex (Fig. 6D), thus ensuring the generation of  $H_2O_2$  from NADPH-derived  $O_2^{\bullet -}$  in the arterial wall.

### 3.5. Role of CYP epoxygenases in the endothelium-dependent relaxations of renal arteries

Since CYP enzymes-derived metabolites have important functions in the kidney, a possible contribution of CYP epoxygenases to the ACh-induced endothelial relaxations of renal arteries was elucidated by testing the effects of the specific CYP2C inhibitor sulfaphenazole and of the potent soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitor TPPU on the responses to ACh. Under conditions COX and NOS inhibition, treatment with sulfaphenazole (1  $\mu$ M) inhibited most of the catalase-sensitive ACh-induced relaxations (Fig. 7A, Table 2). However, inhibition of sEH, the enzyme hydrolyzing and inactivating EETs, reduced rather than enhanced relaxant responses to ACh (Fig. 7B, Table 2), indicating that CYP epoxygenases-derived EETs mostly have a contractile effect in intrarenal arterioles. Furthermore, ACh-stimulated  $O_2^{\bullet -}$  and  $H_2O_2$  production were reduced by inhibition of CYP2C with sulfaphenazole in isolated intrarenal arteries (Fig. 7C and D) thus suggesting that CYP epoxygenases are a functionally relevant sources of endothelial ROS generation in renal arteries. NADPH-stimulated  $H_2O_2$  production was inhibited by sulfaphenazole in both renal arteries and renal cortex (Fig. 7E). Since both NADPH oxidases and CYP epoxygenases appear to contribute to the non-NO non-prostanoid endothelium-dependent re-laxations of intrarenal arteries, the effects of combined blockade of both enzymes on the relaxant responses to ACh was evaluated. Treatment with apocynin (30  $\mu$ M) plus sulfaphenazol (1  $\mu$ M) reduced ACh-induced relaxations to a larger extent than the inhibition produced by either inhibitor alone (Fig. 8, Table 2).

In order to assess the distribution of CYP epoxygenases in renal tissue, expression of CYP2C11 and CYP2C23 proteins was determined

by immunohistochemistry in the endothelium and vascular smooth muscle (VSM) layer and by Western blot of renal interlobar arteries and renal cortex. Immunostaining of arterial sections with CYP2C11 and CYP2C23 antibodies revealed that these constitutive isoforms were uniformly distributed in the endothelium of renal arteries colocalized with eNOS (Fig. 9A and B, upper panel) and also in the glomeruli and endothelial lining of arterioles in the renal cortex (Fig. 9A and B, lower panel). Small aggregates of immunoreactivity were also found in VSM layer. No apparent differences in either distribution or density of the renal arteries immunolabeling were observed between CYP2C11 and CYP2C23 (Fig. 9A and B). However, immunostaining for CYP2C23 was more intense than that for CYP2C11 in renal cortex (Fig. 9B). To confirm these findings using more quantitative methods, CYP2C11 and CYP2C23 protein levels were next determined using Western blot analysis. CYP2C11 protein levels were significantly higher in renal arteries (Fig. 9C) while CYP2C23 levels were significantly lower in renal arteries compared to renal cortex (Fig. 9D).

## 4. Discussion

ROS like  $H_2O_2$  have been involved in the EDH-type relaxant responses in arteries from various vascular beds including mesenteric and coronary arterioles [4,6,33], but its role in renal endothelial function has mainly been investigated in the harmful context of NADPH oxidase- and mitochondria-derived ROS generation in vascular disease and renal injury associated to diabetes and insulin resistant states [17,24,34]. The present study first provides evidence for a physiological role of  $H_2O_2$  in the endothelium-dependent hyperpolarization and vasodilatation of rat intrarenal arteries. Under conditions of NOS and COX inhibition, the endothelial agonist ACh elicited relaxations and stimulated  $H_2O_2$  release that were inhibited by catalase. Exogenous  $H_2O_2$  relaxed renal arteries, reduced intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  in renal VSM, and markedly increased  $K^+$  currents in renal endothelial cells. Catalase-sensitive relaxations and ROS generation stimulated by ACh in renal arteries were reduced by selective blockade of CYP enzymes. CYP2C23 and CYP2C11 epoxygenases were abundantly distributed and co-localized with eNOS in the endothelium of renal arterioles and glomeruli, as sources of  $H_2O_2$  generation in the vascular wall.

### 4.1. Involvement of $H_2O_2$ in renal endothelial vasodilatation

$H_2O_2$  is involved in the metabolic regulation of coronary blood flow [7] and is released from the endothelium by flow and agonists [6,33]. In the present study, non-NO non-prostanoid endothelium-dependent relaxations were inhibited by catalase in rat intrarenal arteries suggesting the involvement of endothelium-derived  $H_2O_2$ . Furthermore, we demonstrate here that ACh stimulated  $H_2O_2$  generation and low concentrations of exogenous  $H_2O_2$  relaxed renal arteries thus mimicking catalase-sensitive renal vasodilatation.  $H_2O_2$  has been proposed both as a vasodilator in mice renal afferent arterioles [35] and human renal VSM cells [36], but also as a vasoconstrictor in rat major renal arteries [37]. The ability of  $H_2O_2$  to relax or contract a given vascular bed has been ascribed to the arterial size and the degree of arterial depolarization [27]. Accordingly, raising extracellular  $K^+$  abolished the relaxing effect of  $H_2O_2$  and turned it into vasoconstriction in the rat small renal interlobar arteries used in the present study [24]. Basal levels of  $H_2O_2$  measured in isolated arteries were high although lower than those of renal cortex of higher metabolic activity. Interestingly, expression of catalase, an enzyme with very high turnover rates, was proportionally much lesser in renal arteries compared to renal cortex, which suggests that a differential constitutive lower expression/activity of catalase might enhance vasodilator activity of  $H_2O_2$  released in the renal vascular wall. On the other hand, endothelial relaxations elicited by ACh were reduced by the GPx mimetic ebselen and the  $H_2O_2$  reducing enzyme GPx-1 was expressed in both renal arteries and cortex. GPx-1 is present in vascular endothelial cells and its expression and activity are up-regulated by laminar shear stress [38]. Since  $H_2O_2$  is released by

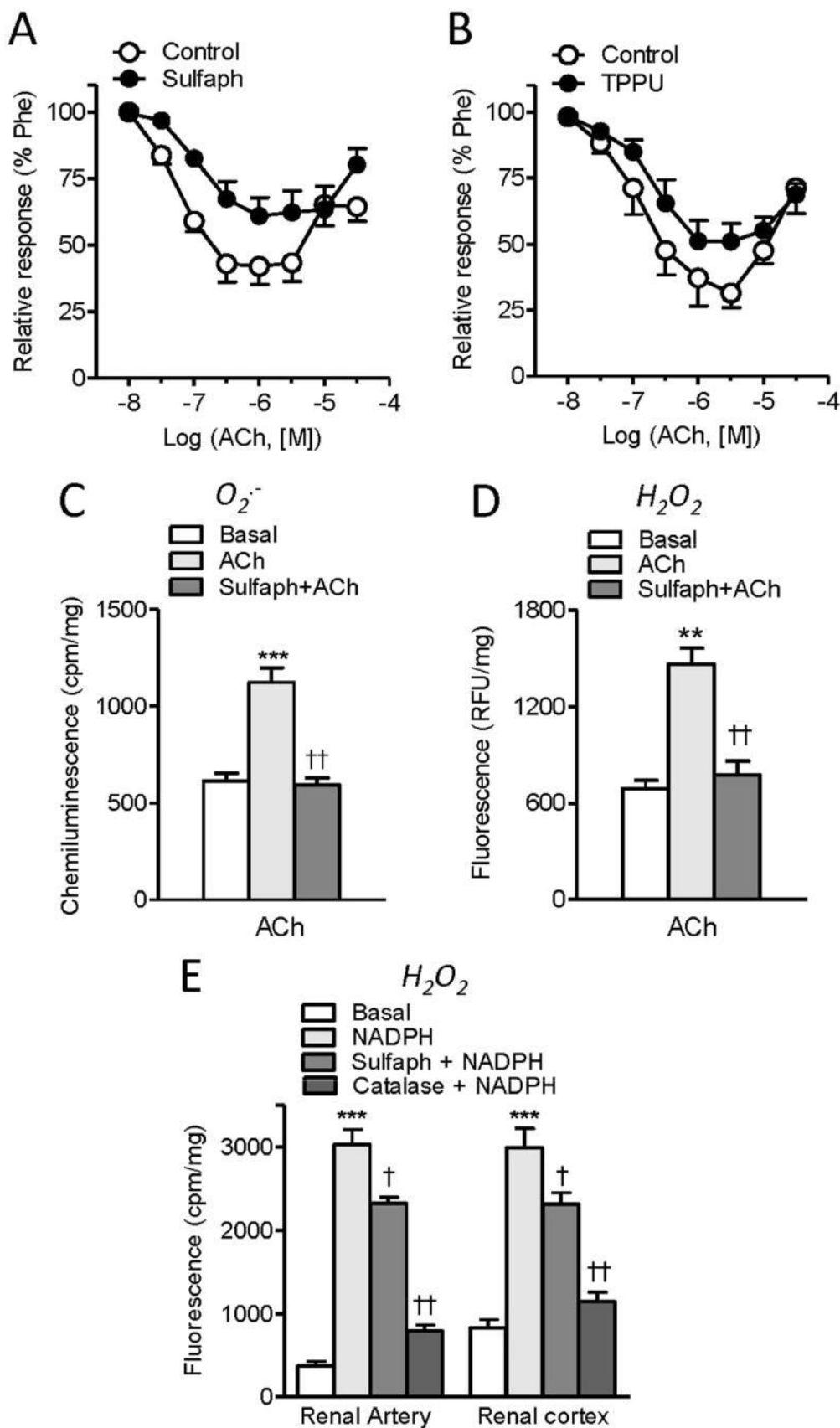


Fig. 7. CYP epoxygenase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-dependent relaxations of intrarenal arteries. Relaxations to ACh (A) and ACh-stimulated O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (C, D) are blunted by CYP2C9 inhibition. Average effects of (A) the CYP2C9 inhibitor sulfaphenazole (1 μM) and (B) the sEH inhibitor TPPU (0.01 μM) on the relaxant responses to ACh under conditions of NOS and COX blockade in isolated interlobar arteries. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean ± SEM of 6 arteries. (C, D) Effects of sulfaphenazole (1 μM) on ACh-stimulated levels of O<sub>2</sub><sup>-</sup> (C) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D) production measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence (C) and by Amplex Red fluorescence (D), respectively, in renal arteries. (E) NADPH-stimulated levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production were reduced by sulfaphenazole and catalase. Bars represent mean ± SEM of 5–11 animals. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue for chemiluminescence and in relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue for fluorescence. Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a posteriori test \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 versus control before treatment, †P < 0.05, ††P < 0.01 versus ACh- or NADPH-treated.

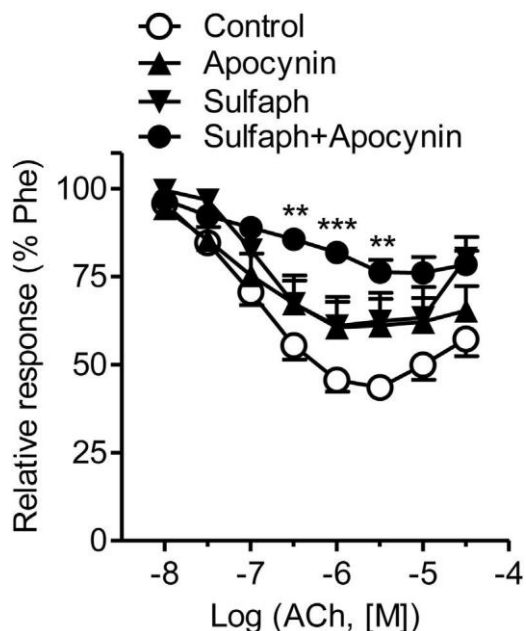


Fig. 8. Both CYP-epoxygenase- and NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribute to the endothelium-dependent relaxations of intrarenal arteries. Effect of inhibition of CYP2C9 epoxygenase with sulfaphenazol (1 μM), NADPH oxidase with apocynin (30 μM) or combined blockade of CYP2C9 epoxygenase and NADPH oxidase on the relaxant responses to ACh of rat renal interlobar arteries, under conditions of NOS and COX blockade. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean ± SEM of 7–8 arteries. Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a posteriori test: \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 versus control before treatment.

flow in coronary arterioles [6,13,40], the data obtained with catalase and GPx in intrarenal arteries reinforce the concept that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a vasodilator released from the renal endothelium.

4.2. Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> renal vascular actions

Endothelium-dependent relaxations in renal arteries and arterioles have long time been characterized by a predominant hyperpolarizing component or EDH response, initially attributed to diffusible factors such as K<sup>+</sup> ions or CYP metabolites released from the endothelium that directly hyperpolarized VSM [23,39]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been identified as a transferable EDHF released by flow or agonists that stimulated VSM K<sup>+</sup> channels to induce hyperpolarization and relaxation in mesenteric and coronary arterioles [4,6,8,40,41]. Our data demonstrate that low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaxed renal arteries and decreased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in renal VSM. Furthermore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced relaxations were abolished by raising extracellular K<sup>+</sup> which suggests VSM hyperpolarization and supports recent findings showing that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaxes mice afferent arterioles by activating K<sub>Ca</sub> and voltage-activated K<sup>+</sup>(K<sub>v</sub>) channels [35]. However, the magnitude of the peroxide lowering effect on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was lesser than that of its relaxing effect in renal arteries, in agreement with findings in other arterial beds wherein endothelial stimulation released H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and induced catalase-sensitive relaxations, but H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not mimicked the magnitude of the hyperpolarizing effect on VSM evoked by endothelial agonists [42]. In the present study, the

relationship between the decreases in VSM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and the vasodilation evoked by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in renal arteries suggests that besides VSM hyperpolarizing mechanisms, Ca<sup>2+</sup> desensitization mechanisms are involved in the relaxant effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to EDHF-dependent vasodilatation has recently been ascribed to activation of protein kinase G (PKG) catalytic activity through oxidation of the α1 subunit [43,44]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can dilate human coronary arterioles by activation of PKGα1 and subsequent opening of BK<sub>Ca</sub> and hyperpolarization of VSM cells [40,41]. However, besides its role in the modulation of K<sup>+</sup> channels gating, PKG can efficiently phosphorylate the myosin target subunit of myosin phosphatase providing a mechanism for Ca<sup>2+</sup> desensitization and relaxation of smooth muscle [45], which may explain the Ca<sup>2+</sup> desensitization mechanisms found for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in renal VSM.

EDH-mediated vasodilatation was initially considered the result of a diffusible factor released from the endothelium that hyperpolarized and relaxed VSM, but it is now accepted to involve the electrotonical spread of the hyperpolarization initiated at endothelial cells to the underlying VSM via myoendothelial gap junctions [1–3]. We first provide evidence here that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> released from the renal endothelium by ACh plays a main role in the EDH response of renal arteries through a mechanism that involves stimulation of K<sup>+</sup> channel activity in renal endothelial cells. We have recently demonstrated that ACh activates intermediate- and small-conductance K<sub>Ca</sub> channels in freshly isolated renal endothelial cells associated to endothelium-dependent relaxations sensitive to intermediate- and small-conductance K<sub>Ca</sub> channel inhibitors [29]. Earlier studies on the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an EDHF in mesenteric and coronary arterioles already suggested that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> might have a major effect on K<sub>Ca</sub> channels in endothelial cells, since H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced relaxations were sensitive to inhibitors of small- and intermediate-conductance K<sub>Ca</sub> channels in endothelium-intact [6] but not in endothelium-denuded [4] microvessels. In the present study, we demonstrate that exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM) induced a slow, pronounced and long-lasting activation of the same K<sub>Ca</sub> currents as those activated by ACh in endothelial cells isolated from renal arteries [29], which indicates that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> released by endothelial stimulation hyperpolarizes endothelial cells and may thus initiate an EDH vasodilator response in renal arteries, via a mechanism that is distinct from its action in VSM.

Endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity promoted by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been suggested to be secondary to the amplification of Ca<sup>2+</sup> entry or Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores in endothelial cells [2,11]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evokes intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in both endothelial and VSM cells via oxidation of IP<sub>3</sub> receptors in the ER [28,46–48]. Moreover, it has been recently reported that endothelial agonists induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in endothelial cells reduced by catalase and potentiated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [49]. In our study, depletion of ER Ca<sup>2+</sup> stores by inhibition of SERCA with CPA evoked a pronounced activation of K<sup>+</sup> currents in isolated renal endothelial cells, and this effect was not further increased after combined treatment of CPA plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which suggests a common mechanism of action for both agents and supports the concept that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mobilizes Ca<sup>2+</sup> from ER stores in endothelial cells leading to stimulation of K<sub>Ca</sub> channel activity and hyperpolarization of renal endothelial cells [2,11,49].

4.3. Involvement of CYP-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the endothelium-dependent vasodilatation of renal arteries

Endothelial cells can produce ROS from a number of different

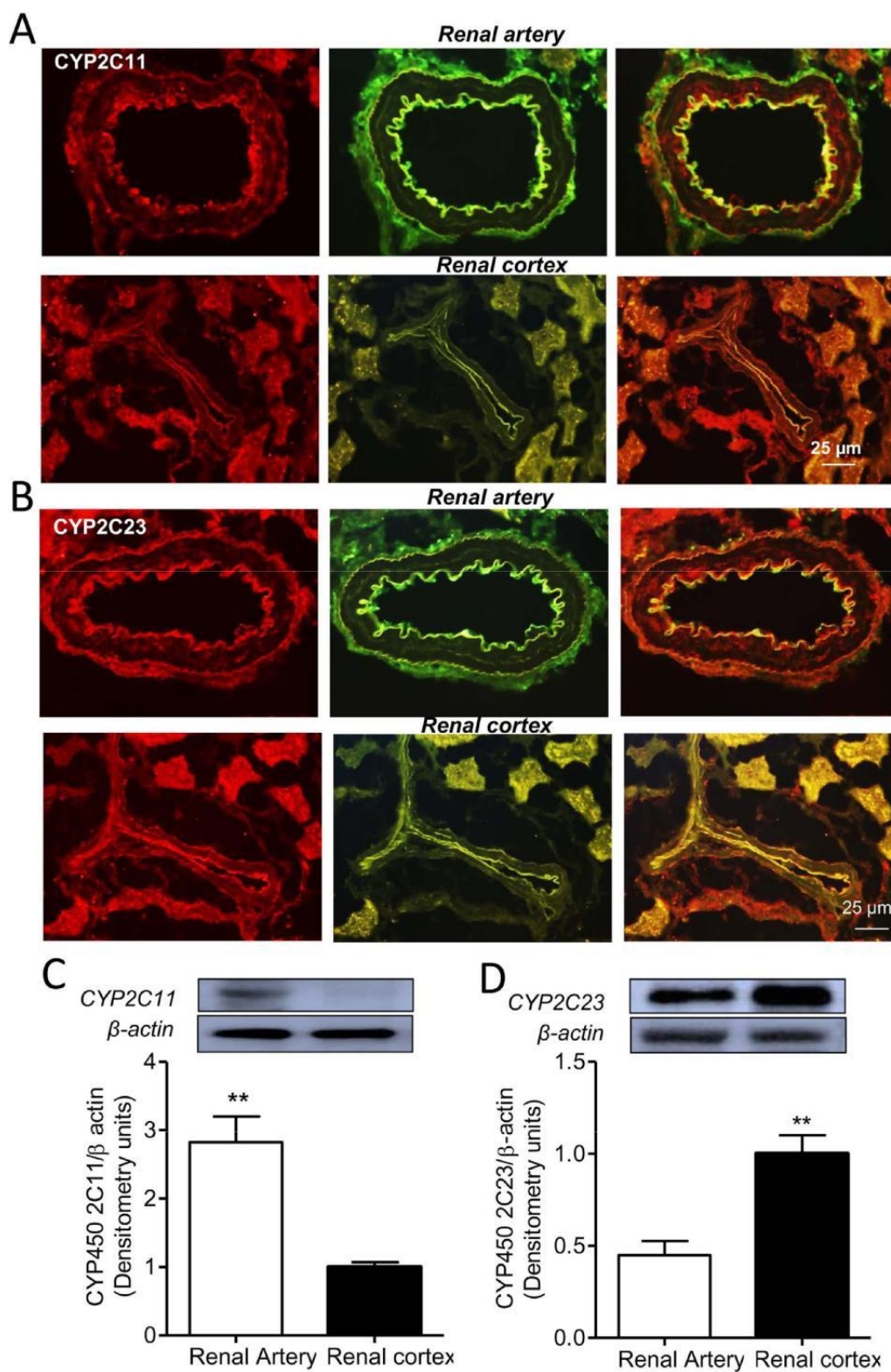


Fig. 9. CYP2C11 and CYP2C23 are expressed in the renal endothelium colocalized with eNOS. (A, B) Immunohistochemical demonstration of CYP2C11 and CYP2C23 in renal interlobar artery and cortex. Immunofluorescence for CYP2C11 and CYP2C23 proteins (red areas) was distributed throughout the endothelial lining of the renal interlobar artery (upper panels) and in the glomeruli (G) and endothelium of arterioles (A) in the renal cortex (lower panels). Endothelial cell layer was visualized with the anti-eNOS marker (green). Immunofluorescence double labelling for eNOS marker and CYP2C11/23 expression in endothelial cell layer demonstrates colocalization in endothelium (yellow areas) in both renal artery and cortex. Scale bars indicate 25 μm. Sections are representative of n=3 animals. (C, D) Western blot analysis of CYP2C11 (C) and of CYP2C23 (D) enzyme expression in renal artery and renal cortex. CYP2C11 protein levels were higher in renal arteries and CYP2C23 in samples of renal cortex. Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the CYP2C11/ 23 bands vs those of β-actin from the sample. Data are shown as the mean ± SEM of 4 animals. Significant differences were analyzed using unpaired t-test \*\*P < 0.01 versus renal cortex or artery.

sources including NADPH oxidase, the mitochondrial electron transport chain, uncoupled NOS, CYP epoxygenases, xanthin oxidases, COX and lipoxygenases. In renal arteries, endothelial COX-1 and constitutive COX-2 are relevant sources of ROS, namely superoxide, that contribute to endothelium-dependent contractions under physiological conditions [24].  $H_2O_2$  was initially identified as an eNOS-derived EDHF in mouse mesenteric arterioles, since ACh-stimulated  $H_2O_2$  release was blunted in eNOS knockout mice [4]. However, the current data demonstrate that under conditions of eNOS and COX inhibition, ACh evoked non-NO non-prostanoid relaxations sensitive to catalase and stimulated  $H_2O_2$  generation in renal arteries, thus suggesting a source of  $H_2O_2$  different from eNOS or COX. In the kidney, NADPH oxidase enzymes (Nox) are distributed in a regional manner, Nox4 and also Nox2 being the predominant forms. NADPH oxidase, in particular Nox4, has been found to be a major source of ROS generation, oxidative stress and renal injury mostly under pathological conditions such as diabetic nephropathy and chronic kidney disease [16,17] and in renal arteries from elderly patients [50]. Here we provide evidence that NADPH oxidase may also be a source of vasodilator  $H_2O_2$  in intrarenal arteries, as shown by the inhibitory effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ACh-induced relaxations and also on the NADPH activity generating  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  in renal arteries under physiological conditions. These findings are in agreement with that reported in the human heart, where NADPH oxidase is a functionally relevant source of  $H_2O_2$  involved in the agonist-induced endothelium-dependent relaxations of coronary arterioles [14], and with recent investigations showing that the predominant Nox isoform in the kidney, Nox4, can have potential beneficial effects on vasodilator function [51]. Further studies are needed to assess the specific functional role of the different Nox isoforms in renal vasodilator function.

CYP epoxygenases from the CYP 2J and CYP 2C subfamilies catalyze the oxidative metabolism of arachidonic acid to EETs in various cell types including renal epithelial and endothelial cells, and possess potent vasodilatory, proangiogenic, antiapoptotic, and postischemia protective effects in the vasculature [18]. EETs are released as transferable EDHFs that can act on VSM cells to cause hyperpolarization and relaxation or promote endothelial  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel activity secondary to the amplification of extracellular  $Ca^{2+}$  influx in endothelial cells and thus favor the EDH relaxing responses [2,52]. In the kidney, 11,12-EETs were early reported to dilate rat interlobular and afferent arterioles [19] and endothelial agonists stimulated EETs generation and induced relaxations sensitive to epoxygenases blockers [21]. Herein we show the involvement of CYP 2C enzymes in the endothelium-dependent vasodilator responses of rat renal interlobar arteries, since the specific inhibitor of CYP 2C9 sulfaphenazole greatly attenuated catalase-sensitive non-NO non-prostanoid vasodilation in response to ACh, thus confirming earlier findings in the preglomerular circulation [20]. Interestingly, pharmacological inhibition of sEH, enzyme that rapidly hydrolyzes EETs to the less biologically DHETE metabolites thus increasing EETs cellular levels and biological activity [53,54], inhibited the non-NO non-prostanoid relaxant component of ACh responses in rat renal arteries, in contrast to the expected potentiation of EETs-mediated renal relaxations upon sEH blockade. The current findings suggest a major vasoconstrictor role of endothelial CYP-derived EETs in renal interlobar arteries, and indicate the involvement of a non-EET endothelial relaxant component derived from CYP 2C enzymes.

CYP epoxygenases generate ROS as by-products of lipid metabolism during the production of EETs. CYP 2C9 is considered as an EDHF synthase and a functionally significant source of ROS in coronary arteries [55]. However, in porcine coronary arterioles and arteries from coronary artery disease patients, CYP 2C activity mainly generated vasoconstrictor  $O_2^{\bullet-}$  reaching levels that attenuate NO-mediated vaso-dilatation in vitro, as depicted by the potentiation rather than inhibition of the endothelium-dependent relaxations induced by the CYP 2C9 inhibitor sulfaphenazole and by  $O_2^{\bullet-}$  scavengers [15,56]. Interestingly,

we first demonstrate here that CYP 2C is a functionally significant source of endothelial relaxant ROS namely  $H_2O_2$  in renal interlobar arteries. First, ACh stimulated the release of both  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  that was blunted by sulfaphenazole, along with the inhibition of the ACh-induced endothelium-dependent relaxations. Moreover, NADPH-dependent generation of  $H_2O_2$  was partially inhibited by sulfaphenazole in renal interlobar arteries, consistent with the fact that CYP enzyme activity generating EETs and 20-HETE was completely dependent on the addition of exogenous NADPH in renal and mesenteric microvessels [22]. These findings, along with the relaxant effect of low concentrations of  $H_2O_2$  and the inhibitory effect of catalase on ACh relaxations suggest that endothelial CYP 2C isoenzymes are main sources of vasorelaxant  $H_2O_2$  in rat renal arteries. In support of our functional data, the immunohistochemical findings in the present study provided a straightforward evidence for an abundant and differential distribution of CYP 2C isoenzymes in the glomeruli and in interlobar and preglomerular arterioles of rat kidney. Consistent with earlier studies, CYP 2C23 was the most abundant CYP isoenzyme found in renal cortex [57], while CYP2C11 was predominant in renal interlobar arteries. In both cases, CYP epoxygenases were colocalized with eNOS in the glomerular and arterial endothelium supporting a functional role for CYP enzymes as synthases of vasorelaxant  $H_2O_2$ . The fact that ROS generating-CYP epoxygenase activity mainly renders functionally vasorelaxant  $H_2O_2$  over vasoconstrictor  $O_2^{\bullet-}$  in renal arteries in vitro is likely to be related with the high SOD activity in renal arterial tissue responsible for the enzymatic dismutation of  $O_2^{\bullet-}$  to  $H_2O_2$ . Of the SOD isoforms, Cu-ZnSOD accounts for up to 80% of total SOD activity in the mammalian kidney [58]. Levels of protein expression of cytosolic CuZnSOD were similar in renal arteries to those in the higher metabolically active renal cortex. In fact, in the early study of Morikawa et al. [5] first reporting  $H_2O_2$  as an EDHF, CuZnSOD was considered as an “EDHF synthase” since endothelial  $H_2O_2$  production and catalase-sensitive endothelium-dependent relaxations and hyperpolarizations were significantly reduced in CuZnSOD<sup>-/-</sup> mice.

## 5. Conclusions

In summary, we first demonstrate here that  $H_2O_2$  is a physiological endothelial mediator involved in EDH vasodilation of renal arteries. This is achieved through the ability of  $H_2O_2$  to activate  $K^+$  currents in renal endothelial cells, which would initiate an EDH response, and also to relax VSM through both  $Ca^{2+}$ -dependent and independent mechanisms. Sources of  $H_2O_2$  generation in the renal endothelium involve CYP epoxygenases and NADPH oxidases. Increasing experimental evidence during the last years indicates that ROS are not only involved in the oxidative stress-mediated pathogenesis of vascular disease, but they can also play a functional role in the metabolic regulation of blood flow in vascular beds of physiological relevance such as the coronary circulation. The present study first identifies  $H_2O_2$  as a functional endothelial mediator of the EDH relaxant responses in renal arteries. Further investigations are needed to clarify the role of endothelial-derived  $H_2O_2$ -mediated vasodilation in the regulation of renal blood flow and whether it is functionally coupled to kidney metabolic activity. On the other hand, recent investigations show that renal injury is associated with a decrease in  $H_2O_2$  levels in the diabetic kidney [17], which points out the need to assess the functional consequences of this  $H_2O_2$  reduction in renal hemodynamics and to revise the efforts in the search of antioxidant therapies for kidney disease associated to diabetes and other insulin resistant states.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by grants SAF 2012-31631 and SAF2016-77526 from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Spain). We are grateful to Dr. Ralph Köhler from the Translational Research Unit, University Hospital Miguel Servet and IACS/IIS, Zaragoza (Spain), for his expert advice in the electrophysiological experiments with endothelial cells. We thank Francisco Puente and Manuel Perales for their expert technical assistance.

## Appendix A. Supplementary material

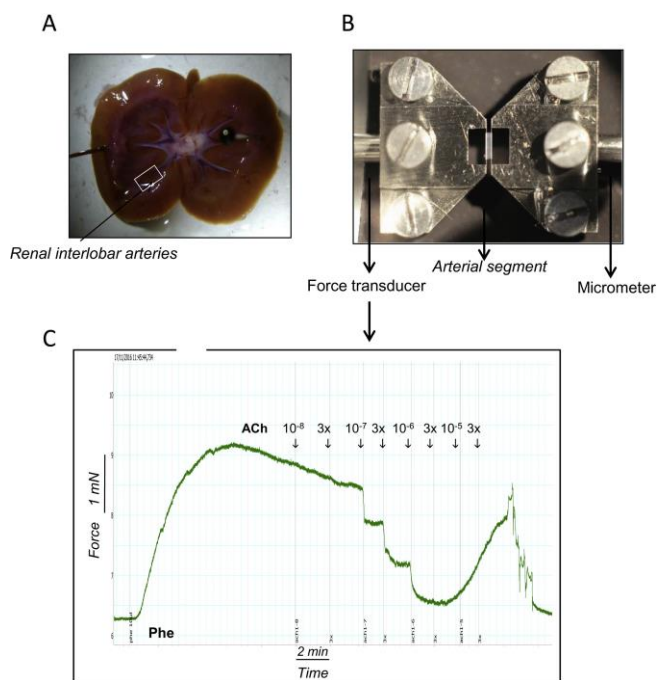
Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.031>.

## References

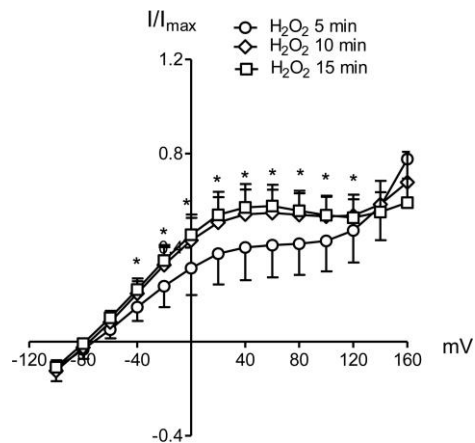
- [1] P.M. Vanhoutte, H. Shimokawa, E.H. Tang, M. Feletou, Endothelial dysfunction and vascular disease, *Acta Physiol.* 196 (2009) 193–222.
- [2] D.C. Ellinworth, S.L. Sadow, N. Shukla, Y. Liu, J.Y. Jeremy, D.D. Gutterman, Endothelium-derived hyperpolarization and coronary vasodilation: diverse and integrated roles of epoxyeicosatrienoic acids, hydrogen peroxide and gap junctions, *Microcirculation* 23 (2016) 15–32.
- [3] C.J. Garland, C.R. Hiley, K.A. Dora, EDHF: spreading the influence of the endothelium, *Br. J. Pharmacol.* 64 (2011) 839–852.
- [4] T. Matoba, H. Shimokawa, M. Nakashima, Y. Hirakawa, Y. Mukai, K. Hirano, H. Kanaide, A. Takeshita, Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 1521–1530.
- [5] K. Morikawa, H. Shimokawa, T. Matoba, H. Kubota, T. Akaike, M.A. Talukder, M. Hatanaka, T. Fujiki, H. Maeda, S. Takahashi, A. Takeshita, Pivotal role of Cu, Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1871–1879.
- [6] H. Miura, J.J. Bosnjak, G. Ning, T. Saito, M. Miura, D.D. Gutterman, Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles, *Circ. Res.* 92 (2003) 31–40.
- [7] T. Yada, H. Shimokawa, O. Hiramoto, T. Kajita, F. Shigetou, M. Goto, Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo, *Circulation* 107 (2003) 1040–1045.
- [8] H. Shimokawa, Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor, *Pflug. Arch.* 459 (2010) 915–922.
- [9] R. Barlow, R. White, Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) 1283–1289.
- [10] P.S. Wong, M.J. Garle, S.P.H. Alexander, M.D. Randall, R.E. Roberts, A role for the sodium pump in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced vasorelaxation in porcine isolated coronary arteries, *Pharmacol. Res.* 90 (2014) 25–35.
- [11] D.H. Edwards, Y. Li, T.M. Griffith, Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca<sup>2+</sup> mobilization, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 1774–1781.
- [12] A. Garry, D.H. Edwards, I.F. Fallis, R.L. Jenkins, T.M. Griffith, Ascorbic acid and tetrahydrobiopterin potentiate the EDHF phenomenon by generating hydrogen peroxide, *Cardiovasc. Res.* 84 (2009) 218–226.
- [13] Y. Liu, H. Zhao, H. Li, B. Kalyanaraman, A.C. Nicolosi, D.D. Gutterman, Mitochondrial sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries, *Circ. Res.* 93 (2003) 573–580.
- [14] B.T. Larsen, A.H. Bubolz, S.A. Mendoza, K.A. Pritchard Jr., 3D.D. Gutterman, Bradykinin-induced dilation of human coronary arterioles requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 739–745.
- [15] I. Fleming, U.R. Michaelis, D. Bredenkötter, B. Fisslthaler, F. Dehghani, R.P. Brandes, R. Busse, Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries, *Circ. Res.* 88 (2001) 44–51.
- [16] M. Sedeek, A. Gutsol, A.C. Montezano, D. Burger, Dinh Nguyen, A. Cat, C.R. Kennedy, K.D. Burns, M.E. Cooper, K. Jandeleit-Dahm, P. Page, C. Szynralewicz, F. Heitz, R.L. Hebert, R.M. Touyz, Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes, *Clin. Sci.* 124 (2013) 191–202.
- [17] K. Sharma, Obesity and diabetic kidney disease: role of oxidant stress and redox balance, *Antioxid. Redox Signal.* 25 (2016) 208–216.
- [18] J.D. Imig, Epoxyeicosatrienoic acids, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, and renal microvascular function, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 104–105 (2013) 2–7.
- [19] J.D. Imig, L.G. Navar, R.J. Roman, K.K. Reddy, J.R. Falck, Actions of epoxyeicosanoid metabolites on the preglomerular vasculature, *J. Am. Soc. Nephrol.* 7 (1996) 2364–2370.
- [20] J.D. Imig, J.R. Falck, S. Wei, J.H. Capdevila, Epoxyeicosanoid metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent arteriolar vasodilation in response to bradykinin, *J. Vasc. Res.* 38 (2001) 247–255.
- [21] S. Puntarulo, A.I. Cederbaum, Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 1324–1330.
- [22] X. Zhao, A. Dey, O.P. Romanko, D.W. Stepp, M.H. Wang, Y. Zhou, L. Jin, J.S. Pollock, R.C. Webb, J.D. Imig, Decreased epoxyeicosanoid and increased epoxide hydrolase expression in the mesenteric artery of obese Zucker rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288 (2005) 188–196.
- [23] E. Büssesmaker, R. Popp, J. Binder, R. Busse, I. Fleming, Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human inter-lobar artery, *Kidney Int.* 63 (2003) 1749–1755.
- [24] M. Muñoz, A. Sánchez, M. Pilar Martínez, S. Benedito, M.E. López-Oliva, A. García-Sacristán, M. Hernández, D. Prieto, COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats, *Free Radic. Biol. Med.* 84 (2015) 77–90.
- [25] B.D. Lamon, F.F. Zhang, N. Puri, S.V. Brodsky, M.S. Goligorsky, A. Nasjletti, Dual pathways of carbon monoxide-mediated vasoregulation: modulation by redox mechanisms, *Circ. Res.* 105 (2009) 775–783.
- [26] E. Santiago, M.P. Martínez, B. Climent, M. Muñoz, A.M. Briones, M. Salices, A. García-Sacristán, L. Rivera, D. Prieto, Augmented oxidative stress and preserved vasoconstriction induced by hydrogen peroxide in coronary arteries in obesity: role of COX-2, *Br. J. Pharmacol.* 73 (2016) 3176–3195.
- [27] E. Santiago, C. Contreras, A. García-Sacristán, A. Sánchez, L. Rivera, B. Climent, D. Prieto, Signaling pathways involved in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced vasoconstriction of rat coronary arteries, *Free Radic. Biol. Med.* 60 (2013) 136–146.
- [28] E. Santiago, B. Climent, M. Muñoz, A. García-Sacristán, L. Rivera, D. Prieto, Hydrogen peroxide activates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in coronary arteries, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 5318–5332.
- [29] E. Pinilla, A. Sánchez, M. Muñoz, A. García-Sacristán, R. Köhler, D. Prieto, L. Rivera, Role of endothelium-derived hyperpolarization in the vasodilatation of rat intrarenal arteries, *J. Physiol. Biochem.* 72 (2016) S48.
- [30] A. Oliván-Viguera, M.S. Valero, E. Pinilla, S. Amor, Á.L. García-Villalón, N. Coleman, C. Laría, V. Calvín-Tienza, Á.L. García-Otín, J.M. Fernández-Fernández, M.D. Murillo, J.A. Gálvez, M.D. Díaz-de-Villegas, R. Badorrey, U. Simonsen, L. Rivera, H. Wulff, R. Köhler, Vascular reactivity profile of novel KCa 3.1-selective positive-gating modulators in the coronary vascular bed, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119 (2016) 184–192.
- [31] B. Climent, E. Zsiros, E. Stankevicius, P. de la Villa, G. Panyi, U. Simonsen, A. García-Sacristán, L. Rivera, Intact rat superior mesenteric artery endothelium is an electrical syncytium and expresses strong inward rectifier K<sup>+</sup> conductance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410 (2011) 501–507.
- [32] S. Brakemeier, I. Eichler, A. Knorr, T. Fassheber, R. Köhler, J. Hoyer, Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species, *Kidney Int.* 64 (2003) 199–207.
- [33] T. Matoba, H. Shimokawa, K. Morikawa, H. Kubota, I. Kunihiro, L. Urakami-Harasawa, Y. Mukai, Y. Hirakawa, T. Akaike, A. Takeshita, Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1224–1230.
- [34] A.W. Cowley Jr., M. Abe, T. Mori, P.M. O'Connor, Y. Ohsaki, N.N. Zheleznova, Reactive oxygen species as important determinants of medullary flow, sodium excretion, and hypertension, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 308 (2015) F179–F197.
- [35] L. Li, E.Y. Lai, A. Wellstein, W.J. Welch, C.S. Wilcox, Differential effects of superoxide and hydrogen peroxide on myogenic signaling, membrane potential, and contractions of mouse renal afferent arterioles, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 310 (2016) F1197–F1205.
- [36] D.I. Palen, A. Ouhit, S. Belmadani, P.A. Lucchesi, K. Matrougui, Hydrogen peroxide acts as relaxing factor in human vascular smooth muscle cells independent of map-kinase and nitric oxide, *Front. Biosci.* 11 (2006) 2526–2534.
- [37] Y.J. Gao, R.M. Lee, Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery, *Br. J. Pharmacol.* 146 (2005) 1061–1068.
- [38] S. Takeshita, N. Inoue, T. Ueyama, S. Kawashima, M. Yokoyama, Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 (2000) 66–71.
- [39] F. Jiang, G.J. Dusting, Endothelium-dependent vasorelaxation independent of nitric oxide and K<sup>(+)</sup> release in isolated renal arteries of rats, *Br. J. Pharmacol.* 132 (2001) 1558–1564.
- [40] Y. Liu, A.H. Bubolz, S. Mendoza, D.X. Zhang, D.D. Gutterman, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles, *Circ. Res.* 108 (2011) 566–573.
- [41] D.X. Zhang, L. Borbouse, D. Gebremedhin, S.A. Mendoza, N.S. Zinkevich, R. Li, D.D. Gutterman, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activation, *Circ. Res.* 110 (2012) 471–480.
- [42] A.T. Chaytor, D.H. Edwards, L.M. Bakker, T.M. Griffith, Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NO-independent relaxations of rabbit arteries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 15212–15217.
- [43] J.R. Burgoyne, M. Madhani, F. Cuello, R.L. Charles, J.P. Brennan, E. Schröder, D.D. Browning, P. Eaton, Cysteine redox sensor in PKGIα enables oxidant-induced activation, *Science* 317 (2007) 1393–1397.
- [44] J.R. Burgoyne, S. Oka, N. Ale-Agha, P. Eaton, Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 1042–1052.
- [45] A.A. Wooldridge, J.A. MacDonald, F. Erdodi, C. Ma, M.A. Borman, D.J. Hartshorne, T.A. Haystead, Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of serine 695 in response to cyclic nucleotides, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 34496–34504.

- [46] Q. Hu, G. Zheng, J. Zweier, S. Deshpande, K. Irani, R. Ziegelstein, NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15749–15757.
- [47] Y. Zheng, X. Shen,  $\text{H}_2\text{O}_2$  directly activates inositol 1,4,5- trisphosphate receptors in endothelial cells, *Redox Rep.* 10 (2005) 29–36.
- [48] M. Trebak, R. Ginnan, H. Singer, D. Jourd, Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 657–674.
- [49] J. Chidgey, P.A. Fraser, P.I. Aaronson, Reactive oxygen species facilitate the EDH response in arterioles by potentiating intracellular endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  release, *Free Radic. Biol. Med.* 97 (2016) 274–284.
- [50] T. Schlüter, U. Zimmermann, C. Protzel, B. Miede, K.J. Klebingat, R. Rettig, O. Grisk, Intrarenal artery superoxide is mainly NADPH oxidase-derived and modulates endothelium-dependent dilation in elderly patients, *Cardiovasc. Res.* 85 (2010) 814–824.
- [51] R. Ray, C.E. Murdoch, M. Wang, C.X. Santos, M. Zhang, S. Alom-Ruiz, N. Anilkumar, A. Ouattara, A.C. Cave, S.J. Walker, D.J. Grieve, R.L. Charles, P. Eaton, A.C. Brewer, A.M. Shah, Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 1368–1376.
- [52] W.B. Campbell, I. Fleming, Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses, *Pflug. Arch.* 459 (2010) 881–895.
- [53] X. Fang, T.L. Kaduce, N.L. Weintraub, S. Harmon, L.M. Teesch, C. Morisseau, D.A. Thompson, B.D. Hammock, A.A. Spector, Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 14867–14874.
- [54] J.D. Imig, B.D. Hammock, Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 794–805.
- [55] B. Fisslthaler, R. Popp, L. Kiss, M. Potente, D.R. Harder, I. Fleming, R. Busse, Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries, *Nature* 401 (1999) 493–497.
- [56] Z. Zhou, V. Hemradj, V.J. de Beer, F. Gao, M. Hoekstra, D. Merkus, D.J. Duncker, Cytochrome P-450 2C9 exerts a vasoconstrictor influence on coronary resistance vessels in swine at rest and during exercise, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302 (2012) H1747–H1755.
- [57] A. Dey, R.S. Williams, D.M. Pollock, D.W. Stepp, J.W. Newman, B.D. Hammock, J.D. Imig, Altered kidney CYP2C and cyclooxygenase-2 levels are associated with obesity-related albuminuria, *Obes. Res.* 12 (2004) 1278–1289.
- [58] S.L. Marklund, Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species, *Biochem. J.* 222 (1984) 649–655.

Material suplementario



**Fig. S1.** Experimental set-up for the study of vasoactive responses in rat renal interlobar arteries in microvascular myographs. (A) Rat kidney showing the branching of the renal artery and the place wherein segments of the interlobar arteries were dissected



**Fig. S2.** Time-dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on K<sup>+</sup> currents of renal endothelial cells. Average effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM) after 5, 10 and 15 min on outwards currents of isolated renal endothelial cells. Amplitudes of K<sup>+</sup> outward currents were measured and normalized...



**3.2 COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats**

**Mercedes Muñoz**, Ana Sánchez, María Pilar Martínez, Sara Benedito, Maria-Elvira López-Oliva, Albino García-Sacristán, Medardo Hernández, Dolores Prieto





Contents lists available at ScienceDirect

## Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

## Original Contribution

## COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats



Mercedes Muñoz<sup>a</sup>, Ana Sánchez<sup>a</sup>, María Pilar Martínez<sup>b</sup>, Sara Benedito<sup>a</sup>, Maria-Elvira López-Oliva<sup>a</sup>, Albino García-Sacristán<sup>a</sup>, Medardo Hernández<sup>a</sup>, Dolores Prieto<sup>a, \*</sup>

<sup>c</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Anatomía and Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 December 2014  
Received in revised form  
9 March 2015  
Accepted 23 March 2015  
Available online 1 April 2015

## Keywords:

Obesity  
COX-2  
Renal arteries Endothelial  
dysfunction Oxidative  
stress

## ABSTRACT

Obesity is related to vascular dysfunction through inflammation and oxidative stress and it has been identified as a risk factor for chronic renal disease. In the present study, we assessed the specific relationships among reactive oxygen species (ROS), cyclooxygenase 2 (COX-2), and endothelial dysfunction in renal interlobar arteries from a genetic model of obesity/insulin resistance, the obese Zucker rats (OZR). Relaxations to acetylcholine (ACh) were significantly reduced in renal arteries from OZR compared to their counterpart, the lean Zucker rat (LZR), suggesting endothelial dysfunction. Blockade of COX with indomethacin and with the selective blocker of COX-2 restored the relaxations to ACh in obese rats. Selective blockade of the TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (TP) receptor enhanced ACh relaxations only in OZR, while inhibition of the prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) receptor (IP) enhanced basal tone and inhibited ACh vasodilator responses only in LZR. Basal production of superoxide was increased in arteries of OZR and involved NADPH and xanthine oxidase activation and NOS uncoupling. Under conditions of NOS blockade, ACh induced vasoconstriction and increased ROS generation that were augmented in arteries from OZR and blunted by COX-2 inhibition and by the ROS scavenger tempol. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) evoked both endothelium- and vascular smooth muscle (VSM)-dependent contractions, as well as ROS generation that was reduced by COX-2 inhibition. In addition, COX-2 expression was enhanced in both VSM and endothelium of renal arteries from OZR. These results suggest that increased COX-2-dependent vasoconstriction contributes to renal endothelial dysfunction through enhanced (ROS) generation in obesity. COX-2 activity is in turn upregulated by ROS.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Obesity is a worldwide health problem of increasing prevalence that is associated with the development of insulin resistance (IR), hypertension, dyslipidemia, and type 2 diabetes, jointly referred as to metabolic syndrome [1,2]. Obesity and metabolic syndrome increase the risk of diabetic complications such as nephropathy and chronic renal disease [3]. However, recent epidemiological studies suggest that chronic renal disease can develop in nondiabetic obese individuals

and that obesity represents a risk factor of renal disease independent of diabetes, hypertension, and other comorbidities [4,5].

Both cyclooxygenase (COX) 1 (COX-1) and COX-2 are constitutively expressed in the kidney and COX-derived metabolites play a key role in renal hemodynamics and tubular function [6,7]. COX-2 is highly regulated in response to alterations in intravascular volume and COX-2 metabolites are involved in the regulation of renin release and sodium excretion, and also in the maintenance of renal blood flow [8,6]. However, altered COX-2 activity has been associated with enhanced renal vasoconstriction, endothelial and vascular dysfunction, and renal injury in cardiovascular and metabolic disorders such as hypertension and diabetes [9–11].

COX-2 has been involved in the renal inflammatory response in obesity. COX-2 expression is increased in renal microvessels, kidney cortex, and glomeruli and associated with renal injury and augmented urinary excretion of vasoconstrictor prostanoids such as prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) in the obese Zucker rat (OZR), a genetic model of obesity [12–14]. Treatment with COX-2 inhibitors decreased renal expression

Abbreviations: ACh, acetylcholine; COX, cyclooxygenase; ET-1, endothelin-1; HFD, high fat diet; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; IP, prostacyclin receptor; IR, insulin resistance; KPSS, high potassium solution; LZR, lean Zucker rat; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; OZR, obese Zucker rat; prostacyclin, prostaglandin F<sub>2α</sub>; PSS, physiological saline solution; Phe, phenylephrine; ROS, reactive oxygen species; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>; TP, TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> receptor; VSM, vascular smooth muscle

\* Corresponding author. Fax: +34 913942267.  
E-mail address: [dprieto@ucm.es](mailto:dprieto@ucm.es) (D. Prieto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.024> 0891-5849/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

of proinflammatory cytokines, reduced albuminuria, and ameliorated glomerulosclerosis in the obese kidney [12], and these agents also reduced expression of renal injury mediators in experimental models of diabetes and hypertension [15]. However, the specific contribution of COX-2 to renal endothelial dysfunction in obesity has not yet fully been addressed.

It is well established that oxidative stress is the common link for the major pathogenic pathways involved in the development of the micro- and macrovascular complications in diabetes including diabetic nephropathy [16]. Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide favor the expression of an inflammatory phenotype that leads to the induction of COX-2 [17]. In the kidney, mitochondria-derived ROS production induced by hyperglycemia results in activation of NF- $\kappa$ B activity, COX-2 mRNA induction, and COX-2 protein expression in mesangial cells [18]. Moreover, treatment with the ROS scavenger tempol reduced renal COX-2 expression in experimental models of type 1 diabetes [19] and reno-vascular hypertension [11]. In this context, relationships between COX-2 and ROS have further been assessed in renal arteries [11,17] and in arteries from other vascular beds [20–22], where COX-2 has been demonstrated to be an important source of superoxide under conditions of vascular disease in diabetes [20] and hypertension [11,17,21,22].

Levels of oxidative stress in the renal cortex of the obese Zucker rat have been reported to be high, worsened by high fat diet (HFD), and associated with renal injury and to enhanced expression of inflammatory markers and NF- $\kappa$ B activity [23]. Oxidative stress is a key pathogenic factor in the development of endothelial dysfunction and vascular disease in obesity [24,25]. Although impaired endothelial function has been reported in renal afferent arterioles from genetic [26] and HFD-induced [9,27] models of obesity, the specific relationships among renal oxidative stress, COX-2, and endothelial dysfunction have yet to be determined. Therefore, we performed functional experiments in intrarenal arteries from OZR and assessed endothelial function, ROS production, and COX-2 expression and activity in order to determine whether COX-2 and ROS may play a role in renal vascular dysfunction in obesity.

## Methods

### Animal model

All animal care and experimental protocols conformed to the European Union Guidelines for the Care and the Use of Laboratory Animals (European Union Directive 2010/63/EU) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Madrid Complutense University. Male OZR (fa/fa, n=45) and their control counterparts, lean Zucker rats (LZR) (fa/–, n=40) were purchased from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain) at 8–10 weeks of age. Animals were housed at the Pharmacy School animal care facility and maintained on standard chow and water ad libitum, until they were used for study, at 16–18 weeks of age. Rats were killed by cervical dislocation and exsanguination, and the kidneys were quickly removed and placed in cold physiological saline solution (PSS).

### Dissection of microvessels and mounting

Renal interlobar arteries, second- or third-order branches of the renal artery from LZR and OZR rats, were carefully dissected by removing the medullary connective tissue and mounted in parallel in double microvascular myographs (Danish Myotechnology, Denmark) by inserting two 40 mm tungsten wires into the vessel lumen. After mounting the arteries were equilibrated for 30 min in PSS maintained at 37 °C of the following composition (mM): NaCl 119, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17, MgSO<sub>4</sub> 1.18, CaCl<sub>2</sub> 1.5, EDTA 0.027, and glucose 11, continuously gassed with a mixture of 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> to maintain pH

at 7.4. The relationship between passive wall tension and internal circumference was determined for each individual artery and from this, the internal circumference, L<sub>100</sub> corresponding to a transmural pressure of 100 mm Hg for a relaxed vessel in situ was calculated. The arteries were set to an internal diameter L<sub>1</sub> equal to 90%, at which tension development is maximal in these arteries.

### Experimental procedures for the functional experiments

At the beginning of each experiment, arteries were challenged twice with 120 mM K<sup>P</sup> (KPSS) in order to test vessel viability. The relaxant effects of acetylcholine (ACh) and of the NO exogenous donor (S)-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) were assessed by adding cumulative concentrations of these agents on arteries precontracted with phenylephrine (Phe) (0.1–0.5 mM). The responses to exogenous ACh were further obtained in the absence and presence of the general COX inhibitor indomethacin (Indo, 1 mM), of the selective inhibitors of COX-1 5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole (SC-560, 1 mM) and COX-2 N-[2-cyclohexyloxy-4-nitro-phenyl] methanesulfonamide (NS-398, 1 mM) and the antagonist of the TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (TP) receptor 4-(Z)-6-(2-o-chlorophenyl-4-o-hydroxy-phenyl-1,3-dioxan-cis-5-yl)hexanoic acid (ICI-192, 1 mM). The effect of the prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) receptor (IP) antagonist 4,5-dihydro-N-[4-[[4-(1-methylethoxy) phenyl]methyl]phenyl]-1H-imidazol-2-amine (CAY 10441 0.1 mM) and of the selective inhibitors of COX-1 and COX-2 was also assessed in renal arteries of LZR and OZR in the presence of ICI-192. The endothelium-dependent vasoconstrictor effect of ACh was examined on quiescent interlobar arteries, under conditions of NOS blockade in the absence and presence of NS-398 and of the super-oxide scavenger 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (tem-pol, 30 mM). Cumulative concentration response curves to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were evaluated in the presence and absence of NS-398 on intact endothelium arteries and on removed endothelium arteries precontracted with 25 mM K<sup>P</sup>. The drugs were added to the myograph chamber 30 min before a second concentration–response curve was performed, and the Phe concentration was adjusted to match the concentration during the first control curve assessment. The role of the vascular endothelium was examined in arteries where the endothelium was mechanically removed by inserting a human hair in the vessel lumen and guiding it back and forward several times. The absence of functional endothelium was confirmed by the lack of relaxation to ACh (10 mM).

### Measurement of superoxide production by chemiluminescence

Changes in basal and ACh-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, and endothelin-1 (ET-1)-stimulated levels of superoxide were detected by lucigenin-enhanced chemiluminescence in renal arteries and in renal cortex, as previously described [28,29]. A cortex sample and 6–8 segments of the renal interlobar arteries about 4–5 mm long from each LZR and each OZR were dissected and equilibrated in PSS for 30 min at room temperature and then incubated in the absence (controls) and presence of the superoxide scavenger tempol (100 mM), the NADPH oxidase inhibitor apocynin (30 mM), the xanthine oxidase inhibitor allopurinol (100 mM), the NOS synthase inhibitor L-NOARG (100 mM), the nonspecific COX inhibitor indomethacin (1 mM), and the selective inhibitors of COX-1 SC-560 (1 mM) and of COX-2 NS-398 (1 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) for 30 min at 37 °C. The arteries and the cortex samples were then transferred to microtiter plate wells containing 5 mM bis-N-methyla-cridinium nitrate (lucigenin) in the absence and presence of different ROS sources inhibitors and of ROS scavenger in air-equilibrated Krebs solution buffered with 10 mM Hepes–NaOH. Chemiluminescence was measured in a luminometer (BMG Fluostar Optima), and for calculation baseline values were subtracted from the counting values under the different experimental conditions and superoxide production was normalized to tissue weight. Since 10<sup>–4</sup> M peroxide enhanced luci-

genin signal in the absence of vascular tissue, these values were sub-tracted from the lucigenin-enhanced chemiluminescence values in renal arteries on exposure to peroxide.

### Immunohistochemistry

Tissue samples from the kidneys containing the interlobar arteries were immersion-fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB), cryoprotected in 30% sucrose in PB, and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Transverse sections 5 mm thick were obtained by means of a cryostat and preincubated in 10% normal goat serum in PB containing 0.3% Triton X-100 for 2–3 h. Then, sections were incubated with either a mouse monoclonal anti-COX-1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) diluted at 1:50 or a rabbit anti COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:50 for 48 h, washed, and allowed to react with a goat secondary serum (Chemicon International Inc.) (anti-mouse for the COX-1 and anti-rabbit for the COX-2) diluted 1:400 for 2 h at room temperature. Secondary anti-bodies used were Alexa Fluor 594 (red) and Alexa Fluor 488 (green). No immunoreactivity could be detected in sections incubated in the absence of the primary antisera. Preadsorption with COX-1 and COX-2 protein showed no cross-reactivity to the antibodies.

### Data presentation and statistical analysis

Results are expressed as either  $\text{Nm}^{-1}$  of tension or as a percentage of the responses to either Phe or KPSS in each artery, as means  $\pm$  SEM of 5–30 arteries (1–2 from each animal) for the functional experiments and results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue in arterial segments and in each cortex sample, as means  $\pm$  SEM of 4–22 animals for the measurement of superoxide production. The statistical differences between means were analyzed by using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons involving more than two groups or by paired or unpaired Student's t test for comparison between two groups. Probability levels lower than 5% were considered significant. All calculations were made using a standard software package (Prism 4.0, GraphPad, San Diego, CA).

## Results

### General parameters

At the time of the experiment (16–18 weeks of age), OZR were significantly heavier than LZR (51176 g vs 38674 g,  $P < 0.001$ ,  $n = 45$  and 40, respectively). We have reported that animals from the OZR group exhibit mild hyperglycemia, hyperinsulinemia, and dyslipidemia with elevated total cholesterol and triglycerides levels but were not hypertensive [30]. The normalized internal lumen diameters,  $I_1$ , of renal arteries in the OZR group (25175 mm,  $n = 69$ ) were not significantly different from those in the LZR group (25575 mm,  $n = 64$ ), thus supporting that structure is preserved in arteries from OZR compared to LZR.

### Endothelium-dependent relaxations in interlobar arteries of LZR and OZR

Vasoconstrictor responses elicited by either KPSS or preconstrictor doses of Phe were not significantly different in renal arteries from LZR and OZR (Table 1). Endothelial function was assessed by the vasodilator responses to ACh. ACh induced dose-dependent relaxations followed by contractions at the higher concentrations in arteries precontracted with Phe. ACh relaxant responses were impaired in renal

**Table 1**  
Vasomotor responses of renal arteries from LZR and OZR. n = 4.

	KPSS	Phe ( $\text{Nm}^{-1}$ )	Phe (%)	ACh (%)	$I_1$ (mm)	n
LZR	1.65 $\pm$ 0.20	1.53 $\pm$ 0.17	95 $\pm$ 7	70 $\pm$ 5	242 $\pm$ 2	15
OZR	1.58 $\pm$ 0.27	1.46 $\pm$ 0.18	98 $\pm$ 7	50 $\pm$ 6 <sup>***</sup>	234 $\pm$ 17	15

Values represent mean  $\pm$  SEM of the number n of individual arteries, 1–2 per animal. Results are expressed as absolute values ( $\text{Nm}^{-1}$  of tension) or as a percentage of the contraction induced by KPSS (Phe) or Phe (ACh). Significant differences were analyzed by unpaired Student t test,

<sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$ , versus LZR.  $I_1$ , normalized lumen diameter in mm.

interlobar arteries from OZR compared to LZR (Fig. 1A and B, Table 1). Exogenously administered NO by the NO donor SNAP induced relaxations that were modestly reduced in arteries from OZR (Fig. 1C). These results suggest that renal endothelial dysfunction in part is due to blunted vasodilator responses to NO in obese rats.

### ROS levels in renal interlobar arteries and cortex of LZR and OZR and effect of inhibition of NADPH oxidase, xanthine oxidase, and NOS

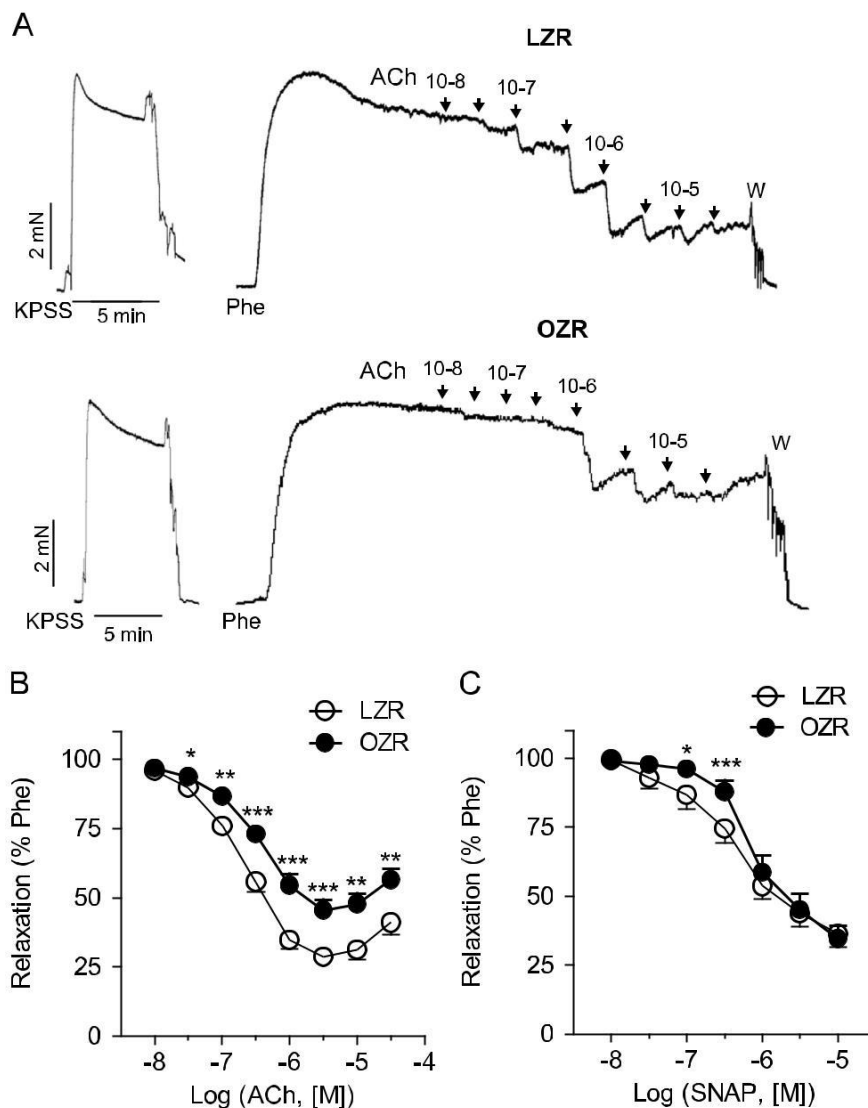
Basal superoxide production was enhanced in both renal arteries and cortex from OZR compared to LZR, blunted by tempol and stimulated by ET-1, suggesting higher levels of oxidative stress in the kidney of obese animals (Fig. 2A–D). Augmented superoxide levels in renal interlobar arteries from OZR were reduced by inhibition of NADPH oxidase with apocynin, xanthine oxidase with allopurinol, and NOS with L-NOARG (Fig. 2D), indicating that NADPH oxidase, xanthine oxidase, and NOS are involved in renal vascular oxidative stress in obese rats.

### Involvement of COX-1 and COX-2 in the endothelium-dependent responses of renal interlobar arteries of LZR and OZR

Expression of COX-1 and COX-2 proteins was determined by immunohistochemistry in the endothelium and vascular smooth muscle (VSM) layer of renal interlobar arteries from LZR and OZR. Immunostaining of arterial sections with a COX-1 antibody revealed that this constitutive isoform was uniformly distributed colocalized with eNOS in the endothelial lining, being absent in the VSM layer (Fig. 3A). No apparent differences in either distribution or density of the COX-1 immunolabeling were observed between LZR and OZR (Fig. 3A). Immunostaining for COX-2 was found in the endothelium of renal arteries from LZR (Fig. 3B), and in both endothelium and VSM of arteries from OZR (Fig. 3B).

In order to assess whether changes in the COXs metabolism may be involved in the endothelial dysfunction observed in renal arteries of OZR, the effect of the nonselective COX inhibitor, indomethacin, and of the selective COX-1 and COX-2 blockers, SC-560 and NS-398 were examined for the relaxant responses to ACh. Indomethacin, SC-560, and NS-398 modestly enhanced the relaxations to the higher ACh concentrations in renal arteries of LZR (Fig. 4A, C, E and Table 2), suggesting a predominant vasoconstrictor COX-mediated component in the responses to ACh. Treatment with indomethacin and NS-398 greatly increased relaxations and restored endothelial responses to ACh in arteries from OZR (Fig. 4B, D, F and Table 2). Combined blockade of COX and NOS further reduced the relaxant responses to ACh in both LZR and OZR (results not shown).

To further evaluate the mechanisms underlying renal endothelial dysfunction, the effects of the selective inhibitor of COX-2 NS-398 on the responses to ACh were assessed in quiescent arteries under conditions of NOS blockade. ACh induced contractions that were markedly enhanced in renal arteries from OZR compared to LZR (Fig. 5A). The vasoconstrictor effect of ACh was significantly



**Fig. 1.** Relaxant responses to ACh and SNAP are impaired in renal interlobular arteries of obese Zucker rats. (A) Representative traces showing the relaxations induced by ACh in renal arteries from LZR ( $n=231$ , upper) and OZR ( $n=220$ , lower). (B, C) Average relaxations to ACh (B) and to the NO donor SNAP (C) in renal interlobular arteries from OZR compared to LZR. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 9–30 arteries. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , versus LZR, Student's *t* test for unpaired observations.

reduced by NS-398 in renal arteries from OZR (Fig. 5C), suggesting that increased renal endothelial contractile responses in OZR are mediated by COX-2.

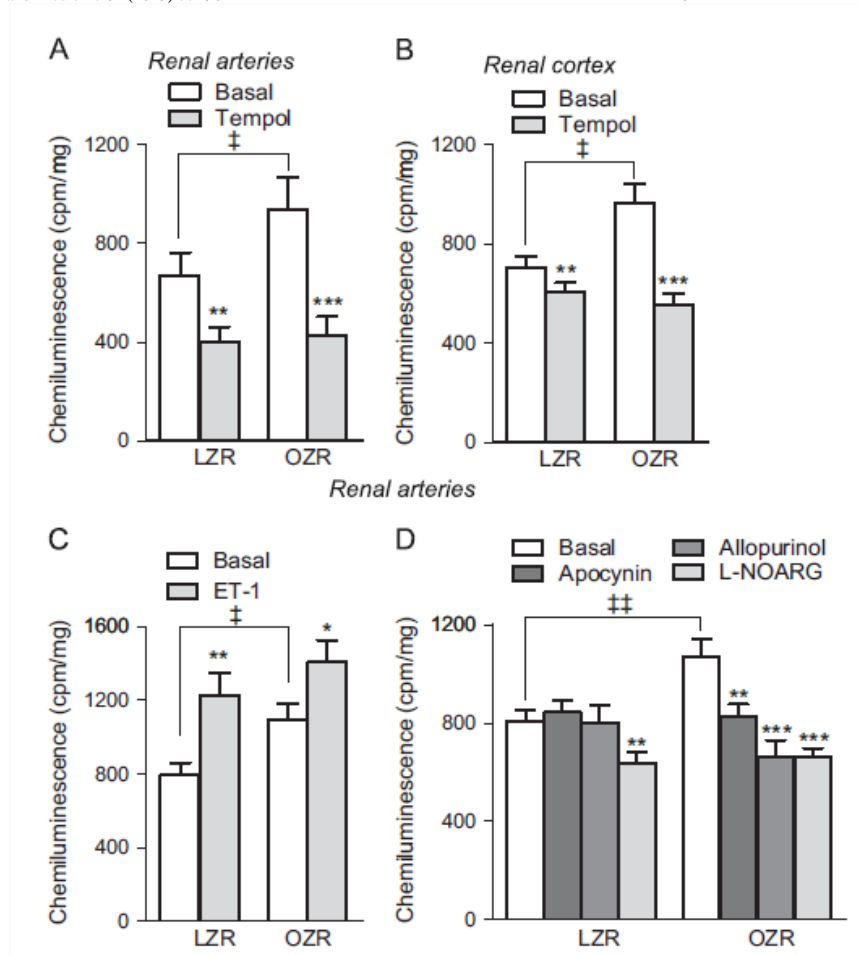
Effect of TP and IP receptor antagonism on the relaxant responses to ACh

Fig. 6 shows the effect of the  $TXA_2/PGH_2$  (TP) receptor antagonist ICI-192 on the relaxant responses to ACh in renal interlobular arteries. Treatment with ICI-192 significantly enhanced the concentration-dependent relaxations elicited by ACh in arteries from OZR without altering those from LZR (Fig. 6A, B and Table 3). On the other hand, selective blockade of IP receptors with CAY 10441 markedly increased basal tone in quiescent renal arteries from LZR, this vasoconstriction being blunted in arteries from OZR (Fig. 7A). While CAY 10441 modestly inhibited ACh relaxant responses only in arteries from LZR (Table 3), under conditions of TP receptor blockade with ICI-192, the IP receptor antagonist significantly reduced the relaxations induced by ACh in LZR but not in OZR (Fig. 7B, C and Table 3).

In the presence of ICI-192, a modest inhibitory effect of both the COX-1 inhibitor SC-560 and the COX-2 inhibitor NS-398 on the vasodilator responses to ACh was unmasked in interlobular arteries from LZR, while only a small inhibition by NS-398 persisted in arteries from OZR (Fig. 7D–F, and G).

Effects of COX inhibition on basal and ACh-stimulated ROS

Treatment with indomethacin, SC-560, and NS-398 inhibited basal superoxide production in arteries from OZR. This inhibition was more pronounced after nonselective blockade of COX with indomethacin, which supports an augmented COX-dependent basal superoxide production in renal arteries of obese rats (Fig. 8A). In order to determine whether ACh stimulates ROS generation, these experiments were performed under conditions of NOS blockade with L-NOARG. ACh increased superoxide production in interlobular arteries from LZR and OZR that was augmented in OZR and blunted by both NS-398 and SC-560 treatment (Fig. 8B).



**Fig. 2.** Basal superoxide production is augmented in renal arteries and cortex from OZR and involves NADPH, xanthine oxidase activation, and NOS uncoupling. Basal (A, B, and D) and ET-1-stimulated (C) levels of superoxide production measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence in renal arteries (A, C, and D) and renal cortex (B) of LZR and OZR and effects the ROS scavenger tempol (100 mM), the NADPH oxidase inhibitor apocynin (30 mM), the xanthine oxidase inhibitor allopurinol (100 mM), and the NOS synthase inhibitor L-NOARG (100 mM) on basal superoxide production of isolated renal interlobar arteries from LZR and OZR. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean  $\pm$  SEM of 7–22 animals. Statistically significant differences were calculated by unpaired Student's t test \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , versus control before treatment; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , versus LZR.

**Involvement of COX-2 and ROS in ACh contractile effects in renal arteries from obese rats**

The vasoconstrictor effect of ACh under conditions of NOS blockade was significantly inhibited by the ROS scavenger tempol and by NS-398 in renal arteries from OZR (Fig. 9B), while no significant inhibition with these agents was observed on the modest contractions elicited by ACh in arteries from LZR (Fig. 9A), indicating that COX-2-dependent ACh-induced vasoconstriction is increased in arteries from OZR in part due to ROS generation.

**Effect of COX-2 inhibition on contraction and ROS generation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in renal interlobar arteries**

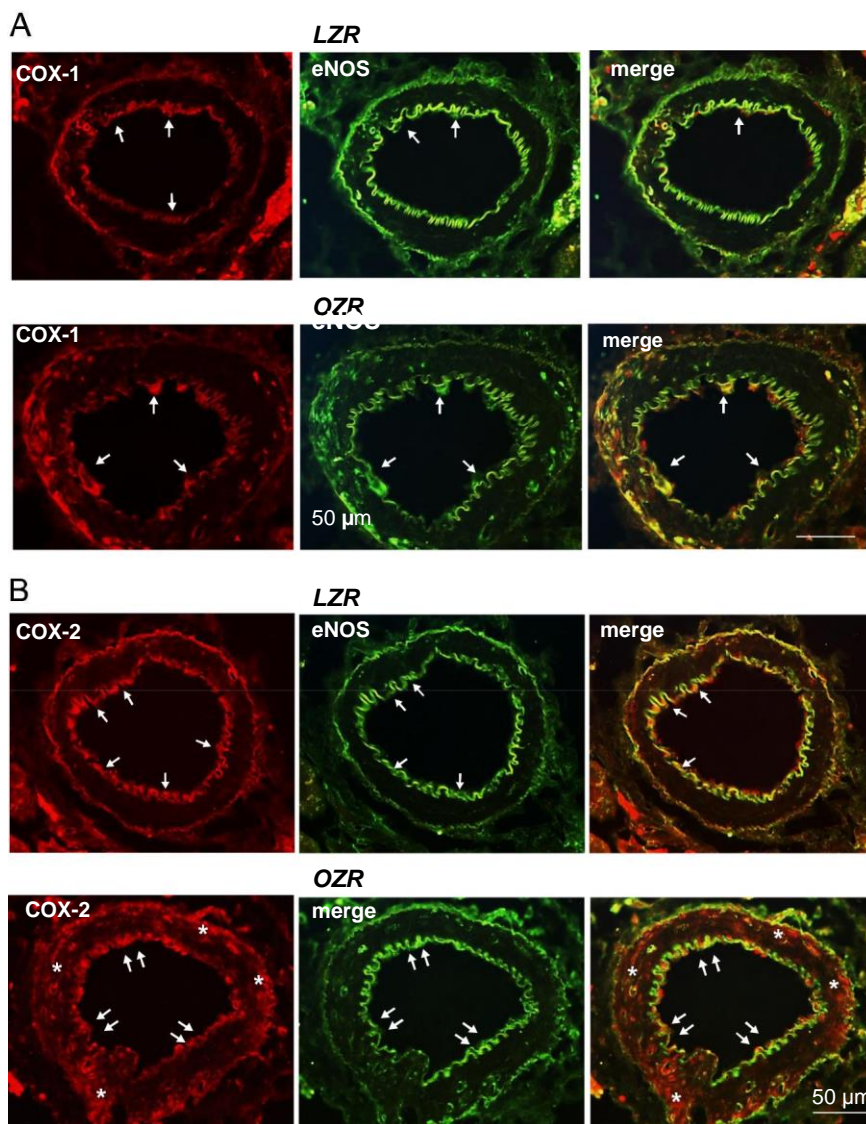
To further assess the involvement of COX-2 in oxidative stress and augmented renal vasoconstriction, we determined the effect of the COX-2 inhibitor NS-398 on the contraction and ROS generation in interlobar arteries exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced concentration-dependent contractions at concentrations higher than 0.1 mM in interlobar arteries from LZR and OZR precontracted with 25 mM K<sup>+</sup> (Fig. 10A and B). The contractile effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was inhibited by NS-398 in both LZR (Fig. 10A) and OZR (Fig. 10B). In endothelium-

denuded renal interlobar arteries, the contractions induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> persisted to a greater extent in OZR and were inhibited by NS-398 (Figs. 10C and D). On the other hand, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> greatly increased super-oxide production in renal arteries (Fig. 10E) and cortex (Fig. 10F) from both strains. ROS stimulation by peroxide was significantly augmented in OZR and reduced by NS-398 treatment in both LZR and OZR (Fig. 10E and F). These results suggest a COX-2-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced superoxide production and vasoconstriction in renal arteries.

**Discussion**

Obesity and metabolic syndrome have been identified as strong predictors of chronic kidney disease independent of associated comorbidities such as hypertension or diabetes. The present study was designed to assess the role of COX-2 and ROS in renal vascular dysfunction in obesity. Our findings demonstrate that endothelial dysfunction of interlobar arteries is attributable to augmented COX- and ROS-mediated endothelium-dependent vasoconstriction in a model of genetic obesity. COX-2 inhibition reduced basal and stimulated ROS production and restored endothelial vasodilator responses.

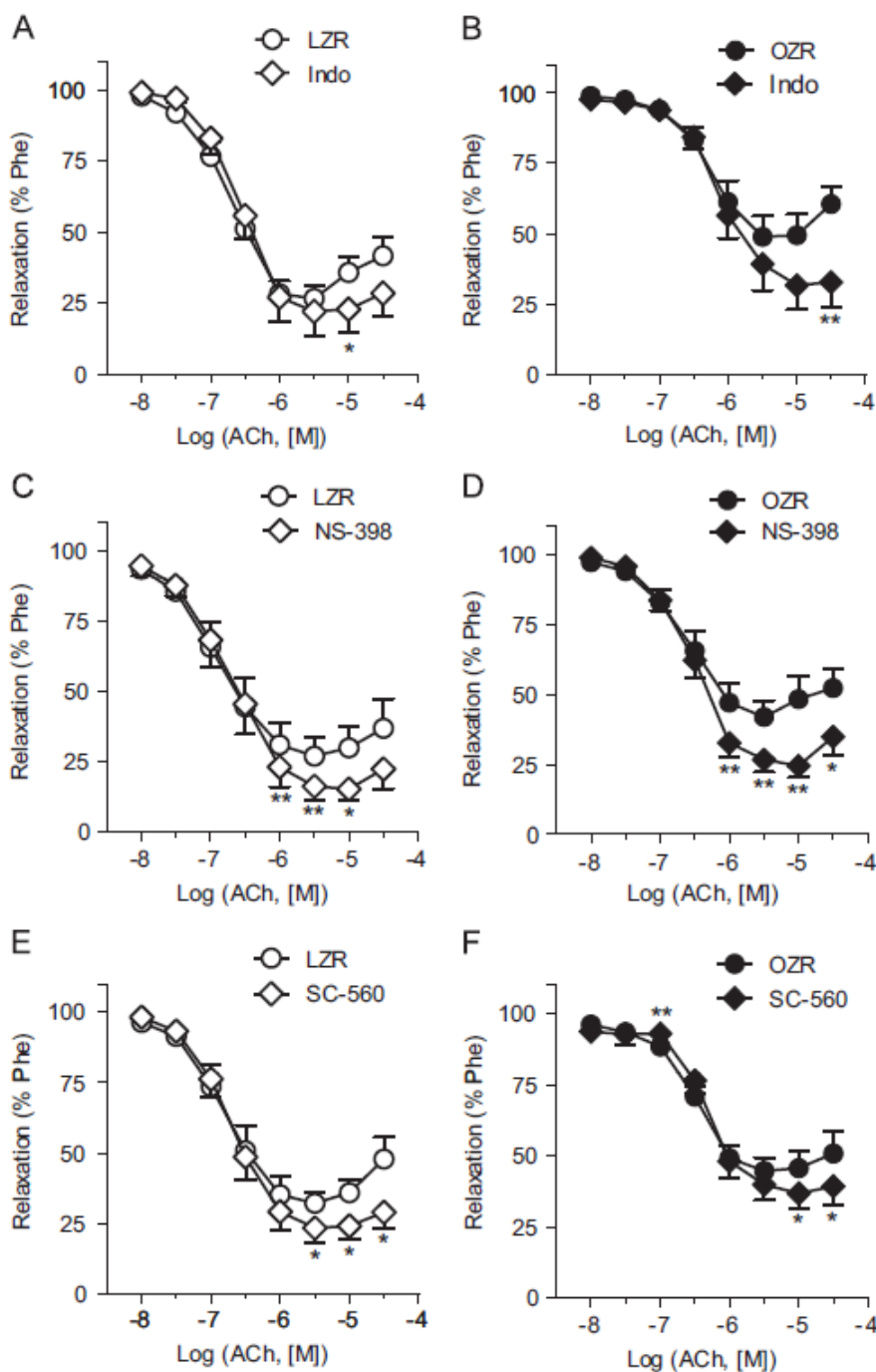
Endothelium-dependent relaxations to ACh were reduced in renal interlobar arteries of OZR compared to LZR, which indicates



**Fig. 3.** Expression of COX-1 and COX-2 in renal interlobar arteries from LZR and OZR. Immunohistochemical demonstration of (A) COX-1 and (B) COX-2 in renal arteries from LZR and OZR. (A) Immunofluorescence for COX-1 protein (red areas) was distributed throughout the endothelial lining (arrows) and absent in the VSM layer of renal arteries from both LZR and OZR (left panel). Endothelial cell layer was visualized with the anti-eNOS marker (green) (middle panel). Immunofluorescence double labeling for eNOS marker and COX-1 expression in endothelial cell layer demonstrates colocalization in endothelium (yellow areas) in LZR and OZR (right panel). (B) COX-2 was expressed in the endothelium of renal arteries in LZR (red areas, arrows) and in both endothelium (red areas, arrows) and VSM (red areas, asterisks) of renal arteries from OZR (left panel). Endothelial cell layer was visualized with the anti-eNOS marker (green) (middle panel) and immunofluorescence double labeling for eNOS marker and COX-2 protein expression in endothelial cell layer demonstrates colocalization in endothelium (yellow areas, arrows) in LZR and OZR (right panel). Scale bars indicate 50  $\mu\text{m}$ . Sections are representative of  $n = 3$  LZR animals and OZR animals.

endothelial dysfunction and supports earlier findings in the renal microcirculation of both genetically—OZR—[26] and diet-induced [9] obese rats, where vasodilator responses to ACh were blunted in renal afferent arterioles. These observations suggest that impaired endothelial function of the preglomerular interlobar arteries, as shown in the present study, may reflect vascular dysfunction of the glomerular microcirculation [9,26]. It is now well established that vascular oxidative stress is a major cause of NO inactivation and endothelial dysfunction in the insulin-resistant states of obesity and diabetes. Oxidative stress has been reported to underlie renal injury in genetic and diet-induced models of obesity [12,23] where treatment with free radical scavengers decreased inflammation and ameliorated functional (increased urinary albumin excretion) and structural renal alterations [23]. The present study demonstrates that blunted vasodilator responses to ACh in renal interlobar arteries, in part due to impaired NO-mediated relaxations, were associated with augmented vascular ROS production in parallel with the higher levels of oxidative stress in

the renal cortex of obese rats. Both NADPH oxidase and xanthine oxidase were found to be sources of the augmented superoxide generation in renal arteries of OZR, as depicted by the inhibitory effect of apocynin and allopurinol on basal ROS generation. Enhanced endothelial NADPH [24,25,32,33] and xanthine oxidase [31] activities have earlier been involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in arteries from obese animals and in endothelial cells from obese individuals. Interestingly, we further demonstrate here that uncoupled eNOS, probably as a result of high levels of peroxynitrite formed by initial oxidative stress, is also involved in the augmented ROS generation of renal interlobar arteries from OZR, since blockade of NOS greatly reduced renal oxidative stress in obese rats. These findings support data from a recent study showing that glomerular eNOS dimerization, indicative of eNOS uncoupling, is impaired in db/db mice, a model of type 2 diabetes, and supplementation with the NOS cofactor BH4 corrected eNOS dimerization and improved glomerular structural and functional abnormalities [34].



**Fig. 4.** Effect of COX inhibitors on the relaxant responses to ACh in renal interlobar arteries of LZR and OZR. Effects of (A, B) nonselective COX inhibitor indomethacin (Indo, 1 mM), (C, D) the COX-1 inhibitor SC-560 (1 mM), and (E, F) the COX-2 inhibitor NS-398 (1 mM) on the average relaxant responses to ACh in renal arteries from LZR (A, C, and E) and OZR (B, D, and F). Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 6–12 arteries. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , versus control before treatment, Student's *t* test for paired observations.

Interactions between ROS and COX activity in vascular dysfunction are now well established and oxidative stress has been reported to increase expression and activity of both COX-1 and COX-2 in arteries from ageing, diabetic, and hypertensive rats [11,17,20,21,35]. Enhanced expression of COX-2 and other inflammatory markers along with that of the redox-sensitive nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B were found in the renal cortex of diet-induced obese rats associated with end-othelial dysfunction of glomerular arterioles [9]. In the current study, vascular expression of COX-2 was augmented in renal interlo-bar arteries and increased COX-2-mediated vasoconstriction blunted endothelial vasodilator responses to ACh in obese rats. However, both COX-1 and COX-2 are constitutively expressed in the kidney and metabolites of both isoenzymes are also involved in the physiological

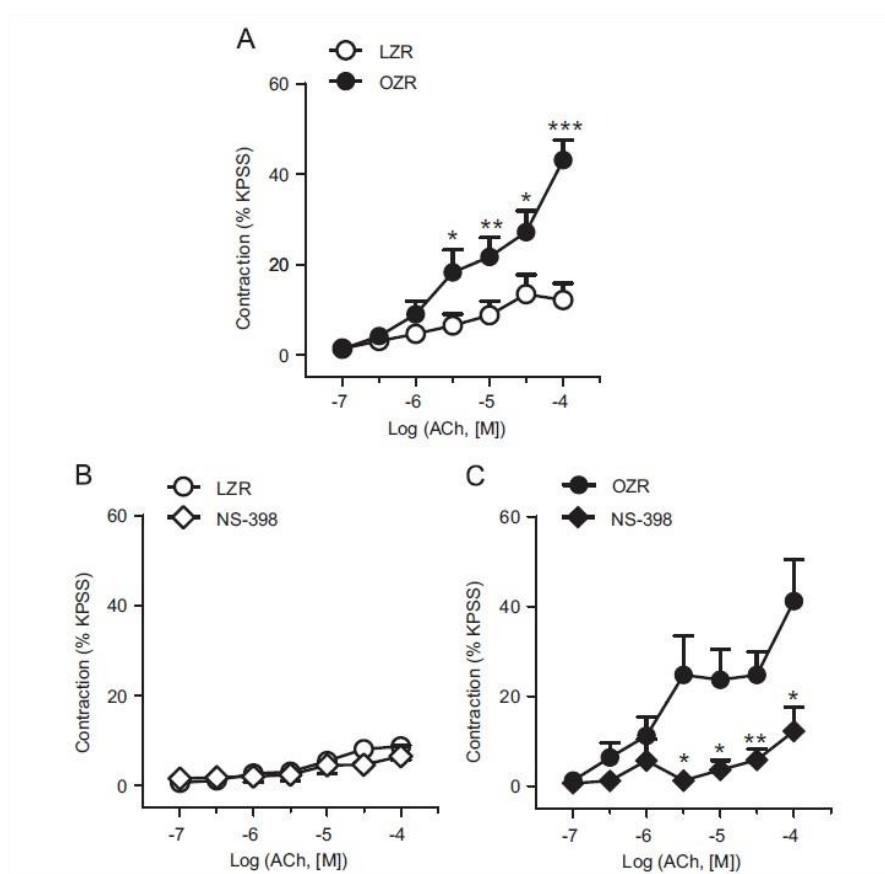
regulation of renal blood flow [6–8]. In the present study, COX-1 and COX-2 were localized in the endothelium of interlobar arteries and inhibition of these isoenzymes modestly enhanced ACh-induced relaxations in LZR, suggesting that both COX-1 and COX-2-derived vasoconstrictor prostanoids modulate renal endothelial vasodilator responses in healthy arteries. Interestingly, while moderate expression of COX-1 in renal arteries was hardly changed in obese rats, in line with earlier findings in the renal cortex of OZR [12] and in experimental models of type 1 and 2 diabetes [6,15,36], enhanced expres-sion of COX-2 in both endothelium and VSM was associated with endothelial dysfunction in interlobar arteries from OZR. Indomethacin and selective COX-2 inhibition restored endothelium-dependent rela-xations, suggesting that COX-2-derived vasoconstrictor metabolites

**Table 2**  
Effect of the nonselective COX inhibitor indomethacin (Indo), the COX-1 inhibitor SC-560, and the COX-2 inhibitor NS-398 on the vasodilator responses to acetylcholine (ACh) of renal arteries from LZR and OZR.

	ACh							
	LZR				OZR			
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	n	I <sub>1</sub>	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	n	I <sub>1</sub>
Control	6.73 ± 0.08	64 ± 5	9	278 ± 24	6.25 ± 0.10 <sup>+++</sup>	40 ± 6 <sup>++</sup>	12	245 ± 15
+Indo	6.58 ± 0.08	77 ± 8	7	253 ± 22	6.08 ± 0.07	67 ± 9	10	237 ± 17
Control	6.84 ± 0.14	70 ± 8	6	201 ± 11	6.58 ± 0.14	52 ± 8	8	205 ± 8
+NS-398	6.70 ± 0.17	85 ± 4	6	201 ± 11	6.51 ± 0.11	75 ± 4	8	205 ± 8
Control	6.74 ± 0.17	52 ± 8	6	291 ± 31	6.48 ± 0.09	49 ± 8	8	260 ± 16
+SC-560	6.74 ± 0.12	71 ± 6	6	291 ± 31	6.31 ± 0.09	61 ± 7	8	260 ± 16

Values represent mean ± SEM of the number n of individual arteries, 1–2 per animal. pEC<sub>50</sub> is -logEC<sub>50</sub>, which is the agonist concentration giving half-maximal relaxation; E<sub>max</sub> = maximal relaxation (% Phe). Significant differences were analyzed by unpaired and paired Student t test.

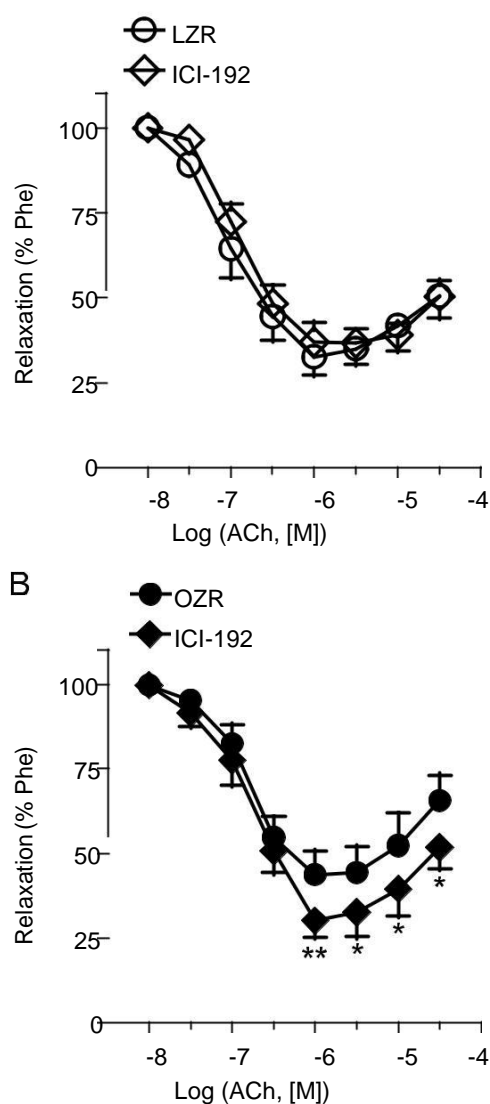
\* P < 0.05, versus control before treatment  
 \*\* P < 0.01, versus control before treatment;  
 ++ P < 0.01, versus LZR.  
 +++ P < 0.001, versus LZR.



**Fig. 5.** Constrictor responses to ACh under conditions of NOS blockade were enhanced in isolated renal arteries from OZR and mediated by COX-2. (A) Contractions to ACh under conditions of NOS blockade in renal interlobar arteries from OZR compared to LZR. (B and C). Effects of the selective COX-2 inhibitor NS-398 on the contractions elicited by ACh under conditions of NOS blockade in renal arteries from LZR (B) and OZR (C). Results are expressed as percentage of the maximum contraction induced by potassium solution (KPSS) in each artery. Data are shown as the mean ± SEM of 6–15 arteries. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, versus control before treatment (B and C) or LZR (A), Student's t test for unpaired (A) or paired (B and C) observations.

contribute to renal endothelial dysfunction in obese rats. Inc-reased COX-2-mediated renal vasoconstriction was further confirmed in quiescent interlobar arteries in which NOS blockade unmasked contractions to ACh hardly detectable in lean animals that were abolished by the COX-2 inhibitor NS-398. The present findings are in

line with the augmented COX-2-mediated renal vasoconstrictor responses to arachidonic acid [10] and with the increased glomerular filtration rate [36] coupled to enhanced COX-2 expression in the renal cortex of the perfused kidney from type 1 diabetic rats. In these reports, COX-2 inhibitors improved renal blood flow and attenuated



**Fig. 6.** Effect of the antagonist of the TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (TP) receptor on the relaxations elicited by ACh in renal interlobar arteries from LZR and OZR. Average effects of ICI-192 (1 mM) on the relaxant responses to ACh in isolated interlobar arteries of LZR (A) and OZR (B). Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean ± SEM of 6–7 arteries. \*P<0.05, \*\*P<0.01, versus control before treatment, Student's t test for paired observations.

**Table 3**

Effect of the TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (TP) receptor antagonist (ICI-192) and of the IP receptor antagonist (Cay10441) on the concentration–relaxation curves to acetylcholine (ACh) in renal arteries from LZR and OZR.

	ACh							
	LZR				OZR			
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	n	I <sub>1</sub>	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	n	I <sub>1</sub>
Control	7.08 ± 0.12	65 ± 5	6	284 ± 19	6.77 ± 0.18	56 ± 8	7	254 ± 21
+ICI-192	6.90 ± 0.08	63 ± 4	6	284 ± 19	6.85 ± 0.17	67 ± 7	7	254 ± 21
Control	6.82 ± 0.14	67 ± 2	6	272 ± 17	6.90 ± 0.07	64 ± 5	9	243 ± 21
+Cay10441	6.66 ± 0.14	69 ± 4	6	272 ± 17	6.92 ± 0.16	65 ± 4	9	243 ± 21
+ICI 192								
Control	7.08 ± 0.12	65 ± 5	6	284 ± 19	6.77 ± 0.18	56 ± 8	7	254 ± 21
+Cay10441	6.79 ± 0.12	58 ± 4	6	284 ± 19	6.58 ± 0.12	68 ± 6	6	252 ± 25

Values represent mean ± SEM of the number n of individual arteries, 1–2 per animal. pEC<sub>50</sub> is –logEC<sub>50</sub>, which is the agonist concentration giving half-maximal relaxation; E<sub>max</sub> ¼ maximal relaxation (% Phe). Significant differences from controls were analyzed by unpaired and paired Student t test.

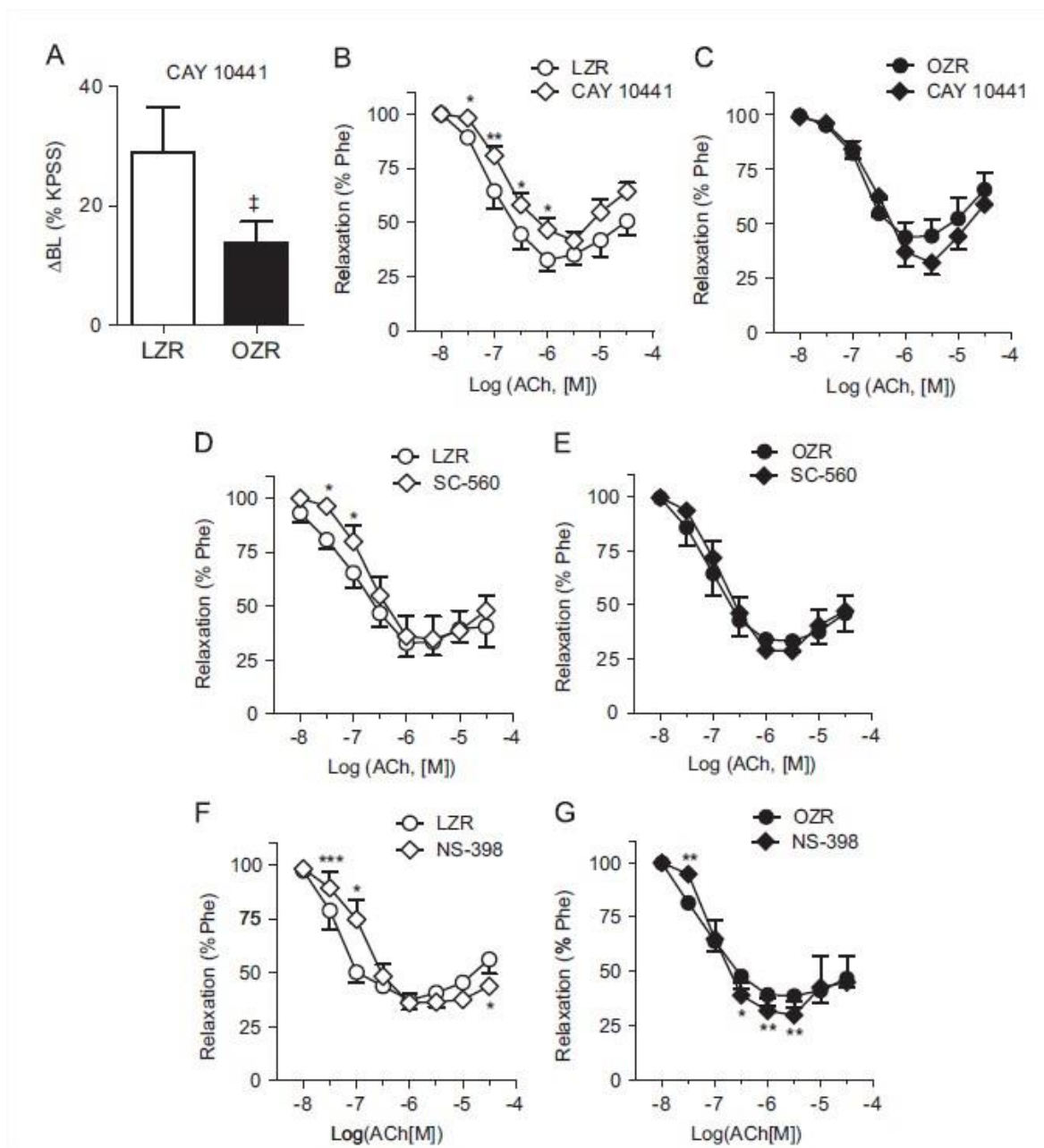
\* P < 0.05, versus control before treatment.  
 \*\* P < 0.01, versus control before treatment.

hyperfiltration, reduced proteinuria and inflammation, and ameliorated renal structural alterations [36,37], as also observed in OZR treated with rofecoxib [12].

In the current study, TP receptor blockade improved ACh relaxant responses in renal arteries from OZR but not LZR, indicating a role for TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> receptors in the greater COX-2-mediated endothelial vasoconstriction of OZR. These findings would be consistent with the increased renal TXA<sub>2</sub> production associated with enhanced COX-2 expression observed in obese and type 2 diabetic rats [12–14,38]. However, the contribution of contractile prostanoids other than TXA<sub>2</sub> should be taken into account since treatment with the COX-2 inhibitor rofecoxib mostly reduced urinary excretion of PGF<sub>2α</sub> and PGI<sub>2</sub> meta-bolites in the OZR, suggesting that COX-2 primarily contributes to PGF<sub>2α</sub> and PGI<sub>2</sub> levels in the kidney of obese rats [12].

Moreover, COX-2-derived PGF<sub>2α</sub> has recently been involved in the endothelial dysfunction of renal arteries from reno-vascular hypertensive rats [11].

PGI<sub>2</sub> plays a key role in the maintenance of renal blood flow and deletion of PGIS is associated with ischemic kidney damage [39]. The present findings demonstrate that basally released relaxant PGI<sub>2</sub> is involved in the maintenance of renal arterial tone, as depicted by the vasoconstriction induced by selective blockade of IP receptors with CAY 10441 in quiescent renal interlobar arteries from LZR. This contraction was impaired in arteries from obese rats, which indicates that the modulatory relaxant influence of PGI<sub>2</sub> on renal vascular tone is blunted. On the other hand, besides acting on VSM IP receptors to induce vasodilatation and protect arterial wall, PGI<sub>2</sub> can also activate VSM TP receptors under conditions of vascular dysfunction due to excessive PGI<sub>2</sub> production and/or defective IP receptors [40,41]. However, IP and TP VSM receptors can concomitantly modulate PGI<sub>2</sub> vascular responses also in healthy arteries with limited functional IP receptors. In porcine interlobular arteries, COX-1-mediated endothelial PGI<sub>2</sub> synthesis is responsible for the endothelium-dependent vasoconstrictor activity evoked by agonists [42,43]. In agreement with the latter, blockade of TP receptors unmasked an IP-mediated component of the ACh relaxant responses in renal arteries from LZR but not OZR, suggesting that PGI<sub>2</sub> may act as both vasoconstrictor and vasodilator through TP and IP receptors, respectively, in healthy rat interlobar arteries. In arteries from obese animals, the IP-mediated relaxant component was blunted and IP receptor antagonism did not further alter endothelial relaxations to ACh under conditions of TP receptor blockade. Therefore, our findings suggest that enhanced PGI<sub>2</sub> levels derived from COX-2 reported in the kidney of OZR [12] might also contribute to the greater COX-2-mediated renal vasoconstriction through TP receptors and hence to the endothelial dysfunction in obese rats. Moreover, we provide evidence here that

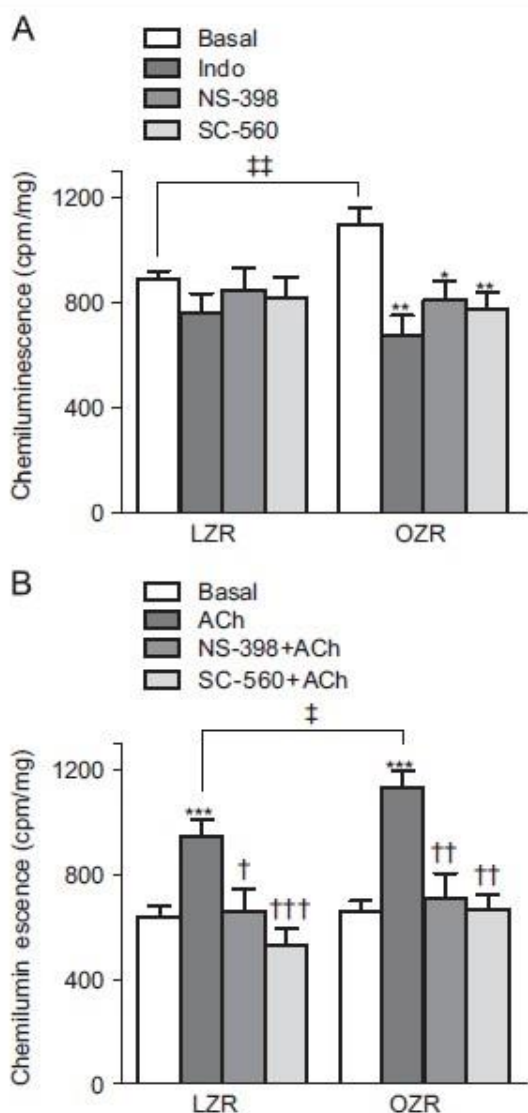


**Fig. 7.** Effect of IP receptor antagonism on the vasorelaxation in response to ACh in renal interlobar arteries from LZR and OZR. Effect of the selective PGI<sub>2</sub> receptor (IP) antagonist CAY 10441 (0.1 mM) on (A) basal tone of renal arteries from OZR compared to LZR and (B) and (C) the relaxations to ACh in interlobar arteries from LZR (B) and OZR (C) under conditions of TP receptor blockade. (D–G) Effects of selective COX-1 inhibitor SC-560 (1 mM) (D, E) and of the selective COX-2 inhibitor NS-398 (1 mM) (F, G) under conditions of TP receptor blockade on the average relaxant responses to ACh in interlobar arteries from LZR (D, F) and OZR (E, G). Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe) (B–G) or as the increase in baseline tension (BL), expressed as percentage of the maximum contraction induced by potassium solution (KPSS), after addition of the antagonist (A). Data are shown as the mean ± SEM of 5–10 arteries. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, versus control before treatment, †P < 0.05, versus LZR, Student's t test for unpaired (A) or paired (B, D, E, F, and G) observations.

the basal relaxant influence of PGI<sub>2</sub> on renal blood flow is blunted in OZR which might contribute to renal injury in obesity.

Both COX-1 and COX-2 have been reported to significantly contribute to basal PGI<sub>2</sub> production in renal cortex and medulla, respectively [7]. In the present study, constitutive expression of both isoenzymes in the endothelium of renal arteries and the inhibitory effect of the selective COX-1 and COX-2 antagonists on the relaxations to ACh suggest that relaxant endothelial prostanoids, namely PGI<sub>2</sub>, might derive from both COX-1 and COX-2 pathways. Obesity mostly blunted these relaxations. COX-2-derived PGI<sub>2</sub> has been suggested to have a protective role under atherogenic conditions [44] and also to be protective of endothelial function in diabetes [45], obesity [46], and

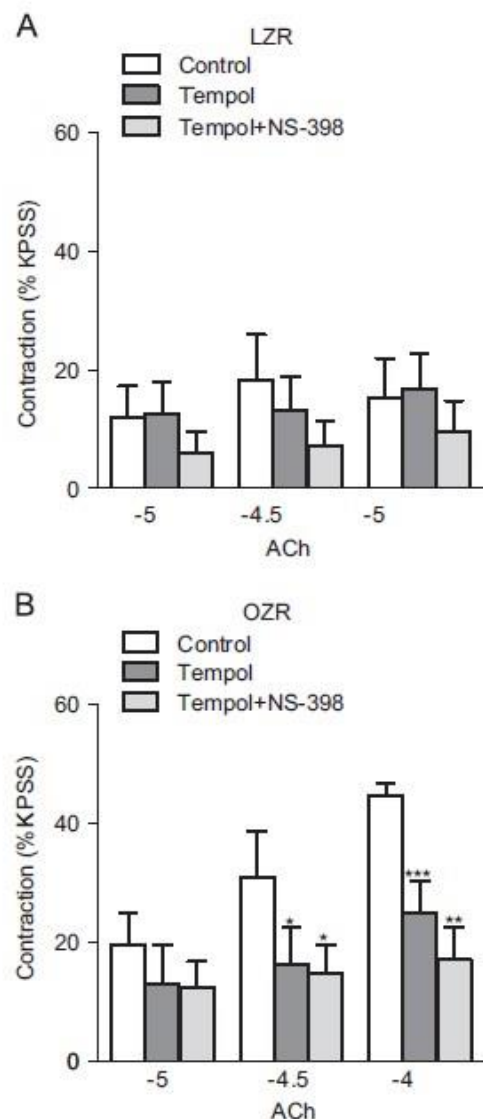
hyperlipidemia [47] to compensate for the loss of NO due to oxidative stress. On the other hand, COX-2 selective inhibition reduced glomerular and renal blood flow in physiological stressed volunteers or patients [8] and COX-2 inhibitors have been reported to increase the incidence of renal hemodynamic events, which points out the importance of constitutive COX-2 in renal hemodynamics [6,48]. The present data suggest, however, that the endothelial COX-2 relaxant influence, probably PGI<sub>2</sub>-mediated, is blunted since PGI<sub>2</sub> is mostly acting through TP receptors and COX-2 inhibition attenuated endothelial-dependent vasoconstriction in renal arteries from OZR. These observations are consistent with the beneficial effects of COX-2



**Fig. 8.** Effect of COX inhibitors on basal and ACh-stimulated superoxide production in isolated renal interlobar arteries of LZR and OZR. Effect of indomethacin (1 mM), NS-398 (1 mM), and SC-560 (1 mM) on basal superoxide production (A) and effect NS-398 and SC-560 on acetylcholine-stimulated superoxide production under NOS blockade conditions (B) in renal arteries from LZR and OZR. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean  $\pm$  SEM of 8-20 animals. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , versus control before treatment; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , versus LZR, Student's *t* test for unpaired observations.

inhibitors on renal hemodynamics and kidney injury reported in the OZR and in diabetic rats [12,36,37].

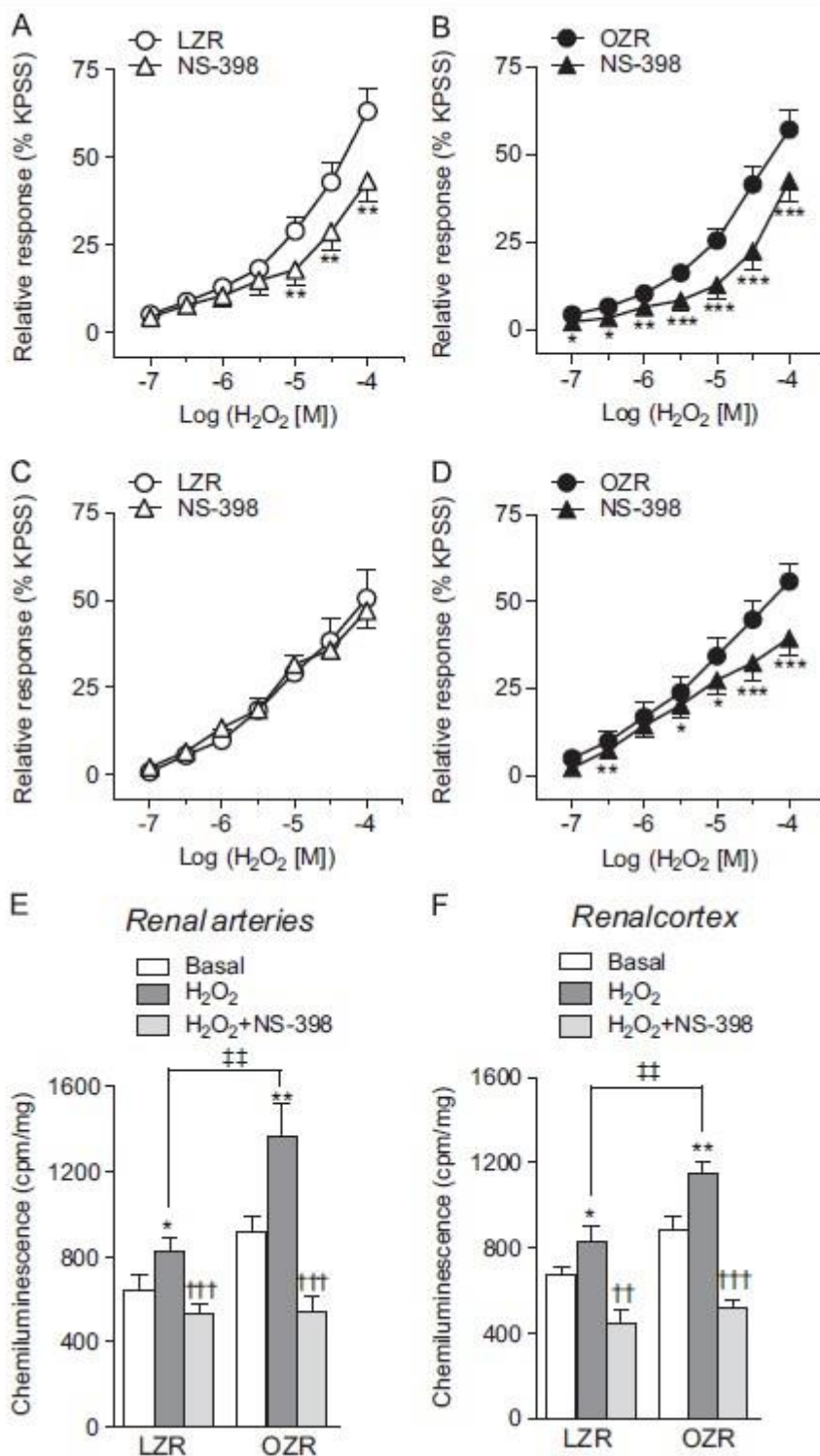
The present results further demonstrate that increased renal COX-2-dependent contractile responses and renal endothelial dysfunction in obese rats were associated with enhanced COX-2-mediated ROS generation. Thus, ACh-induced contractions were reduced by the superoxide scavenger tempol and ACh stimulated superoxide production that was greater in interlobar arteries from obese rats and reversed by inhibition of COX-2. Moreover, COX-2 was also involved in the enhanced basal superoxide production of renal arteries from OZR, which demonstrates that COX-2 directly contributes to vascular oxidative stress in the kidney of obese rats and supports earlier reports showing that treatment with the COX-2 inhibitor rofecoxib significantly attenuated the augmented urinary excretion of the oxidative stress marker 8-isoprostane [12]. Therefore, our results demonstrate that COX-2 represents a major source of ROS generation and endothelial dysfunction in renal interlobar arteries of obese rats, which confirms recent findings in



**Fig. 9.** Constrictor responses to ACh in the presence of the superoxide scavenger tempol in isolated renal interlobar arteries. Effects of the selective superoxide scavenger tempol (30 mM) alone or combined blockade of tempol with the COX-2 inhibitor NS-398 (1 mM) on the contractions elicited by ACh under conditions of NOS blockade in renal arteries from LZR (A) and OZR (B). Results are expressed as percentage of the maximum contraction induced by potassium solution (KPSS) in each artery. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 7-8 arteries. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , versus control before treatment, Student's *t* test for paired observations.

renal [11,17] and also resistance arteries [21,22] from hypertensive patients and rat models, and suggests that COX-2-mediated ROS generation is a common mechanism of endothelial dysfunction under situations of vascular inflammation in insulin resistant states. Although COX-1 expression was unchanged or even decreased in the renal cortex of obese Zucker rats [12], the current study also shows an involvement of COX-1 in the higher basal and stimulated ROS generation of renal interlobar arteries from obese rats. This could be ascribed to the reported COX-1–COX-2 interactions when these isoenzymes coexpress together in an individual cell, by forming functional heterodimers that may facilitate COX-1 biosynthetic activity [49].

COX-2 is increased during renal injury and the present findings demonstrate that oxidative stress is involved in the augmented COX-2 activity of renal arteries in obesity, which in turn increases further ROS generation and leads to vascular dysfunction. Thus, the ROS generating agent hydrogen peroxide induced renal vasoconstriction and increased



**Fig. 10.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces COX-2-dependent endothelium and VSM vasoconstriction and ROS generation in isolated renal interlobar arteries. (A–D) Effect of NS-398 (1 mM) on the contractions elicited by 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in endothelium-intact (A, B) and endothelium-denuded (C, D) renal interlobar arteries depolarized with 25 mM K<sup>p</sup> from LZR (A, C) and OZR (B, D). Results are expressed as percentage of the precontraction induced by KPSS. Data are shown as the mean ± SEM of 6–7 arteries. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, versus control, Student's t test for paired observations. (E, F) Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NS-398 on basal superoxide production in renal interlobar arteries (E) and cortex (F) from LZR and OZR. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean ± SEM of 4–6 animals. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA followed by Bonferroni as a posteriori test \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, versus control; ††P < 0.01, †††P < 0.001, versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated; ‡‡P < 0.01, versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated LZR.

superoxide production, both effects being inhibited by the COX-2 blocker NS-398, which is in agreement with recent studies in renal [11] and also conductance and resistance arteries from hypertensive [17,21] and diabetic [20] animals. These reports show that oxidative stress not only enhances COX-2 activity but also is an upstream

regulator of COX-2 expression responsible for endothelial dysfunction [11,17,20]. On the other hand, the current results suggest that COX-2 in renal VSM contributes to augmented vasoconstriction in obese rats. Thus, removal of endothelium blunted COX-2-sensitive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced contractions in arteries from lean animals, indicating that endothelial

COX-2 contributes to vasoconstriction in part through ROS generation. However, COX-2 mediated vasoconstriction persisted in endothelium-denuded renal arteries of obese rats, in association with upregulation of COX-2 in VSM and augmented ROS production sensitive to COX-2 inhibition in both renal arteries and cortex. These findings provide evidence that enhanced expression of COX-2 in VSM plays a key role in oxidative stress, enhanced vasoconstriction, and vascular dysfunction of renal arteries in obesity, as reported in hypertension and diabetes [11,17,20].

In conclusion, the present study provides further insight into the role of COX-2 and oxidative stress in the pathogenesis of the renal vascular dysfunction in a rat model of genetic obesity, which might contribute to the obesity-associated renal injury. Augmented COX-2-mediated vasoconstriction and blunted COX-2-derived PGI<sub>2</sub> vasodilator effects were confirmed as causes underlying renal endothelial dysfunction in obese rats, thus providing specific clues to the understanding of the protective role of COX-2 inhibitors in the kidney reported in obesity and diabetes. The fact that vascular oxidative stress was identified as a key factor in the regulation of COX-2 activity and also as an effector mechanism in the COX-2-induced renal endothelial dysfunction of obese rats suggests common downstream pathogenic mechanisms in the vascular wall in obesity, diabetes, and hypertension. Nevertheless, specific features of COX and ROS metabolism in the different vascular beds should be assessed and taken into account when designing new therapeutic approaches for vascular dysfunction and inflammation in insulin-resistant states.

## Acknowledgments

This work was supported by Grant SAF 2012-31631 from MINECO, Spain. We thank Francisco Puente and Manuel Perales for their expert technical assistance.

## References

- [1] Bays, H. E. Adiposopathy is sick fat a cardiovascular disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* 57:2461–2473; 2011.
- [2] Wisse, BE; Kim, F; Schwartz, MW. Physiology. An integrative view of obesity. *Science* 318:928–929; 2007.
- [3] Abrass, CK. Overview: obesity: what does it have to do with kidney disease? *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:2768–2772; 2004.
- [4] Kramer, H; Luke, A; Bidani, A; Cao, G; Cooper, R; McGee, D. Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *Am. J. Kidney Dis.* 46:587–594; 2005.
- [5] de Vries, AP; Ruggenenti, P; Ruan, XZ; Praga, M; Cruzado, JM; Bajema, IM; D'Agati, VD; Lamb, HJ; Pongrac Barlovic, D; Hojs, R; Abbate, M; Rodriguez, R; Mogensen, CE; Porrini, E ERA-EDTA Working Group Diabesity. Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2:417–426; 2014.
- [6] Imig, JD. Eicosanoids and renal vascular function in diseases. *Clin. Sci. (Lond)* 111:21–34; 2006.
- [7] Qi, Z; Cai, H; Morrow, JD; Breyer, MD. Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension* 48:323–328; 2006.
- [8] Hao, CM; Breyer, MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.* 70:357–377; 2008.
- [9] Elmarakby, AA; Imig, JD. Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diet hypertensive rats. *Clin. Sci. (Lond)* 118:291–301; 2010.
- [10] Quilley, J; Chen, YJ. Role of COX-2 in the enhanced vasoconstrictor effect of arachidonic acid in the diabetic rat kidney. *Hypertension* 42:837–843; 2003.
- [11] Tian, XY; Wong, WT; Leung, FP; Zhang, Y; Wang, YX; Lee, HK; Ng, CF; Chen, ZY; Yao, X; Au, CL; Lau, CW; Vanhoutte, PM; Cooke, JP; Huang, Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 $\alpha$ ) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid. Redox Signal.* 16:363–373; 2012.
- [12] Dey, A; Maric, C; Kaesemeyer, WH; Zaharis, CZ; Stewart, J; Pollock, JS; Imig, JD. Rofecoxib decreases renal injury in obese Zucker rats. *Clin. Sci. (Lond.)* 107:561–570; 2004.
- [13] Dey, A; Williams, RS; Pollock, DM; Stepp, DW; Newman, JW; Hammock, BD; Imig, JD. Altered kidney CYP2C and cyclooxygenase-2 levels are associated with obesity-related albuminuria. *Obes. Res.* 12:1278–1289; 2004.
- [14] Komers, R; Zdychová, J; Cahová, M; Kazdová, L; Lindsley, JN; Anderson, S. Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats. *Kidney Int.* 67:2151–2158; 2005.
- [15] Cheng, HF; Wang, CJ; Moeckel, GW; Zhang, MZ; McKanna, JA; Harris, RC. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int.* 62:929–939; 2002.
- [16] Forbes, JM; Coughlan, MT; Cooper, ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57:1446–1454; 2008.
- [17] Wong, WT; Tian, XY; Chen, Y; Leung, FP; Liu, L; Lee, HK; Ng, CF; Xu, A; Yao, X; Vanhoutte, PM; Tipoe, GL; Huang, Y. Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. *Circ. Res.* 107:984–991; 2010.
- [18] Kiritoshi, S; Nishikawa, T; Sonoda, K; Kukidome, D; Senokuchi, T; Matsuo, T; Matsumura, T; Tokunaga, H; Brownlee, M; Araki, E. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes* 52:2570–2577; 2003.
- [19] Li, J; Chen, YJ; Quilley, J. Effect of tempol on renal cyclooxygenase expression and activity in experimental diabetes in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314:818–824; 2005.
- [20] Shi, Y; Vanhoutte, PM. Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 154:639–651; 2008.
- [21] Martínez-Revelles, S; Avendaño, MS; García-Redondo, AB; Alvarez, Y; Aguado, A; Pérez-Girón, JV; García-Redondo, L; Esteban, V; Redondo, JM; Alonso, MJ; Briones, AM; Salaices, M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 18:51–65; 2013.
- [22] Virdis, A; Bacca, A; Colucci, R; Duranti, E; Fornai, M; Materazzi, G; Ippolito, C; Bernardini, N; Blandizzi, C; Bernini, G; Taddei, S. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension* 62:337–344; 2013.
- [23] Ebenezzer, PJ; Mariappan, N; Elks, CM; Haque, M; Francis, J. Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic tempol. *Obesity (Silver Spring)* 17:1994–2002; 2009.
- [24] Galili, O; Versari, D; Sattler, KJ; Olson, ML; Mannheim, D; McConnell, JP; Chade, AR; Lerman, LO; Lerman, A. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292:H904–H911; 2007.
- [25] Prieto, D; Contreras, C; Sánchez, A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12:412–426; 2014.
- [26] Hayashi, K; Kanda, T; Homma, K; Tokuyama, H; Okubo, K; Takamatsu, I; Tatematsu, S; Kumagai, H; Saruta, T. Altered renal microvascular response in Zucker obese rats. *Metabolism* 51:1553–1561; 2002.
- [27] Knight, SF; Quigley, JE; Yuan, J; Roy, SS; Elmarakby, A; Imig, JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension* 51:352–359; 2008.
- [28] Prieto, D; Kaminski, PM; Bagi, Z; Ahmad, M; Wolin, MS. Hypoxic relaxation of penile arteries: involvement of endothelial nitric oxide and modulation by reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299:H915–H924; 2010.
- [29] Sánchez, A; Martínez, P; Muñoz, M; Benedito, S; García-Sacristán, A; Hernán-dez, M; Prieto, D. Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin resistant obese rats: role of ETA and ETB receptors. *Br. J. Pharmacol.* 171:5682–5695; 2014.
- [30] Villalba, N; Martínez, P; Briones, AM; Sánchez, A; Salaices, M; García-Sacristán, A; Hernández, M; Benedito, S; Prieto, D. Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297:H696–H707; 2009.
- [31] Erdei, N; Tóth, A; Pásztor, ET; Papp, Z; Edes, I; Koller, A; Bagi, Z. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291:H2107–H2115; 2006.
- [32] Sánchez, A; Contreras, C; Martínez, MP; Climent, B; Benedito, S; García-Sacristán, A; Hernández, M; Prieto, D. Role of neural NO synthase (nNOS) uncoupling in the dysfunctional nitric oxide vasorelaxation of penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *PLoS One* 7:e36027; 2012.
- [33] Silver, AE; Beske, SD; Christou, DD; Donato, AJ; Moreau, KL; Eskurza, I; Gates, PE; Seals, DR. Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation* 115:627–637; 2007.
- [34] Cheng, H; Wang, H; Fan, X; Pauksakon, P; Harris, RC. Improvement of endothelial nitric oxide synthase activity retards the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney Int.* 82:1176–1183; 2012.
- [35] Shi, Y; Man, RY; Vanhoutte, PM. Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 29:185–192; 2008.
- [36] Komers, R; Lindsley, JN; Oyama, TT; Schutzer, WE; Reed, JF; Mader, SL; Anderson, S. Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.* 107:889–898; 2001.
- [37] Quilley, J; Santos, M; Pedraza, P. Renal protective effect of chronic inhibition of COX-2 with SC-58236 in streptozotocin-diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300:H2316–H2322; 2011.
- [38] Okumura, M; Imanishi, M; Yamashita, T; Yamamura, Y; Kim, S; Iwao, H; Tanaka, S; Fujii, S. Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sci.* 66:371–377; 2000.

- [40] Yokoyama, C; Yabuki, T; Shimonishi, M; Wada, M; Hatae, T; Ohkawara, S; Takeda, J; Kinoshita, T; Okabe, M; Tanabe, T. Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation* 106:2397–2403; 2002.
- [41] Gluais, P; Lonchamp, M; Morrow, JD; Vanhoutte, PM; Feletou, M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.* 146:834–845; 2005.
- [42] Vanhoutte, PM. Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. *Hypertension* 57:526–531; 2011.
- [43] Liu B, Luo W, Zhang Y, Li H, Zhu N, Huang D, Zhou Y. Role of cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in endothelium-dependent vasoconstrictor activity of porcine interlobular renal arteries. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 302, F1133-F1140; 2012.
- [44] Liu, B; Zhang, Y; Zhu, N; Li, H; Luo, W; Zhou, Y. A vasoconstrictor role for cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in mouse renal arteries. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 305:F1315–F1322; 2013.
- [45] Egan, KM; Lawson, JA; Fries, S; Koller, B; Rader, DJ; Smyth, EM; Fitzgerald, GA. COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306:1954–1957; 2004.
- [46] Szerafin, T; Erdei, N; Fülöp, T; Pasztor, ET; Edes, I; Koller, A; Bagi, Z. Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ. Res.* 99:e12–e17; 2006.
- [47] Sánchez, A; Contreras, C; Martínez, P; Villalba, N; Benedito, S; García-Sacristán, A; Saláces, M; Hernández, M; Prieto, D. Enhanced cyclooxygenase 2-mediated vasorelaxation in coronary arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis* 213:392–399; 2010.
- [48] Gendron, ME; Thorin-Trescases, N; Villeneuve, L; Thorin, E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 292:H451–H458; 2007.
- [49] Harris, RC. An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17:64–69; 2008.
- [50] Yu, Y; Fan, J; Chen, XS; Wang, D; Klein-Szanto, AJ; Campbell, RL; FitzGerald, GA; Funk, CD. Genetic model of selective COX2 inhibition reveals novel heterodimer signaling. *Nat. Med* 12:699–704; 2006.

## **4. DISCUSIÓN**



En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha evaluado el papel de las ROS en la función endotelial renal, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés oxidativo vascular en arterias intrarrenales de un modelo experimental en rata de obesidad genética/síndrome metabólico. Los datos obtenidos muestran por primera vez que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un mediador fisiológico liberado por el endotelio renal que media las vasodilataciones tipo EDH en las arterias renales, mientras que en condiciones de resistencia a la insulina/obesidad genética el estrés oxidativo y la producción incrementada de  $\bullet\text{O}_2^-$  incrementan la vasoconstricción e inhabilitan las respuestas relajantes mediadas por NO y por  $\text{PGI}_2$  originando disfunción endotelial.

#### **4.1 PAPEL DEL $\text{H}_2\text{O}_2$ EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL RENAL**

ROS como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  han sido implicadas en la respuesta de tipo EDH relajante en las arterias de varios lechos vasculares, incluyendo arterias mesentéricas y coronarias (Matoba et al., 2000; Matoba et al., 2003; Miura et al., 2003), pero su papel en la función endotelial renal ha sido principalmente investigado en el contexto perjudicial de la generación de ROS derivadas de la NADPH oxidasa y mitocondria en la enfermedad vascular e insuficiencia renal asociada a la diabetes y estados de resistencia a la insulina (Cowley et al., 2015; Muñoz et al., 2015; Sharma, 2016). El presente estudio demuestra un papel fisiológico del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la hiperpolarización dependiente del endotelio (EDH) y la vasodilatación de las arterias intrarrenales de rata. En condiciones de inhibición de la NOS y la COX, el agonista endotelial ACh indujo relajaciones y estimuló la liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que fueron inhibidas por la catalasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno relajó las arterias renales, redujo el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  intracelular en el MLV renal y aumentó de forma significativa las corrientes de  $\text{K}^+$  en las células endoteliales renales. Las relajaciones sensibles a catalasa y la generación de ROS estimulada por la ACh en las arterias renales se redujeron mediante el bloqueo selectivo de las enzimas CYP. Las epoxigenasas CYP2C23 y CYP2C11 se expresaron y fueron co-localizadas con eNOS en el endotelio de las arteriolas y glomérulos renales, como fuentes de generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la pared vascular.

#### 4.1.1 Papel del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la vasodilatación endotelial renal

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está involucrado en la regulación metabólica del flujo sanguíneo coronario (Yada et al., 2003) y se libera del endotelio por flujo y agonistas (Matoba et al., 2003; Miura et al., 2003). En el presente estudio, las relajaciones dependientes del endotelio no-NO no-prostanoide fueron inhibidas por la catalasa en las arterias intrarrenales de rata sugiriendo la participación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado del endotelio. Además, se demuestra que la ACh estimula la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno relajan las arterias renales, simulando así la vasodilatación renal sensible a la catalasa. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido propuesto tanto como vasodilatador en las arteriolas aferentes renales de ratones (Li et al., 2016) y en las células del MLV renales humanas (Palen et al., 2006), como vasoconstrictor en las arterias principales renales de la rata (Gao & Lee, 2005). La capacidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para relajar o contraer un determinado lecho vascular se ha atribuido al tamaño arterial y al grado de despolarización arterial (Santiago et al., 2013). De acuerdo con esto, el aumento de K<sup>+</sup> extracelular abolió el efecto relajante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y lo convirtió en vasoconstricción en las pequeñas arterias interlobares renales de rata empleadas en el presente estudio. Los niveles basales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medidos en las arterias aisladas fueron altos, aunque inferiores a los de la corteza renal que tiene mayor actividad metabólica. Curiosamente, la expresión de la catalasa, una enzima con tasas de recambio muy altas, fue proporcionalmente mucho menor en las arterias renales comparado con la corteza renal, lo que sugiere una expresión/actividad constitutiva menor de la catalasa, lo cual podría potenciar la actividad vasodilatadora del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado en la pared vascular renal. Por otro lado, las relajaciones endoteliales en respuesta a la ACh se redujeron por el ebselen mimético de GPx y la enzima reductora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> GPx-1 se expresó tanto en las arterias renales como en la corteza. La GPx-1 está presente en las células endoteliales vasculares y su expresión y actividad son reguladas al alza por el *shear stress* laminar (Takeshita et al., 2000). Dado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es liberado por flujo en las arteriolas coronarias (Liu et al., 2003; Miura et al., 2003; Liu et al., 2011), los datos obtenidos con catalasa y GPx en las arterias intrarrenales refuerzan el concepto de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un vasodilatador liberado del endotelio renal.

#### 4.1.2 Mecanismos de las acciones vasculares renales del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Las relajaciones dependientes del endotelio en arterias y arteriolas renales se han caracterizado durante mucho tiempo por poseer un componente hiperpolarizante predominante o respuesta de tipo EDH, inicialmente atribuido a factores difusibles como los iones K<sup>+</sup> o metabolitos de las CYP liberados por el endotelio que directamente hiperpolarizan el MLV (Jiang & Dusting, 2001; Bússemaker et al., 2003). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido identificado como un EDHF transferible liberado por el flujo o agonistas que estimula los canales de K<sup>+</sup> del MLV para inducir la hiperpolarización y la relajación en arteriolas mesentéricas y coronarias (Matoba et al., 2000; Miura et al., 2003; Shimokawa, 2010; Liu et al., 2011; Zhang et al., 2012b). Nuestros datos demuestran que bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocaron relajación de las arterias renales y disminución de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el MLV renal. Además, se bloquearon las relajaciones inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante el incremento de K<sup>+</sup> extracelular, lo que sugiere que tiene lugar una hiperpolarización del MLV y apoya a los recientes estudios, los cuales muestran que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaja las arteriolas aferentes de ratón activando K<sub>Ca</sub> y los canales de K<sup>+</sup> (K<sub>V</sub>) activados por voltaje (Li et al., 2016). Sin embargo, la relajación inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue acompañada por un descenso de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> siendo mayor el efecto relajante en las arterias renales, de acuerdo con los hallazgos en otros lechos arteriales en los que la estimulación endotelial liberó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e indujo relajaciones sensibles a la catalasa, pero el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no reprodujo la magnitud del efecto hiperpolarizante sobre el MLV provocado por los agonistas endoteliales (Chaytor et al., 2003). En el presente estudio, la relación entre las disminuciones de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el MLV y la vasodilatación inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias renales sugiere que además de los mecanismos hiperpolarizantes del MLV, los mecanismos de desensibilización al Ca<sup>2+</sup> están implicados en el efecto relajante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La contribución del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la vasodilatación dependiente del EDHF se ha atribuido recientemente a la activación de la actividad catalítica de la proteína quinasa G (PKG) a través de la oxidación de la subunidad α1 (Burgoyne et al., 2007; Burgoyne et al., 2013). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede dilatar las arteriolas coronarias humanas por la activación de PKGα1 y posterior apertura de BK<sub>Ca</sub> e hiperpolarización de las células del MLV (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2012b). Sin embargo, además de su papel en la modulación de la apertura de los canales de K<sup>+</sup>, la PKG puede fosforilar eficazmente la subunidad objetivo miosina de la miosina fosfatasa proporcionando un mecanismo de desensibilización al Ca<sup>2+</sup> y relajación del MLV (Wooldridge et al., 2004), lo que puede

explicar los mecanismos de desensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el MLV renal hallados en nuestro estudio. La vasodilatación mediada por la EDH se consideró inicialmente como el resultado de un factor difusible liberado del endotelio que hiperpolarizaba y relajaba el MLV, pero a día de hoy se acepta su implicación en la propagación electrotónica de la hiperpolarización iniciada en las células endoteliales al MLV subyacente a través de las uniones *gap* mio-endoteliales (Vanhoutte et al., 2009; Garland et al., 2011). En el presente estudio, se demuestra por primera vez que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado del endotelio renal por la ACh, juega un papel principal en la respuesta relajante EDH de las arterias renales, a través de un mecanismo que implica la estimulación de la actividad del canal de  $\text{K}^+$  en las células endoteliales renales. Recientemente hemos demostrado que la ACh activa los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de baja e intermedia conductancia en células aisladas frescas asociados a las relajaciones dependientes del endotelio sensibles a los inhibidores del canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de baja e intermedia conductancia (Pinilla et al., 2016). Estudios previos sobre el papel del  $\text{H}_2\text{O}_2$  como EDHF en las arteriolas mesentéricas y coronarias ya sugirieron que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría tener un efecto relevante en los canales de  $\text{K}_{\text{Ca}}$  en las células endoteliales, ya que las relajaciones inducidas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  eran sensibles a los inhibidores de los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de baja e intermedia conductancia en arterias con endotelio intacto (Miura et al., 2003), pero no en microvasos desprovistos de endotelio (Matoba et al., 2000). En el presente estudio demostramos que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno (10  $\mu\text{M}$ ) indujo una activación lenta, pronunciada y de larga duración de las mismas corrientes de  $\text{K}_{\text{Ca}}$  que las activadas por ACh en células endoteliales aisladas de arterias renales (Pinilla et al., 2016), lo que indica que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado por la estimulación endotelial hiperpolariza las células endoteliales pudiendo de esta forma iniciar una respuesta vasodilatadora de EDH en las arterias renales, a través de un mecanismo que es distinto a su acción en el MLV. Se ha sugerido que la actividad del canal de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  endotelial promovida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  es secundaria a la amplificación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  o la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de los almacenes intracelulares en las células endoteliales (Edwards et al., 2008; Ellinsworth et al., 2016). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  provoca la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tanto en células endoteliales como de MLV a través de la oxidación de los receptores  $\text{IP}_3$  en el RE (Hu et al., 2000; Zheng & Shen, 2005; Trebak et al., 2010; Santiago et al., 2015). Por otra parte, se ha descrito recientemente que los agonistas endoteliales inducen incrementos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células endoteliales, que son

reducidos por la catalasa y potenciados por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Chidgey et al., 2016). En nuestro estudio, la depleción de las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE por la inhibición de SERCA con CPA provocó una activación pronunciada de las corrientes de  $\text{K}^+$  en las células endoteliales renales aisladas, y su efecto no fue mayor tras el tratamiento combinado de CPA junto con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que sugiere un mecanismo común de acción para ambos compuestos y consolida el concepto de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  moviliza los almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE en las células endoteliales conduciendo a la estimulación de la actividad del canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$  y la hiperpolarización de las células endoteliales renales (Edwards et al., 2008; Chidgey et al., 2016; Ellinsworth et al., 2016).

#### **4.1.3 La implicación del $\text{H}_2\text{O}_2$ derivado de la CYP en la vasodilatación dependiente del endotelio de las arterias renales**

Las células endoteliales pueden producir ROS a partir de un número de fuentes diferentes incluyendo la NADPH oxidasa, cadena de transporte de electrones mitocondrial, NOS desacoplada, CYP epoxigenasas, XO, COX y LOX. En las arterias renales, la COX-1 endotelial y COX-2 constitutiva son fuentes relevantes de ROS, es decir, de  $\bullet\text{O}_2^-$ , que contribuyen a las contracciones endoteliales en condiciones fisiológicas (Muñoz et al., 2015). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se identificó inicialmente como un EDHF derivado de la eNOS en arteriolas mesentéricas de ratón, ya que la liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  estimulada por ACh se inhibió en ratones en los que se había eliminado el gen de eNOS (Matoba et al., 2000). Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio demuestran que en condiciones de inhibición de eNOS y COX, la ACh provocó relajaciones no prostanoideas no-NO sensibles a catalasa y estimuló la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en arterias renales, lo que sugiere una liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  independiente de la eNOS y COX. En el riñón, las enzimas Nox se distribuyen de forma regional, siendo Nox4 y también Nox2 las formas predominantes. La NADPH oxidasa, en particular Nox4, ha resultado ser una fuente importante de generación de ROS, estrés oxidativo y lesiones renales principalmente en condiciones patológicas como la nefropatía diabética y ERC (Sedeek et al., 2013; Sharma, 2016) y en las arterias renales de pacientes de edad avanzada (Schlüter et al., 2010). Aquí se demuestra que la NADPH oxidasa también puede ser una fuente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  vasodilatador en las arterias intrarrenales, como lo demuestran los efectos inhibitorios del inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina en relajaciones inducidas por ACh y también en la actividad NADPH generadora de  $\bullet\text{O}_2^-$

y  $H_2O_2$  en arterias renales en condiciones fisiológicas. Estos resultados están de acuerdo con lo obtenido en el corazón humano, donde la NADPH oxidasa es una fuente funcionalmente relevante de  $H_2O_2$  implicado en las relajaciones derivadas del endotelio inducidas por su agonista de las arteriolas coronarias (Larsen et al., 2009), y con investigaciones recientes que muestran que la isoforma de Nox predominante en el riñón, Nox4, puede tener efectos potenciales beneficiosos sobre la función vasodilatadora (Ray et al., 2011). Se necesitan más estudios para evaluar el papel funcional específico de las diferentes isoformas de Nox en la función vasodilatadora renal. Las CYP epoxigenasas de las subfamilias CYP2J y CYP2C catalizan el metabolismo oxidativo del ácido araquidónico a EETs en diversos tipos de células, incluyendo las células renales epiteliales y endoteliales, y poseen poderosos efectos protectores vasodilatadores, proangiogénicos, antiapoptóticos y postiquemia en la vasculatura (Imig, 2013). Los EETs son liberados como EDHF transferibles que pueden actuar sobre las células del MLV para causar hiperpolarización y relajación o promover la actividad del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  endotelial secundario a la amplificación de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular en las células endoteliales y por lo tanto, favorecer las respuestas relajantes de tipo EDH (Campbell & Fleming, 2010; Ellinsworth et al., 2016). En el riñón, los 11,12-EETs han sido involucrados en la dilatación de las arteriolas interlobulares y aferentes de rata (Imig et al., 1996b) y agonistas endoteliales estimularon la generación de EETs e indujeron relajaciones sensibles a inhibidores de epoxigenasas (Puntarulo & Cederbaum, 1998). En el presente estudio se demuestra la participación de las enzimas CYP2C en las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio de las arterias interlobares renales de rata, ya que el inhibidor específico de la CYP2C9 sulfafenazol inhibió de forma significativa las relajaciones en respuesta a la ACh sensibles a catalasa, en condiciones de inhibición de la NOS y la COX, confirmando estudios recientes realizados en la circulación preglomerular (Imig et al., 2001a). Curiosamente, la inhibición farmacológica de la enzima sEH, que rápidamente hidroliza los EETs a los metabolitos menos biológicos DHETE, aumentando así los niveles celulares de EETs y su actividad biológica (Fang et al., 2001; Imig & Hammock, 2009), inhibió el componente relajante no-NO no-prostanoide de las respuestas a la ACh en las arterias renales de rata, en contraste con la potenciación esperada de las relajaciones renales mediadas por EETs sobre el bloqueo de la sEH. Los hallazgos del presente estudio sugieren un importante papel vasoconstrictor de los EETs endoteliales

derivados de las CYP en las arterias interlobares renales e indican la participación de un componente relajante endotelial no-EET derivado de las enzimas CYP2C. Las CYP epoxigenasas generan ROS como subproductos del metabolismo de los lípidos durante la producción de EETs. La CYP2C9 se considera como una EDHF sintasa y una fuente funcionalmente significativa de ROS en las arterias coronarias (Fisslthaler et al., 1999). Sin embargo, en arteriolas coronarias porcinas y arterias de pacientes con enfermedad coronaria, la actividad de la CYP2C generó principalmente niveles vasoconstrictores de  $\bullet\text{O}_2^-$  con acción vasoconstrictora que reducen la vasodilatación mediada por NO *in vitro*, como se muestra por la potenciación en lugar de la inhibición de las relajaciones dependientes del endotelio inducidas por el inhibidor de la CYP2C9 sulfafenazol y por *scavengers* de  $\bullet\text{O}_2^-$  (Fleming et al., 2001; Zhou et al., 2012). Curiosamente, en el presente estudio se demuestra que la CYP2C es una fuente funcionalmente significativa de ROS endoteliales relajantes, es decir, de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las arterias interlobares renales. En primer lugar, la ACh estimuló la liberación de  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  que fue bloqueada por sulfafenazol, junto con la inhibición de las relajaciones endoteliales inducidas por ACh. Además, la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependiente de NADPH fue parcialmente inhibida por el sulfafenazol en las arterias interlobares renales, lo que concuerda con el hecho de que la actividad enzimática CYP que genera EETs y 20-HETE completamente dependiente de la adición exógena de NADPH en microvasos renales y mesentéricos (Zhao et al., 2005). Estos hallazgos, junto con el efecto relajante de concentraciones bajas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el efecto inhibitorio de la catalasa sobre las relajaciones de ACh sugieren que las isoenzimas endoteliales de CYP2C son las principales fuentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  vasodilatador en las arterias renales de rata. En apoyo de nuestros resultados funcionales, los datos inmunohistoquímicos del presente estudio proporcionaron una evidencia directa de una distribución abundante y diferencial de isoenzimas de CYP2C en los glomérulos y en arteriolas interlobares y preglomerulares renales de rata. De acuerdo con estudios anteriores, la CYP2C23 fue la isoenzima CYP más abundante en la corteza renal (Dey et al., 2004b), mientras que la CYP2C11 fue predominante en las arterias interlobares renales. En ambos casos, las CYP epoxigenasas se colocalizaron con la eNOS en el endotelio glomerular y arterial confirmando un papel funcional para las enzimas CYP como sintasas del  $\text{H}_2\text{O}_2$  vasodilatador. El hecho de que la actividad de la CYP epoxigenasa generadora de ROS prevalezca funcionalmente el  $\text{H}_2\text{O}_2$  vasodilatador sobre el  $\bullet\text{O}_2^-$  vasoconstrictor en las arterias renales *in vitro* es probable

que esté relacionado con la elevada actividad de la SOD en el tejido arterial renal responsable de la dismutación enzimática de  $\bullet\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De las isoformas de SOD, CuZn-SOD representa hasta el 80% de la actividad total de SOD en el riñón de mamíferos (Marklund, 1984). Los niveles de expresión de la proteína de la CuZn-SOD citosólica fueron similares en las arterias renales y en la corteza renal metabólicamente más activa. De hecho, en el estudio inicial de Morikawa (Morikawa et al., 2003) en el que se consideró al  $\text{H}_2\text{O}_2$  como EDHF, la CuZn-SOD fue considerada como una "EDHF sintasa" ya que la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  endotelial y las relajaciones e hiperpolarizaciones dependientes de endotelio sensibles a la catalasa se redujeron significativamente en ratones CuZn-SOD<sup>-/-</sup>.

## **4.2 PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA OBESIDAD**

La obesidad y el síndrome metabólico han sido identificados como fuertes predictores de la ERC independientemente de las comorbilidades asociadas como la hipertensión o la diabetes. Parte de los objetivos del presente estudio estuvieron destinados a evaluar el papel de la COX-2 y las ROS en la disfunción vascular renal en la obesidad. Nuestros resultados demuestran que la disfunción endotelial de las arterias interlobares es atribuible al incremento de la vasoconstricción dependiente del endotelio mediada por ROS derivados de la COX en un modelo experimental de rata de obesidad genética. La inhibición de la COX-2 redujo la producción basal y estimulada de ROS y restauró las respuestas vasodilatadoras endoteliales.

### **4.2.1 Disfunción endotelial renal y fuentes de estrés oxidativo en la obesidad genética**

Las relajaciones dependientes del endotelio a la ACh se redujeron en las arterias interlobares renales de RZO en comparación con RZL, lo que indica disfunción endotelial y apoya los hallazgos anteriores en la microcirculación renal de ratas con obesidad tanto genética RZO (Hayashi et al., 2002) como inducida por dieta (Elmarakby & Imig, 2010), donde las respuestas vasodilatadoras a la ACh se inhibieron en arteriolas aferentes renales. Estas observaciones sugieren que el deterioro de la función endotelial de las arterias interlobares preglomerulares, como se muestra en el

presente estudio, puede reflejar la disfunción vascular de la microcirculación glomerular (Hayashi et al., 2002; Elmarakby & Imig, 2010). Actualmente está bien establecido que el estrés oxidativo vascular es una causa principal de la inactivación del NO y de la disfunción endotelial en los estados de resistencia a la insulina de obesidad y diabetes. Se ha descrito que el estrés oxidativo subyace a la lesión renal en los modelos de obesidad genética e inducida por dieta (Dey et al., 2004a; Ebenezer et al., 2009), donde el tratamiento con los *scavengers* de radicales libres disminuyó la inflamación y mejoró las alteraciones funcionales (aumento de la excreción urinaria de albúmina) y estructurales renales (Ebenezer et al., 2009). El presente estudio demuestra que la inhibición de las respuestas vasodilatadoras a la ACh en las arterias interlobares renales, en parte debido a la disminución de las relajaciones mediadas por NO, se asociaron con un aumento de la producción de ROS vascular en paralelo con niveles más altos de estrés oxidativo en la corteza renal de ratas obesas. Tanto la NADPH oxidasa como la XO fueron identificadas como fuentes de la generación incrementada de  $\bullet\text{O}_2^-$  en las arterias renales de RZO, como se muestra por el efecto inhibitorio de la apocinina y el alopurinol sobre la generación basal de ROS. El aumento en la actividad de NADPH endotelial (Galili et al., 2007; Silver et al., 2007; Sánchez et al., 2012; Prieto et al., 2013;) y XO (Erdei et al., 2006) ha sido implicado anteriormente en el estrés oxidativo vascular y la disfunción endotelial en arterias de animales obesos y en células endoteliales de individuos obesos. Es interesante señalar que la eNOS desacoplada, probablemente como resultado de altos niveles de  $\text{ONOO}^-$  formado por el estrés oxidativo inicial, también está implicada en la generación aumentada de ROS de arterias interlobares renales de RZO, ya que el bloqueo de NOS redujo en gran medida el estrés oxidativo renal en ratas obesas. Estos hallazgos confirman los datos de un estudio reciente que muestra que la dimerización de la eNOS glomerular, indicativa del desacoplamiento de la misma, está alterada en ratones db/db, un modelo de diabetes tipo 2, y la suplementación con el cofactor BH4 de la NOS corrigió la dimerización de la eNOS y mejoró las anomalías estructurales y funcionales glomerulares (Cheng et al., 2012b).

#### 4.2.2 Papel de la COX-2 en el estrés oxidativo y la disfunción endotelial renal

Las interacciones entre la actividad de las ROS y COX en la disfunción vascular están bien establecidas y el estrés oxidativo aumenta la expresión y la actividad de la COX-1 y COX-2 en las arterias de ratas de edad avanzada, diabéticas e hipertensas (Shi & Vanhoutte, 2008; Shi et al., 2008; Wong et al., 2010a; Tian et al., 2012; Martínez-Revelles et al., 2013). El incremento en la expresión de la COX-2 y otros marcadores inflamatorios junto con el NF $\kappa$ B sensible a redox fueron determinados en la corteza renal de ratas obesas inducidas por dieta asociadas con disfunción endotelial de arteriolas glomerulares (Elmarakby & Imig, 2010). En el presente estudio, la expresión vascular de la COX-2 se incrementó en las arterias interlobares renales y aumentó la vasoconstricción mediada por la COX-2 inhibiendo las respuestas vasodilatadoras endoteliales a la ACh en ratas obesas. Sin embargo, la COX-1 y COX-2 se expresan constitutivamente en el riñón y los metabolitos de ambas isoenzimas también están involucrados en la regulación fisiológica del FSR (Imig, 2006; Qi et al., 2006; Hao & Breyer, 2008). En el presente estudio, la COX-1 y la COX-2 se localizaron en el endotelio de las arterias interlobares y la inhibición de estas isoenzimas aumentó ligeramente las relajaciones inducidas por la ACh en la RZL, lo que sugiere que los prostanoideos vasoconstrictores derivados de COX-1 y COX-2 modulan las respuestas vasodilatadoras endoteliales en arterias sanas. Curiosamente, apenas se observaron cambios en la expresión moderada de la COX-1 en las arterias renales con respecto a las ratas obesas, en línea con los resultados anteriores en la corteza renal de RZO (Dey et al., 2004a) y en modelos experimentales de diabetes tipo 1 y 2 (Komers et al., 2001; Cheng et al., 2002; Imig, 2006). Por otro lado, la expresión aumentada de la COX-2 en ambos tejidos endotelio y MLV se asoció con la disfunción endotelial en las arterias interlobares de RZO. La indometacina y la inhibición selectiva de la COX-2 restauraron las relajaciones dependientes del endotelio, lo que sugiere que los metabolitos vasoconstrictores derivados de COX-2 contribuyen a la disfunción endotelial renal en ratas obesas. El aumento de la vasoconstricción renal mediada por COX-2, se confirmó adicionalmente en las arterias interlobares intactas, en las que el bloqueo de la NOS desenmascaró las contracciones en respuesta a la ACh apenas detectables en animales control siendo suprimidas por el inhibidor de la COX-2 NS-398. Los presentes hallazgos están en consonancia con el aumento de las respuestas a ácido araquidónico

vasoconstrictoras renales mediadas por COX-2 (Quilley & Chen, 2003) y con el incremento de la FGR (Komers et al., 2001), junto con el aumento de la expresión de COX-2 en la corteza renal del riñón perfundido de ratas diabéticas de tipo 1. En estos trabajos, los inhibidores de la COX-2 mejoraron el FSR y atenuaron la hiperfiltración, redujeron la proteinuria y la inflamación, y mejoraron las alteraciones estructurales renales (Komers et al., 2001; J Quilley et al., 2011), como también se observó en RZO tratadas con rofecoxib (Dey et al., 2004a). En el presente estudio, el bloqueo de los receptores TP mejoró las respuestas relajantes a la ACh en las arterias renales de RZO pero no de RZL, lo que indica un papel de los receptores TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> en el aumento de la vasoconstricción endotelial mediada por COX-2 de RZO. Estos resultados serían consistentes con el aumento de la producción de TXA<sub>2</sub> renal asociada con el aumento de la expresión de COX-2 observado en ratas obesas y diabéticas de tipo 2 (Okumura et al., 2000; Dey et al., 2004a; Dey et al., 2004b; Komers et al., 2005). Sin embargo, debe tenerse en cuenta la participación de los prostanoideos contráctiles distintos a TXA<sub>2</sub>, ya que el tratamiento con el inhibidor COX-2 rofecoxib reduce en gran medida la excreción urinaria de los metabolitos PGF<sub>2α</sub> y PGI<sub>2</sub> en la RZO, lo que sugiere que la COX-2 contribuye principalmente a los niveles de PGF<sub>2α</sub> y PGI<sub>2</sub> en el riñón de ratas obesas (Dey et al., 2004a). Por otra parte, la PGF<sub>2α</sub> derivada de COX-2 ha sido implicada recientemente en la disfunción endotelial de las arterias renales de ratas con hipertensión reno-vascular (Tian et al., 2012). La PGI<sub>2</sub> juega un papel clave en el mantenimiento del FSR y la supresión de la PGIS se asocia con daño isquémico renal (Yokoyama et al., 2002). Los presentes hallazgos demuestran que la PGI<sub>2</sub> relajante liberada basalmente está involucrada en el mantenimiento del tono arterial renal, como se deduce de la vasoconstricción inducida por el bloqueo selectivo de los receptores IP con CAY10441 en arterias interlobares renales intactas de RZL. Esta contracción se vio disminuida en las arterias de ratas obesas, lo que indica que la influencia de la PGI<sub>2</sub> relajante en la modulación en el tono vascular renal está reducida. Por otra parte, además de actuar sobre los receptores IP del MLV para inducir la vasodilatación y proteger la pared arterial, la PGI<sub>2</sub> también puede activar los receptores TP del MLV en condiciones de disfunción vascular debido a la producción excesiva de PGI<sub>2</sub> y/o defecto en los receptores IP (Gluais et al., 2005; Vanhoutte, 2011). Sin embargo, los receptores IP y TP del MLV pueden modular concomitantemente las respuestas vasculares de PGI<sub>2</sub> también en arterias sanas con receptores IP cuya función se

encuentra limitada. En las arterias interlobulares porcinas, la síntesis de PGI<sub>2</sub> endotelial mediada por COX-1 es responsable de la actividad vasoconstrictora dependiente del endotelio provocada por agonistas (Liu et al., 2012c, Liu et al., 2013b). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el bloqueo de los receptores TP desenmascaró un componente de las respuestas relajantes a la ACh mediado por IP en las arterias renales de RZL pero no de RZO, lo que sugiere que la PGI<sub>2</sub> puede actuar como vasoconstrictor y vasodilatador a través de los receptores TP e IP, respectivamente, en arterias interlobares de rata sana. En las arterias de animales obesos, el componente relajante mediado por IP se redujo y el antagonismo del receptor IP no alteró las relajaciones endoteliales inducidas por ACh en condiciones de inhibición del receptor TP. Por lo tanto, nuestros resultados proponen que el aumento de los niveles de PGI<sub>2</sub> derivados de la COX-2 observados en el riñón de RZO (Dey et al., 2004a) también podrían participar en el incremento de la vasoconstricción renal mediada por COX-2 a través de los receptores TP y, por tanto, contribuir a la disfunción endotelial en ratas obesas. Además, en el presente estudio se demuestra que la influencia relajante basal de la PGI<sub>2</sub> sobre el FSR se reduce en RZO, lo que podría contribuir a la lesión renal en la obesidad. Tanto la COX-1 como la COX-2 están involucradas significativamente en la producción basal de PGI<sub>2</sub> en la corteza renal y la médula, respectivamente (Qi et al., 2006). En el presente estudio, la expresión constitutiva de ambas isoenzimas en el endotelio de las arterias renales y el efecto inhibitorio de los antagonistas selectivos de COX-1 y COX-2 sobre las relajaciones a la ACh sugieren que los prostanoideos endoteliales relajantes, es decir, la PGI<sub>2</sub>, pueden derivar de la vía de COX-1 y COX-2. La obesidad atenúa dichas relajaciones. Se ha planteado que la PGI<sub>2</sub> derivada de la COX-2 tiene un papel protector en condiciones aterogénicas (Egan et al., 2004) y también protege la función endotelial en la diabetes (Szerafin et al., 2006), la obesidad (Sánchez et al., 2010b) y la hiperlipidemia (Gendron et al., 2007) para compensar la pérdida de NO debido al estrés oxidativo. Por otra parte, la inhibición selectiva de la COX-2 redujo el flujo sanguíneo glomerular y renal en voluntarios o pacientes con estrés fisiológico (Hao & Breyer, 2008) y los inhibidores de la COX-2 aumentaron la incidencia de eventos hemodinámicos renales, lo que pone de manifiesto la importancia de la COX-2 constitutiva en la hemodinámica renal (Imig, 2006; Harris, 2008). Los datos actuales sugieren, sin embargo, que la influencia relajante COX-2 endotelial, probablemente mediada por PGI<sub>2</sub>, se reduce ya que la PGI<sub>2</sub> actúa

principalmente a través de los receptores TP y la inhibición de la COX-2 disminuye la vasoconstricción derivada del endotelio en las arterias renales de RZO. Estas observaciones concuerdan con los efectos beneficiosos de los inhibidores de la COX-2 en la hemodinámica renal y lesión renal en RZO y en ratas diabéticas (Okumura et al., 2000; Komers et al., 2001; Dey et al., 2004a). Los presentes resultados demuestran además que el aumento de las respuestas contráctiles dependientes de COX-2 renales y la disfunción endotelial renal en ratas obesas se asociaron con el incremento de la generación de ROS mediada por COX-2. Por lo tanto, las contracciones inducidas por ACh fueron reducidas por el tempol como *scavenger* de  $\bullet\text{O}_2^-$  y la ACh estimuló la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  que fue mayor en las arterias interlobares de ratas obesas y revertida por la inhibición de la COX-2. Además, la COX-2 también participó en el aumento de la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  basal de las arterias renales de RZO, lo que demuestra que la COX-2 contribuye directamente al estrés oxidativo vascular en el riñón de ratas obesas y confirma datos anteriores que muestran que el tratamiento con el inhibidor de la COX-2 rofecoxib redujo significativamente el incremento de la excreción urinaria del marcador de estrés oxidativo 8-isoprostano (Dey et al., 2004a). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la COX-2 representa una fuente importante de generación de ROS y disfunción endotelial en arterias interlobares renales de ratas obesas, lo que confirma hallazgos recientes en arterias renales (Wong et al., 2010a; Tian et al., 2012) y también de resistencia (Martínez-Revelles et al., 2013; Virdis et al., 2013) de modelos de rata y pacientes hipertensos, y sugiere que la generación de ROS mediada por COX-2 es un mecanismo común de disfunción endotelial en situaciones de inflamación vascular en estados de resistencia a la insulina. Aunque la expresión de COX-1 se mantuvo sin cambios o incluso disminuyó en la corteza renal de ratas Zucker obesas (Dey et al., 2004a), el presente estudio también muestra una participación de la COX-1 en el incremento basal y estimulado de la generación de ROS de arterias interlobares renales de ratas obesas. Esto podría atribuirse a las interacciones COX-1-COX-2 cuando estas isoenzimas se coexpresan juntas en una célula individual, mediante la formación de heterodímeros funcionales que pueden favorecer la actividad biosintética de la COX-1 (Yu et al., 2006). La COX-2 aumenta durante la lesión renal y los presentes resultados demuestran que el estrés oxidativo está implicado en la actividad aumentada de la COX-2 de las arterias renales en la obesidad, lo que a su vez incrementa la generación de ROS y conduce a

disfunción vascular. Por lo tanto, el agente generador de ROS, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , indujo vasoconstricción renal y aumento de la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$ , siendo ambos efectos inhibidos por el NS-398, inhibidor de la COX-2, lo que está de acuerdo con estudios recientes en arterias renales (Tian et al., 2012) y también en arterias de conductancia y resistencia de modelos de hipertensión renal (Wong et al., 2010; Martínez-Revelles et al., 2013) y animales diabéticos (Shi & Vanhoutte, 2008). Estos estudios demuestran que el estrés oxidativo no sólo aumenta la actividad de la COX-2, sino que también es un regulador de la expresión de la COX-2 responsable de la disfunción endotelial (Shi & Vanhoutte, 2008; Wong et al., 2010; Tian et al., 2012). Por otro lado, los presentes resultados sugieren que la COX-2 en el MLV renal contribuye a la vasoconstricción aumentada en ratas obesas. Así, la retirada del endotelio inhibió las contracciones inducidas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensibles a COX-2 en las arterias de animales control, lo que indica que la COX-2 endotelial participa en la vasoconstricción en parte a través de la generación de ROS. Sin embargo, la vasoconstricción mediada por la COX-2 persistió en las arterias renales endoteliales de ratas obesas desprovistas de endotelio, en asociación con la regulación al alza de la COX-2 en el MLV y la producción aumentada de ROS sensible a la inhibición de la COX-2 en las arterias renales y en la corteza. Por ello, la expresión incrementada de COX-2 en el MLV juega un papel clave en el estrés oxidativo, vasoconstricción aumentada y disfunción vascular de las arterias renales en la obesidad, como se ha observado en modelos experimentales de hipertensión y diabetes (Shi & Vanhoutte, 2008; Wong et al., 2010; Tian et al., 2012).

En resumen, los resultados del presente estudio ofrecen una nueva perspectiva sobre el papel de la COX-2 y el estrés oxidativo en la patogénesis de la disfunción vascular renal en un modelo de rata de obesidad genética, lo que podría contribuir a la insuficiencia renal asociada a la obesidad. La vasoconstricción incrementada mediada por COX-2 y los efectos vasodilatadores reducidos de la  $\text{PGI}_2$  derivada de COX-2 son confirmados como causas de la disfunción endotelial renal en ratas obesas, proporcionando información sobre el papel protector de los inhibidores de la COX-2 en el riñón en obesidad y diabetes. El hecho de que el estrés oxidativo vascular ha sido identificado como un factor clave en la regulación de la actividad de la COX-2 y también como un desencadenante del mecanismo en la disfunción endotelial renal inducida por la COX-2 de ratas obesas sugiere mecanismos patógenos comunes en la pared vascular en la obesidad, la diabetes y la hipertensión. Sin embargo, las

características específicas del metabolismo de COX y ROS en los diferentes lechos vasculares deben ser evaluadas y tenidas en cuenta a la hora de diseñar nuevos enfoques terapéuticos para la disfunción vascular y la inflamación en estados de resistencia a la insulina.



## **5. CONCLUSIONES**



En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se han valorado el papel de las ROS en la función endotelial renal en condiciones fisiológicas, así como las alteraciones en su metabolismo y el papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada a la obesidad.

De los resultados obtenidos, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un mediador endotelial fisiológico implicado en las respuestas vasodilatadoras EDH de las arterias renales.
2. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  activa corrientes de  $\text{K}^+$  en las células endoteliales renales que iniciarían una respuesta tipo EDH en el endotelio.
3. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  relaja el MLV a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de las variaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.
4. Las fuentes de generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el endotelio renal incluyen las CYP2C epoxigenasas y las NADPH oxidasas.
5. Las arterias intrarrenales presentan disfunción endotelial en animales obesos asociada a un incremento de los niveles de estrés oxidativo y producción de ROS derivadas de NADPH oxidasas, XO y eNOS desacoplada.
6. La regulación al alza de la expresión de la COX-2 tanto en el endotelio como en el MLV de las arterias intrarrenales está asociada con un incremento de la vasoconstricción renal y con la inhibición de las respuestas relajantes de la  $\text{PGI}_2$  mediadas por COX-2, siendo causas de la disfunción endotelial renal en las ratas obesas.
7. El incremento en la expresión de la COX-2 se asocia con la producción incrementada de ROS, contribuyendo el superóxido derivado de la COX-2 a

la vasoconstricción aumentada y a la disfunción endotelial en arterias renales de animales obesos.

8. La exposición aguda a altas concentraciones de oxidantes como el  $H_2O_2$ , incrementa la actividad productora de ROS y vasoconstricción dependientes de la COX-2 contribuyendo así a la disfunción endotelial renal.

### CONCLUSIÓN FINAL

La evidencia experimental en los últimos años demuestra que las ROS no solamente están implicadas en la patogénesis de la enfermedad vascular mediada por el estrés oxidativo, sino que también pueden jugar un papel funcional en la regulación metabólica del flujo sanguíneo. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se identifica por primera vez el  $H_2O_2$  como mediador endotelial de las respuestas relajantes del tipo EDH de las arterias renales y será interesante, en estudios futuros, investigar el papel del  $H_2O_2$  en el acoplamiento del flujo sanguíneo a la actividad metabólica renal. Por otra parte, nuestro trabajo demuestra el papel esencial del estrés oxidativo derivado de la COX-2 en la patogénesis de la disfunción endotelial renal asociada a la obesidad, lo que posiblemente contribuye a la lesión renal en dichas circunstancias. Estudios recientes demuestran que la lesión renal en el riñón diabético está asociada con un descenso en los niveles de  $H_2O_2$ , lo que resalta la necesidad de valorar las consecuencias funcionales de esta reducción de  $H_2O_2$  en la hemodinámica renal y revisar los esfuerzos de las terapias antioxidantes para la enfermedad renal asociada a diabetes y a otros estados de resistencia a la insulina como la obesidad.



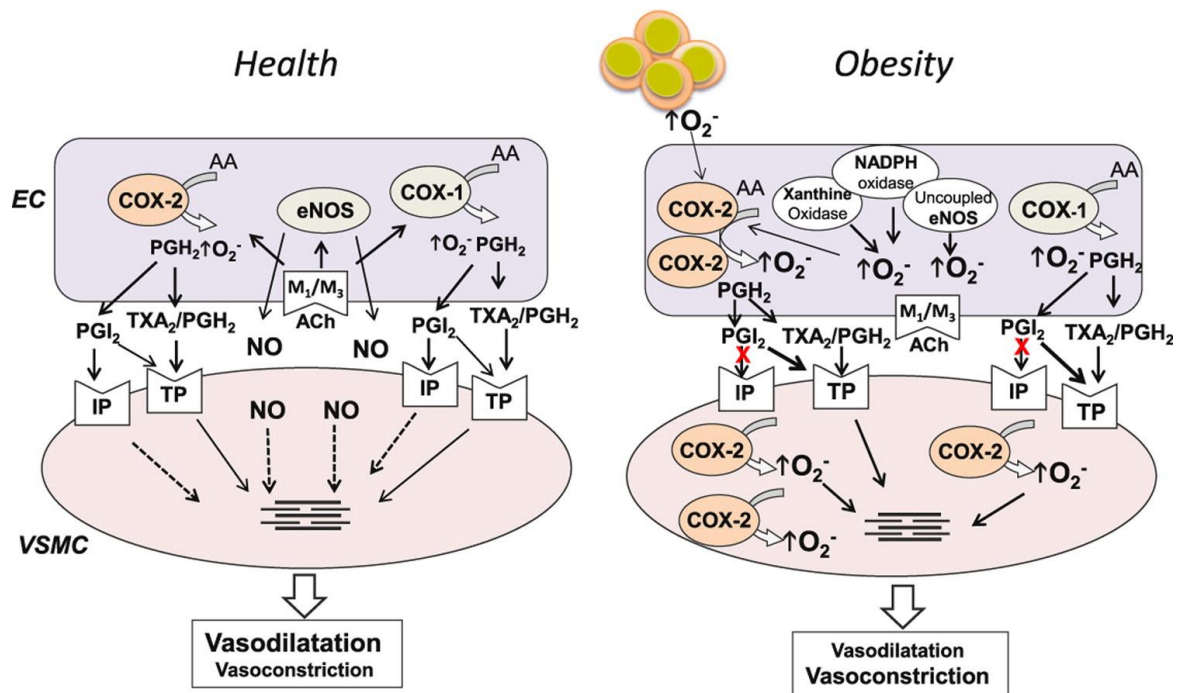


Figura 10. Mecanismos propuestos para la disfunción endotelial renal inducida por la COX-2 y ROS en la obesidad.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Centers for Disease Control (CDC). (2014). National chronic kidney disease fact sheet: general information and national estimates on chronic kidney disease in the United States, 2014. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA.
- Adlam, D., Bendall, J. K., De Bono, J. P., Alp, N. J., Khoo, J., Nicoli, T., Yokoyama, M., Kawashima, S., & Channon, K. M. (2007). Relationships between nitric oxide-mediated endothelial function, eNOS coupling and blood pressure revealed by eNOS-GTP cyclohydrolase 1 double transgenic mice. *Experimental Physiology*, 92(1), 119-126.
- Akar, F., Pektaş, M. B., Tufan, C., Soylemez, S., Sepici, A., Ulus, A. T., Gokalp, B., Ozturk, K., & Surucu, H. S. (2011). Resveratrol shows vasoprotective effect reducing oxidative stress without affecting metabolic disturbances in insulin-dependent diabetes of rabbits. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 25(2), 119-131.
- Allen, I. C., Scull, M. a, Moore, C. B., Holl, E. K., Mcelvania-, E., Taxman, D. J., Guthrie, E. H., Pickles, R. J., & Jenny, P. (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*, 30(4), 556-565.
- Alonso-Galicia, M., Drummond, H. A., Reddy, K. K., Falck, J. R., & Roman, R. J. (1997). Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. *Hypertension*, 29(1 Pt 2), 320-325.
- Ambasta, R. K., Kumar, P., Griendling, K. K., Schmidt, H. H. H. W., Busse, R., & Brandes, R. P. (2004). Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45935-45941.
- Ambasta, R. K., Schreiber, J. G., Janiszewski, M., Busse, R., & Brandes, R. P. (2006). Nox1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(2), 193-201.
- Andrew, P. J., & Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 43(3), 521-531.
- Araujo, M., & Wilcox, C. S. (2014). Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(1), 74-101.
- Audoly, L. P., Ruan, X., Wagner, V. A., Goulet, J. L., Tilley, S. L., Koller, B. H., Coffman, T. M., & Arendshorst, W. J. (2001). Role of EP(2) and EP(3) PGE(2) receptors in control of murine renal hemodynamics. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 280(1), H327-H333.
- Avendaño, M. S., Lucas, E., Jurado-Pueyo, M., Martínez-Revelles, S., Vila-Bedmar, R., Mayor, F., Salaices, M., Briones, A. M., & Murga, C. (2014). Increased nitric oxide bioavailability in adult GRK2 hemizygous mice protects against angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, 63(2), 369-375.
- Baber, S. R., Champion, H. C., Bivalacqua, T. J., Hyman, A. L., & Kadowitz, P. J. (2003). Role of cyclooxygenase-2 in the generation of vasoactive prostanoids in the rat pulmonary and systemic vascular beds. *Circulation*, 108(7), 896-901.

- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 42–47.
- Bacon, C. R., Cary, N. R., & Davenport, A. P. (1996). Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circulation Research*, 79(4), 794–801.
- Badr, K. F., DeBoer, D. K., Schwartzberg, M., & Serhan, C. N. (1989). Lipoxin A4 antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: evidence for competition at a common receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(9), 3438–3442.
- Bakker, W., Eringa, E. C., Sipkema, P., & Van Hinsbergh, V. W. M. (2009). Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell and Tissue Research*, 335(1), 165–189.
- Banting, J. D., Friberg, P., & Adams, M. A. (1996). Acute hypertension after nitric oxide synthase inhibition is mediated primarily by increased endothelin vasoconstriction. *Journal of Hypertension*, 14(8), 975–981.
- Barrett, K. E., Cloutier, M. M., Koeppen, B. M., Lang, E. J., Pappano, A. J., Raybould, H. E., Rubinson, K., Stanton, B. A., Thrall, R. S., Watras, J. M., & White, B. A. (2010). *Berne y Levy Fisiología*. (B. M. Koeppen & B. A. Stanton, Eds.) (Sixth). Barcelona, España: ELSEVIER MOSBY.
- Basu, A., Charkoudian, N., Schrage, W., Rizza, R. a, Basu, R., & Joyner, M. J. (2007). Beneficial effects of GLP-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293(5), E1289–E1295.
- Bauer, V., & R. Sotníková. (2010). Nitric oxide – the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *General Physiology and Biophysics*, 29(4), 319–340.
- Bayraktutan, U., Blayney, L., & Shah, A. M. (2000). Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(8), 1903–1911.
- Beck, K. F., Eberhardt, W., Walpen, S., Apel, M., & Pfeilschifter, J. (1998). Potentiation of nitric oxide synthase expression by superoxide in interleukin 1 beta-stimulated rat mesangial cells. *FEBS Letters*, 435(1), 35–38.
- Beisswenger, P. J., Healy, J. C., & Shultz, E. K. (1993). Glycosylated serum proteins and glycosylated hemoglobin in the assessment of glycemic control in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 42(8), 989–992.
- Bernardo, A., Levi, G., & Minghetti, L. (2000). Role of the peroxisome proliferator-Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *European Journal of Neuroscience*, 12(7), 2215–2223.
- Beyer, A. M., Raffai, G., Weinberg, B. D., Fredrich, K., Rodgers, M. S., Geurts, A. M., Jacob, H. J., Dwinell, M. R., & Lombard, J. H. (2014). Amelioration of salt-induced

- vascular dysfunction in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive rats by missense mutation of extracellular superoxide dismutase. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(3), H339–H347.
- Blanco-Rivero, J., Cachofeiro, V., Lahera, V., Aras-Lopez, R., Márquez-Rodas, I., Salaiques, M., Xavier, F. E., Ferrer, M., & Balfagón, G. (2005). Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 46(1), 107–112.
- Block, K., Eid, A., Griendling, K. K., Lee, D. Y., Wittrant, Y., & Gorin, Y. (2008). Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 24061–24076.
- Boedtker, E., Praetorius, J., Matchkov, V. V., Stankevicius, E., Mogensen, S., Füchtbauer, A. C., Simonsen, U., Füchtbauer, E. M., & Aalkjaer, C. (2011). Disruption of Na<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBCn1 (slc4a7) inhibits NO-mediated vasorelaxation, smooth muscle Ca<sup>2+</sup> sensitivity, and hypertension development in mice. *Circulation*, 124(17), 1819–1829.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biology*, 11(2), 66–75.
- Böhler, T., Waiser, J., Hepburn, H., Gaedeke, J., Lehmann, C., Hambach, P., Budde, K., & Neumayer, H. H. (2000). TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine*, 12(7), 986–991.
- Bokoch, G. M., & Zhao, T. (2006). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1533–1548.
- Bond, B., Gates, P. E., Jackman, S. R., Corless, L. M., Williams, C. a, & Barker, a R. (2015). Exercise intensity and the protection from postprandial vascular dysfunction in adolescents. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(11), H1443–H1450.
- Bonventre, J. V. (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 43(5), 1160–1178.
- Bos, C. L., Richel, D. J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M. P., & Versteeg, H. H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(7), 1187–1205.
- Boulanger, C. M., Morrison, K. J., & Vanhoutte, P. M. (1994). Mediation by M3-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *British Journal of Pharmacology*, 112(2), 519–524.
- Brash, A. R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23679–23682.
- Breyer, M. D., & Breyer, R. M. (2000a). Prostaglandin E receptors and the kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 279(1), F12–F23.

- Breyer, M. D., & Breyer, R. M. (2000b). Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 9(1), 23–29.
- Brodsky, S. V., Gao, S., Li, H., & Goligorsky, M. S. (2002). Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283(5), H2130–H2139.
- Brown, G. C. (1995). Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Letters*, 369(2–3), 136–139.
- Brown, N. K., Zhou, Z., Zhang, J., Zeng, R., Wu, J., Eitzman, D. T., Chen, Y. E., & Chang, L. (2014). Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: A review of current research and animal models. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(8), 1621–1630.
- Burgoyne, J. R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R. L., Brennan, J. P., Schröder, E., Browning, D. D., & Eaton, P. (2007). Cysteine redox sensor in PKG $\alpha$  enables oxidant-induced activation. *Science*, 317(5843), 1393–1397.
- Burgoyne, J. R., Oka, S., Ale-Agha, N., & Eaton, P. (2013). Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(9), 1042–1052.
- Busse, R., Edwards, G., Félétou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P. M., & Weston, A. H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(8), 374–380.
- Büssemaker, E., Popp, R., Binder, J., Busse, R., & Fleming, I. (2003). Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human interlobar artery. *Kidney International*, 63(5), 1749–1755.
- Cachofeiro, V., Goicochea, M., De Vinuesa, S. G., Oubiña, P., Lahera, V., & Luño, J. (2008). Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney International*, S4–S9.
- Cai, H. (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research*, 68(1), 26–36.
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87(10), 840–844.
- Campbell, W. B., & Fleming, I. (2010). Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflügers Archiv*, 459(6), 881–895.
- Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., & Harder, D. R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation Research*, 78(3), 415–423.
- Cao, J., Peterson, S. J., Sodhi, K., Vanella, L., Barbagallo, I., Rodella, L. F., Schwartzman, M. L., Abraham, N. G., & Kappas, A. (2012). Heme oxygenase gene targeting to adipocytes attenuates adiposity and vascular dysfunction in mice fed a high-fat diet. *Hypertension*, 60(2), 467–475.
- Capdevila, J. H., & Falck, J. R. (2001). The CYP P450 arachidonic acid monooxygenases:

- from cell signaling to blood pressure regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(3), 571–576.
- Cardillo, C., Campia, U., Iantorno, M., & Panza, J. A. (2004). Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension*, 43(1), 36–40.
- Carey, R. M. (2013). Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 62(5), 818–822.
- Carlström, M., Lai, E. Y., Ma, Z., Steege, A., Patzak, A., Eriksson, U. J., Lundberg, J. O., Wilcox, C. S., & Persson, A. E. (2010). SOD1 limits renal microvascular remodeling and attenuates arteriole and blood pressure responses to angiotensin II via modulation of nitric oxide bioavailability. *Hypertension*, 56(5), 907–913.
- Carrizzo, A., Puca, A., Damato, A., Marino, M., Franco, E., Pompeo, F., Traficante, A., Civitillo, F., Santini, L., Trimarco, V., & Vecchione, C. (2013). Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*, 62(2), 359–366.
- Cave, A. C., Brewer, A. C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D. J., Walker, S., & Shah, A. M. (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5–6), 691–728.
- Cechova, S., Zeng, Q., Billaud, M., Mutchler, S., Rudy, C. K., Straub, A. C., Chi, L., Chan, F. R., Hu, J., Griffiths, R., Howell, N. L., Madsen, K., Jensen, B. L., Palmer, L. A., Carey, R. M., Sung, S. S. J., Malakauskas, S. M., Isakson, B. E., & Le, T. H. (2013). Loss of collectrin, an angiotensin-converting enzyme 2 homolog, uncouples endothelial nitric oxide synthase and causes hypertension and vascular dysfunction. *Circulation*, 128(16), 1770–1780.
- Chabrashvili, T., Tojo, A., Onozato, M. L., Kitiyakara, C., Quinn, M. T., Fujita, T., Welch, W. J., & Wilcox, C. S. (2002). Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*, 39(2), 269–274.
- Chai, Q., Lu, T., Wang, X. L., & Lee, H. C. (2015). Hydrogen sulfide impairs shear stress-induced vasodilation in mouse coronary arteries. *Pflügers Archiv*, 467(2), 329–340.
- Chai, Q., Wang, X. L., Zeldin, D. C., & Lee, H. C. (2013). Role of caveolae in shear stress-mediated endothelium-dependent dilation in coronary arteries. *Cardiovascular Research*, 100(1), 151–159.
- Chan, M. V., Bubb, K. J., Noyce, A., Villar, I. C., Duchene, J., Hobbs, A. J., Scotland, R. S., & Ahluwalia, A. (2012). Distinct endothelial pathways underlie sexual dimorphism in vascular auto-regulation. *British Journal of Pharmacology*, 167(4), 805–817.
- Chander, P. N., Gealekman, O., Brodsky, S. V., Elitok, S., Tojo, A., Crabtree, M., Gross, S. S., & Goligorsky, M. S. (2004). Nephropathy in Zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger ebselen. *Journal of the American Society of*

- Nephrology*, 15(9), 2391–2403.
- Chandra, S., Romero, M. J., Shatanawi, A., Alkilany, A. M., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2012). Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), 506–519.
- Charakida, M., De Groot, E., Loukogeorgakis, S. P., Khan, T., Lü scher, T., Kastelein, J. J., Gasser, T., & Deanfield, J. E. (2013). Variability and reproducibility of flow-mediated dilatation in amulticentre clinical trial. *European Heart Journal*, 34(45), 3501–3507.
- Chatziantoniou, C., & Arendshorst, W. J. (1992a). Prostaglandin interactions with angiotensin, norepinephrine, and thromboxane in rat renal vasculature. *American Journal of Physiology*, 262(1 Pt 2), F68–F76.
- Chatziantoniou, C., & Arendshorst, W. J. (1992b). Renal vascular reactivity to vasodilator prostaglandins in genetically hypertensive rats. *American Journal of Physiology*, 262(1 Pt 2), F124–F130.
- Chaudhari, A., Gupta, S., & Kirschenbaum, M. A. (1990). Biochemical evidence for PGI<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> receptors in the rabbit renal preglomerular microvasculature. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1053(2–3), 156–161.
- Chaytor, A. T., Edwards, D. H., Bakker, L. M., & Griffith, T. M. (2003). Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15212–15217.
- Chen, J. K., Falck, J. R., Reddy, K. M., Capdevila, J., & Harris, R. C. (1998). Epoxyeicosatrienoic acids and their sulfonimide derivatives stimulate tyrosine phosphorylation and induce mitogenesis in renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 29254–29261.
- Cheng, A. M., Rizzo-DeLeon, N., Wilson, C. L., Lee, W. J., Tateya, S., Clowes, A. W., Schwartz, M. W., & Kim, F. (2014). Vasodilator-stimulated phosphoprotein protects against vascular inflammation and insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 307(7), E571–E579.
- Cheng, G., & Lambeth, J. D. (2005). Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. *Gene*, 356, 118–126.
- Cheng, H.-F., Wang, C. J., Moeckel, G. W., Zhang, M.-Z., McKanna, J. A., & Harris, R. C. (2002). Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney International*, 62(3), 929–939.
- Cheng, H. F., & Harris, R. C. (2004). Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension*, 43(3), 525–530.
- Cheng, H., Wang, H., Fan, X., Pauksakon, P., & Harris, R. C. (2012b). Improvement of endothelial nitric oxide synthase activity retards the progression of diabetic

- nephropathy in db/db mice. *Kidney International*, 82(11), 1176–1183.
- Cheng, J., Garcia, V., Ding, Y., Wu, C. C., Thakar, K., Falck, J. R., Ramu, E., & Schwartzman, M. L. (2012a). Induction of angiotensin-converting enzyme and activation of the renin-angiotensin system contribute to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1917–1924.
- Cheng, M. K., Doumad, A. B., Jiang, H., Falck, J. R., McGiff, J. C., & Carroll, M. A. (2004). Epoxyeicosatrienoic acids mediate adenosine-induced vasodilation in rat preglomerular microvessels (PGMV) via A2A receptors. *British Journal of Pharmacology*, 141(3), 441–448.
- Chiasson, V. L., Munshi, N., Chatterjee, P., Young, K. J., & Mitchell, B. M. (2011). Pin1 deficiency causes endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension*, 58(3), 431–438.
- Chidgey, J., Fraser, P. A., & Aaronson, P. I. (2016). Reactive oxygen species facilitate the EDH response in arterioles by potentiating intracellular endothelial Ca<sup>2+</sup> release. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 274–284.
- Chuaiphichai, S., McNeill, E., Douglas, G., Crabtree, M. J., Bendall, J. K., Hale, A. B., Alp, N. J., & Channon, K. M. (2014). Cell-autonomous role of endothelial GTP cyclohydrolase 1 and tetrahydrobiopterin in blood pressure regulation. *Hypertension*, 64(3), 530–540.
- Cohen, C. D., Gröne, H. J., Gröne, E. F., Nelson, P. J., Schlöndorff, D., & Kretzler, M. (2002). Laser microdissection and gene expression analysis on formaldehyde-fixed archival tissue. *Kidney International*, 61(1), 125–132.
- Corry, D. B., & Tuck, M. L. (2006). Uric acid and the vasculature. *Current Hypertension Reports*, 8(2), 116–119.
- Cosentino, F., Sill, J. C., & Katusic, Z. S. (1994). Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension*, 23(2), 229–235.
- Costa, T. J., Ceravolo, G. S., dos Santos, R. a, de Oliveira, M. A., Araújo, P. X., Giaquinto, L. R., Tostes, R. C., Akamine, E. H., Fortes, Z. B., Dantas, A. P., & Carvalho, M. H. C. (2015). Association of testosterone with estrogen abolishes the beneficial effects of estrogen treatment by increasing ROS generation in aorta endothelial cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(7), H723–H732.
- Cowley, A. W., Abe, M., Mori, T., O'Connor, P. M., Ohsaki, Y., & Zheleznova, N. N. (2015). Reactive oxygen species as important determinants of medullary flow, sodium excretion and hypertension. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 308(3), F179–F197.
- Crabtree, M. J., Smith, C. L., Lam, G., Goligorsky, M. S., & S, S. (2008). Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 294(4), H1530–H1540.

- Crea, F., Lanza, G. A., & Camici, P. G. (2014). Physiology of coronary microcirculation. In F. Crea, G. A. Lanza, & P. G. Camici (Eds.), *Coronary Microvascular Dysfunction* (pp. 3–30). Milan, Italia: Springer.
- Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L. M., Persechini, P. M., & Ojcius, D. M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2871–2879.
- Dantas, A. P., Franco, M. C., Silva-Antonialli, M. M., Tostes, R. C., Fortes, Z. B., Nigro, D., & Carvalho, M. H. (2004). Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovascular Research*, 61(1), 22–29.
- Davies, P. F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological Reviews*, 75(3), 519–560.
- Davies, P. F., Civelek, M., Fang, Y., & Fleming, I. (2013). The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovascular Research*, 99(2), 315–327.
- Day, B. J. (2009). Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochemistry Pharmacology*, 77(3), 285–296.
- De Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D., & Vane, J. R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9797–9800.
- De Vries, A. P., Ruggenenti, P., Ruan, X. Z., Praga, M., Cruzado, J. M., Bajema, I. M., D'Agati, V. D., Lamb, H. J., Pongrac Barlovic, D., Hojs, R., Abbate, M., Rodriguez, R., Mogensen, C. E., & Porrini, E. (2014). Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. *Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 2(5), 417–426.
- De Wit, C., & Griffith, T. M. (2010). Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. *Pflugers Archiv*, 459(6), 897–914.
- De Zeeuw, P., Wong, B. W., & Carmeliet, P. (2015). Metabolic adaptations in diabetic endothelial cells. *Circulation Journal*, 79(5), 934–941.
- Deisseroth, A., & Dounce, A. L. (1970). Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews*, 50(3), 319–375.
- DeLano, F. A., Parks, D. A., Ruedi, J. M., Babior, B. M., & Schmid-Schönbein, G. W. (2006). Microvascular display of xanthine oxidase and NADPH oxidase in the spontaneously hypertensive rat. *Microcirculation*, 13(7), 551–566.
- Dey, A., Maric, C., Kaesemeyer, W. H., Zaharis, C. Z., Stewart, J., Pollock, J. S., & Imig, J. D. (2004a). Rofecoxib decreases renal injury in obese Zucker rats. *Clinical Science*,

- 107(6), 561–570.
- Dey, A., Williams, R. S., Pollock, D. M., Stepp, D. W., Newman, J. W., Hammock, B. D., & Imig, J. D. (2004b). Altered kidney CYP2C and cyclooxygenase-2 levels are associated with obesity-related albuminuria. *Obesity Research*, 12(8), 1278–1289.
- Ding, G., Zhang, A., Huang, S., Pan, X., Zhen, G., Chen, R., & Yang, T. (2007). ANG II induces c-Jun NH2-terminal kinase activation and proliferation of human mesangial cells via redox-sensitive transactivation of the EGFR. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 293(6), F1889–F1897.
- Ding, L., & Zhang, J. (2012). Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(1), 75–81.
- Dong, J., Wong, S. L., Lau, C. W., Lee, H. K., Ng, C. F., Zhang, L., Yao, X., Chen, Z. Y., Vanhoutte, P. M., & Huang, Y. (2012). Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *European Heart Journal*, 33(23), 2980–2990.
- Dong, Z., Chai, W., Wang, W., Zhao, L., Fu, Z., Cao, W., & Liu, Z. (2013). Protein kinase A mediates glucagon-like peptide 1-induced nitric oxide production and muscle microvascular recruitment. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 304(2), E222–E228.
- Dreieicher, E., Beck, K. F., Lazaroski, S., Boosen, M., Tsalastra-Greul, W., Beck, M., Fleming, I., Schaefer, L., & Pfeilschifter, J. (2009). Nitric oxide inhibits glomerular TGF-beta signaling via SMOC-1. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(9), 1963–1974.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Du, J., Fan, L. M., Mai, A., & Li, J. M. (2013). Crucial roles of Nox2-derived oxidative stress in deteriorating the function of insulin receptors and endothelium in dietary obesity of middle-aged mice. *British Journal of Pharmacology*, 170(5), 1064–1077.
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., & Simon, L. S. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB Journal*, 12(12), 1063–1073.
- Dudzinski, D. M., Iqarashi, J., Greif, D., & Michel, T. (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annual Review of Pharmacological and Toxicology*, 46, 235–276.
- Ebenezer, P. J., Marianppan, N., Elks, C., Haque, M., & J. Francis. (2009). Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic tempol. *Obesity (Silver Spring)*, 17(11), 1994–2002.
- Eberhardt, W., Kunz, D., Hummel, R., & Pfeilschifter, J. (1996). Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223(3), 752–756.
- Ebrahimian, T., & Touyz, R. M. (2008). Thioredoxin in vascular biology: role in hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(6), 1127–1136.

- Edwards, D. H., Li, Y., & Griffith, T. M. (2008). Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(10), 1774–1781.
- Egan, K. M., Lawson, J. A., Fries, S., Koller, B., Rader, D. J., Smyth, E. M., & Fitzgerald, G. A. (2004). COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science*, 306(5703), 1954–1957.
- Ellinsworth, D. C. (2015). Arsenic, reactive oxygen, and endothelial dysfunction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(3), 458–464.
- Ellinsworth, D. C., Sandow, S. L., Shukla, N., Liu, Y., Jeremy, J. Y., & Gutterman, D. D. (2016). Endothelium-derived hyperpolarization and coronary vasodilation: diverse and integrated roles of epoxyeicosatrienoic acids, hydrogen peroxide, and gap junctions. *Microcirculation*, 23(1), 15–32.
- Ellinsworth, D. C., Shukla, N., Fleming, I., & Jeremy, J. Y. (2014). Interactions between thromboxane A<sub>2</sub>, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovascular Research*, 102(1), 9–16.
- Elmarakby, A. A., & Imig, J. D. (2010). Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diet hypertensive rats. *Clinical Science*, 118(4), 291–301.
- Erdei, N., Tóth, A., Pásztor, E., Papp, Z., Edes, I., Koller, A., & Bagi, Z. (2006). High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 291(5), H2107–H2115.
- Estrada, I. a, Donthamsetty, R., Debski, P., Zhou, M.-H., Zhang, S. L., Yuan, J. X.-J., Han, W., & Makino, A. (2012). STIM1 restores coronary endothelial function in type 1 diabetic mice. *Circulation Research*, 111(9), 1166–75.
- Evora, P. R., Cable, D. G., Chua, Y. L., Rodrigues, A. J., Pearson, P. J., & Schaff, H. V. (2007). Nitric oxide and prostacyclin-dependent pathways involvement on in vitro induced hypothermia. *Cryobiology*, 54(1), 106–113.
- Facemire, C. S., Nixon, A. B., Griffiths, R., Hurwitz, H., & Coffman, T. M. (2009). Vascular endothelial growth factor receptor 2 (Vegfr2) controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression. *Hypertension*, 54(3), 652–658.
- Fang, X., Kaduce, T. L., Weintraub, N. L., Harmon, S., Teesch, L. M., Morisseau, C., Thompson, D. A., Hammock, B. D., & Spector, A. A. (2001). Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14867–14874.
- Faraci, F. M., & Didion, S. P. (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), 1367–1373.
- Feher, A., Cassuto, J., Szabo, A., Patel, V., Vinayak Kamath, M., & Bagi, Z. (2013). Increased tissue angiotensin-converting enzyme activity impairs bradykinin-induced dilation of coronary arterioles in obesity. *Circulation Journal*, 77(7), 1867–

1876.

- Félétou, M., Huang, Y., & Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British Journal of Pharmacology*, 164(3), 894–912.
- Félétou, M., & Vanhoutte, P. M. (2006). Endothelial dysfunction : a multifaceted disorder. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), H985–H1002.
- Feng, J., Damrauer, S. M., Lee, M., Sellke, F. W., Ferran, C., & Abid, M. R. (2010). Endothelium-dependent coronary vasodilatation requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(9), 1703–1710.
- Feron, O., & Balligand, J. L. (2006). Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovascular Research*, 69(4), 788–797.
- Filipe, C., Lam Shang Leen, L., Brouchet, L., Billon, A., Benouaich, V., Fontaine, V., Gourdy, P., Lenfant, F., Arnal, J.-F., Gadeau, A.-P., & Laurell, H. (2008). Estradiol accelerates endothelial healing through the retrograde commitment of uninjured endothelium. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 294(6), H2822–H2830.
- Fisslthaler, B., Benzing, T., Busse, R., & Fleming, I. (2003). Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. *Nitric Oxide*, 8(4), 253–261.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., & Busse, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 401(6752), 493–497.
- FitzGerald, G. A. (2003). COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(11), 879–890.
- FitzGerald, G. A., & Loll, P. (2001). COX in a crystal ball: current status and future promise of prostaglandin research. *Journal of Clinical Investigation*, 107(11), 1335–1337.
- Fleming, I. (2015). Translating GWAS into the flow-regulated modulation of lipid mediator signaling. *Circulation Research*, 117(4), 302–304.
- Fleming, I., Michaelis, U. R., Bredenkötter, D., Fisslthaler, B., Brandes, R. P., Busse, R., & Dehghani, F. (2001). Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circulation Research*, 88(1), 44–51.
- Folz, R. J., Guan, J., Seldin, M. F., Oury, T. D., Enghild, J. J., & Crapo, J. D. (1997). Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17(4), 393–403.
- Forbes, J. M., Coughlan, M. T., & Cooper, M. E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*, 57(6), 1446–1454.

- Förstermann, U., & Li, H. (2011). Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *British Journal of Pharmacology*, 164(2), 213–223.
- Fraga-Silva, R. A., Costa-Fraga, F. P., Murça, T. M., Moraes, P. L., Martins Lima, A., Lautner, R. Q., Castro, C. H., Soares, C. M. A., Borges, C. L., Nadu, A. P., Oliveira, M. L., Shenoy, V., Katovich, M. J., Santos, R. A. S., Raizada, M. K., & Ferreira, A. J. (2013). Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension*, 61(6), 1233–1238.
- Freed, J. K., Breyer, A. M., LoGiudice, J. A., Hockenberry, J. C., & Gutterman, D. D. (2014). Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. *Circulation Research*, 115(5), 525–532.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515–18517.
- Fujii, S., Zhang, L., & Kosaka, H. (2007). Albuminuria, expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and monocyte chemoattractant protein-1 in the renal tubules of hypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research*, 30(10), 991–998.
- Fujimoto, S., Satoh, M., Horike, H., & Hatta, H. (2008). Olmesartan ameliorates progressive glomerular injury in subtotal nephrectomized rats through suppression of superoxide production. *Hypertension*, 31(2), 305–313.
- Fukai, T. (2009). Mitochondrial thioredoxin: novel regulator for NADPH oxidase and angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, 54(2), 224–225.
- Funk, C. D., Keeney, D. S., Oliw, E. H., Boeglin, W. E., & Brash, A. R. (1996). Functional expression and cellular localization of a mouse epidermal lipoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23338–23344.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–376.
- Furieri, L. B., Galán, M., Avendaño, M. S., García-Redondo, A. B., Aguado, A., Martínez, S., Cachofeiro, V., Bartolomé, M. V., Alonso, M. J., Vassallo, D. V., & Salices, M. (2011). Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. *British Journal of Pharmacology*, 162(8), 1819–1831.
- Galili, O., Versari, D., Sattler, K. J. K., Olson, M. L., Mannheim, D., McConnell, J. P., Chade, A. R., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2007). Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(2), H904–H911.
- Gao, S., Chen, J., Brodsky, S. V., Huang, H., Adler, S., Lee, J. H., Dhadwal, N., Cohen-Gould, L., Gross, S. S., & Goligorsky, M. S. (2004). Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 279(16), 15968–15974.
- Gao, Y. J., Takemori, K., Su, L. Y., An, W. S., Lu, C., Sharma, A. M., & Lee, R. M. K. W. (2006). Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovascular Research*, 71(2), 363–373.
- Gao, Y., & Lee, R. (2005). Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *British Journal of Pharmacology*, 146(8), 1061–1068.
- García-Redondo, A. B., Briones, A. M., Beltrán, A. E., Alonso, M. J., Simonsen, U., & Salices, M. (2009). Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, and superoxide anion levels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(1), 19–27.
- Garland, C. J., Hiley, C. R., & Dora, K. A. (2011). EDHF: spreading the influence of the endothelium. *British Journal of Pharmacology*, 164(3), 839–852.
- Gauer, S., Hauser, I. A., Obermüller, N., Holzmann, Y., Geiger, H., & Goppelt-Struebe, M. (2008). Synergistic induction of osteopontin by aldosterone and inflammatory cytokines in mesangial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(2), 615–623.
- Geiszt, M. (2006). NADPH oxidases: New kids on the block. *Cardiovascular Research*, 71(2), 289–299.
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P., & Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8010–8014. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gendron, M. E., Thorin-Trescases, N., Villeneuve, L., & Thorin, E. (2007). Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(1), H451–H458.
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2006). Arginine/arginase NO NO NO. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(2), 237–239.
- Gleyzer, N., Vercauteren, K., & Scarpulla, R. C. (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and Cellular Biology*, 25(4), 1354–1366.
- Gluais, P., Lonchamp, M., Morrow, J. D., Vanhoutte, P. M., & Feletou, M. (2005). Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *British Journal of Pharmacology*, 146(6), 834–845.
- Goligorsky, M. S., Brodsky, S. V., & Noiri, E. (2002). Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney International*, 61(3), 855–861.
- Goligorsky, M. S., Morgan, M. A., Lyubsky, S., Gross, R. W., Adams, D. T., & Spitz, D. R. (1993). Establishment of a hydrogen peroxide resistant variant of renal tubular epithelial cells: role of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in cell damage.

- Archives of Biochemistry and Biophysics*, 301(1), 119–128.
- Gollasch, M. (2012). Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 633–642.
- Gongora, M. C., Qin, Z., Laude, K., Kim, H. W., McCann, L., Folz, J. R., Dikalov, S., Fukai, T., & Harrison, D. G. (2006). Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension*, 48(3), 473–481.
- Gordish, K. L., & Beierwaltes, W. H. (2014). Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 306(5), F542–F550.
- Gorin, Y., Ricono, J. M., Kim, N.-H., Bhandari, B., Choudhury, G. G., & Abboud, H. E. (2003). Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 285(2), F219–F229.
- Goyal, P., Weissmann, N., Grimminger, F., Hegel, C., Bader, L., Rose, F., Fink, L., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Schmidt, H. H., Seeger, W., & Hänze, J. (2004). Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1279–1288.
- Griendling, K. K. (2006). NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1443–1445.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., Lasse, B., & Ushio-fukai, M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(10), 2175–2183.
- Guo, W. T., & Dong, D. L. (2014). Bone morphogenetic protein-4: a novel therapeutic target for pathological cardiac hypertrophy/heart failure. *Heart Failure Reviews*, 19(6), 781–788.
- Guzy, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., Simon, M. C., Hammerling, U., & Schumacker, P. T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism*, 1(6), 401–408.
- Ha, H., & Lee, H. B. (2000). Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney International Supplement*, 77, S19–S25.
- Halcox, J. P. J., Nour, K. R. A., Zalos, G., & Quyyumi, A. A. (2007). Endogenous endothelin in human coronary vascular function: differential contribution of endothelin receptor types A and B. *Hypertension*, 49(5), 1134–1141.
- Halcox, J. P. J., Schenke, W. H., Zalos, G., Mincemoyer, R., Prasad, A., Waclawiw, M. A., Nour, K. R. A., & Quyyumi, A. A. (2002). Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*, 106(6), 653–658.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Hamilton, C., Brosnan, M. J., McIntyre, M., Graham, D., & Dominiczak, A. (2001). Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*, 37(2), 529–534.
- Hao, C.-M., & Breyer, M. D. (2008). Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annual Review of Physiology*, 70, 357–377.
- Hao, C. M., Redha, R., Morrow, J., & Breyer, M. D. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation promotes cell survival following hypertonic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21341–21345.
- Hao, X., Chen, J., Luo, Z., He, H., Yu, H., Ma, L., Ma, S., Zhu, T., Liu, D., & ZHU, Z. (2011). TRPV1 activation prevents high-salt diet-induced nocturnal hypertension in mice. *Pflugers Archiv*, 461(3), 345–353.
- Harris, R. C. (2008). An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 17(1), 64–69.
- Harrison, D. G., Widder, J., Grumbach, I., Chen, W., Weber, M., & Searles, C. (2006). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 259(4), 351–363.
- Hashemi, S. M., Mokhtari, S. M., Sadeghi, M., Foroozan, R., & Safari, M. (2015). Effect of vitamin D therapy on endothelial function in ischemic heart disease female patients with vitamin D deficiency or insufficiency: a primary report. *ARYA Atherosclerosis*, 11(1), 54–59.
- Hattori, Y., Akimoto, K., Gross, S. S., Hattori, S., & Kasai, K. (2005). Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats. *Diabetologia*, 48(6), 1066–1074.
- Hayashi, K., Kanda, T., Homma, K., Tokuyama, H., Okubo, K., Takamatsu, I., Tatematsu, S., Kumagai, H., & Saruta, T. (2002). Altered renal microvascular response in Zucker obese rats. *Metabolism*, 51(12), 1553–1561.
- Hayashi, K., Loutzenhiser, R., & Epstein, M. (1997). Direct evidence that thromboxane mimetic preferentially constricts the afferent arteriole. *Journal of the American Society of Nephrology*, 8(1), 25–31.
- Heil, S. G., Vriese, A. S. De, Kluijtmans, L. A., Mortier, S., Heijer, M. Den, & Blom, H. J. (2004). The role of hyperhomocysteinemia in nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated vasodilatation. *Cellular and Molecular Biology*, 50(8), 911–916.
- Hendrickson, R. J., Cappadona, C., Yankah, E. N., Sitzmann, J. V., Cahill, P. A., & Redmond, E. M. (1999). Sustained pulsatile flow regulates endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in co-cultured vascular endothelial and smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31(3), 619–629.
- Herschman, H. R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1299(1), 125–140.

- Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R. S., Kretzler, M., Cohen, C. D., Eckardt, K. U., Iwano, M., & Haase, V. H. (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3810–3820.
- Hirao, A., Kondo, K., Takeuchi, K., Inui, N., Umemura, K., Ohashi, K., & Watanabe, H. (2008). Cyclooxygenase-dependent vasoconstricting factor(s) in remodelled rat femoral arteries. *Cardiovascular Research*, 79(1), 161–168.
- Holterman, C. E., Thibodeau, J. F., & Kennedy, C. R. (2015). NADPH oxidase 5 and renal disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(1), 81–87.
- Hong, H. J., Hsiao, G., Cheng, T. H., & Yen, M. H. (2001). Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 38(5), 1044–1048.
- Hool, L. C., & Corry, B. (2007). Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(4), 409–435.
- Hu, Q., Zheng, G., Zweier, J. L., Deshpande, S., Irani, K., & Ziegelstein, R. C. (2000). NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *Biochemistry*, 275(21), 15749–15757.
- Hua, P., Feng, W., Rezonzew, G., Chumley, P., & Jaimes, E. A. (2012). The transcription factor ETS-1 regulates angiotensin II-stimulated fibronectin production in mesangial cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 302(11), F1418–F1429.
- Huang, P. L. (2009). eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(6), 295–302.
- Husain, S., Andrews, N. P., Mulcahy, D., Panza, J. A., & Quyyumi, A. A. (1998). Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 97(8), 716–720.
- Hwang, I., Lee, J., Huh, J. Y., Park, J., Lee, H. B., Ho, Y. S., & Ha, H. (2012). Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes*, 61(3), 728–738.
- Iacobini, C., Menini, S., Ricci, C., Scipioni, A., Sansoni, V., Mazzitelli, G., Cordone, S., Pesce, C., Pugliese, F., Pricci, F., & Pugliese, G. (2009). Advanced lipoxidation end-products mediate lipid-induced glomerular injury: role of receptor-mediated mechanisms. *Journal of Pathology*, 218(3), 360–369.
- Iglesias-De La Cruz, M. C., Ruiz-Torres, P., Alcamí, J., Díez-Marqués, L., Ortega-Velázquez, R., Chen, S., Rodríguez-Puyol, M., Ziyadeh, F. N., & Rodríguez-Puyol, D. (2001). Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- $\beta$  in human mesangial cells. *Kidney International*, 59(1), 87–95.
- Imig, J. D. (2000a). Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 279(6), F965–F981.

- Imig, J. D. (2000b). Epoxygenase metabolites. Epithelial and vascular actions. *Molecular Biotechnology*, 16(3), 233–251.
- Imig, J. D. (2005). Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 289(3), F496–F503.
- Imig, J. D. (2006). Eicosanoids and renal vascular function in diseases. *Clinical Science*, 111(1), 21–34.
- Imig, J. D. (2013). Epoxyeicosatrienoic acids, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, and renal microvascular function. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 104–105, 2–7.
- Imig, J. D. (2015). Epoxyeicosatrienoic acids, hypertension, and kidney injury. *Hypertension*, 65(3), 476–482.
- Imig, J. D., Breyer, M. D., & Breyer, R. M. (2002a). Contribution of prostaglandin EP(2) receptors to renal microvascular reactivity in mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 283(3), F415–22.
- Imig, J. D., & Deichmann, P. C. (1997). Afferent arteriolar responses to ANG II involve activation of PLA2 and modulation by lipoxygenase and P-450 pathways. *American Journal of Physiology*, 273(2 Pt 2), F274–F282.
- Imig, J. D., Dimitropoulou, C., Reddy, D. S., White, R. E., & Falck, J. R. (2008). Afferent arteriolar dilation to 11, 12-EET analogs involves PP2A activity and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Microcirculation*, 15(2), 137–150.
- Imig, J. D., Falck, J. R., Wei, S., & Capdevilla, J. H. (2001a). Epoxygenase metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent arteriolar vasodilation in response to bradykinin. *Journal of Vascular Research*, 38(3), 247–255.
- Imig, J. D., Inscho, E. W., Deichmann, P. C., Reddy, K. M., & Falck, J. R. (1999). Afferent arteriolar vasodilation to the sulfonimide analog of 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid involves protein kinase A. *Hypertension*, 33(1 Pt 2), 408–413.
- Imig, J. D., Navar, L. G., Roman, R. J., Reddy, K. K., & Falck, J. R. (1996b). Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature. *Journal of the American Society of Nephrology*, 7(11), 2364–2370.
- Imig, J. D., Pham, B. T., LeBlanc, E. A., Reddy, K. M., Falck, J. R., & Inscho, E. W. (2000). Cytochrome P450 and cyclooxygenase metabolites contribute to the endothelin-1 afferent arteriolar vasoconstrictor and calcium responses. *Hypertension*, 35(1 Pt 2), 307–312.
- Imig, J. D., Zhao, X., Capdevila, J. H., Morisseau, C., & Hammock, B. D. (2002b). Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension*, 39(2 II), 690–694.
- Imig, J. D., Zhao, X., Falck, J. R., Wei, S., & Capdevila, J. H. (2001b). Enhanced renal microvascular reactivity to angiotensin II in hypertension is ameliorated by the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Journal of Hypertension*, 19(5), 983–992.

- Imig, J. D., Zou, A. P., Montellano, P. R. O. de, Sui, Z., & Roman, R. J. (1994). Cytochrome P-450 inhibitors alter afferent arteriolar responses to elevations in pressure. *American Journal of Physiology*, 266(5), H1879–H1885.
- Imig, J. D., Zou, A. P., Stec, D. E., Harder, D. R., Falck, J. R., & Roman, R. J. (1996a). Formation and actions of 20-hydroxyecosatetraenoic acid in rat renal arterioles. *American Journal of Physiology*, 270(1 Pt 2), R217–R227.
- Imig, J., & Hammock, B. (2009). Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(10), 794–805.
- Insko, E. W., Cook, A. K., Imig, J. D., Vial, C., & Evans, R. J. (2003). Physiological role for P2X1 receptors in renal microvascular autoregulatory behavior. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1895–1905.
- Insko, E. W., Cook, A. K., & Navar, L. G. (1996). Pressure-mediated vasoconstriction of juxtamedullary afferent arterioles involves P2-purinoreceptor activation. *American Journal of Physiology*, 271(5 Pt 2), F1077–F1085.
- Iwama, Y., Kato, T., Muramatsu, M., Asano, H., Shimizu, K., Toki, Y., Miyazaki, Y., Okumura, K., Hashimoto, H., & Ito, T. (1992). Correlation with blood pressure of the acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension*, 19(4), 326–332. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1555864>
- Iwatani, Y., Kosugi, K., Isobe-Oku, S., Atagi, S., Kitamura, Y., & Kawasaki, H. (2008). Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. *British Journal of Pharmacology*, 154(1), 32–40.
- Jackson, M. J., Papa, S., Bolaños, J., Bruckdorfer, R., Carlsen, H., Elliott, R. M., Flier, J., Griffiths, H. R., Heales, S., Holst, B., Lorusso, M., Lund, E., Oivind Moskaug, J., Moser, U., Di Paola, M., Polidori, M. C., Signorile, A., Stahl, W., Viña-Ribes, J., et al. (2002). Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1–3), 209–285.
- Jacobson, H. R., Corona, S., Capdevila, J. H., Chacos, N., Manna, S., Womack, A., & Falck, J. R. (1985). Effects of epoxyecosatrienoic acids on ion transport in the rabbit cortical collecting tubule. In P. Braquet, R. P. Garay, J. C. Frohlich, & S. Nicosia (Eds.), *Prostaglandins, and Membrane Ion Transport*. (pp. 311–318). New York: Raven Press.
- Jakobsson, P. J., Thorén, S., Morgenstern, R., & Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), 7220–7225.
- Jamaluddin, M. S., Weakley, S. M., Yao, Q., & Chen, C. (2012). Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 622–632.
- Jamroz-Wiśniewska, A., Gertler, A., Solomon, G., Wood, M. E., Whiteman, M., & Beltowski, J. (2014). Leptin-induced endothelium-dependent vasorelaxation of peripheral arteries in lean and obese rats: role of nitric oxide and hydrogen

- sulfide. *PLoS ONE*, 9(1), e86744.
- Jang, H. J., Ridgeway, S. D., & Kim, J. A. (2013). Effects of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on high-fat diet-induced insulin resistance and endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(12), E1444–E1451.
- Jensen, B. L., Schmid, C., & A. Kurtz. (1996). Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology*, 271(3), F659–F669.
- Jiang, F., & Dusting, G. J. (2001). Endothelium-dependent vasorelaxation independent of nitric oxide and K(+) release in isolated renal arteries of rats. *British Journal of Pharmacology*, 132(7), 1558–1564.
- Jin, R. C., Voetsch, B., & Loscalzo, J. (2005). Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation*, 13(3), 247–258.
- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4–5), 340–352.
- Johnson, F. K., Johnson, R. a, Peyton, K. J., & Durante, W. (2005). Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(4), R1057–R1062.
- Kajiyama, M., Hirota, M., Inai, Y., Kiyooka, T., Morimoto, T., Iwasaki, T., Endo, K., Mohri, S., Shimizu, J., Yada, T., Ogasawara, Y., Naruse, K., Ohe, T., & Kajiyama, F. (2007). Impaired NO-mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(6), H2737–H2744.
- Kang, K.-T., Sullivan, J. C., Spradley, F. T., D'Uscio, L. V, Katusic, Z. S., & Pollock, J. S. (2011a). Antihypertensive therapy increases tetrahydrobiopterin levels and NO/cGMP signaling in small arteries of angiotensin II-infused hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 300(3), H718–H724.
- Kang, L. S., Chen, B., Reyes, R. A., LeBlanc, A. J., Teng, B., Mustafa, S. J., & Muller-Delp, J. M. (2011b). Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 300(6), 2105–2115.
- Karki, S., Farb, M. G., Ngo, D. T. M., Myers, S., Puri, V., Hamburg, N. M., Carmine, B., Hess, D. T., & Gokce, N. (2015). Forkhead box O-1 modulation improves endothelial insulin resistance in human obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(6), 1498–1506.
- Kassan, M., Choi, S. K., Galan, M., Lee, Y. H., Trebak, M., & Matrougui, K. (2014). Enhanced p22phox expression impairs vascular function through p38 and ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanisms in type 2 diabetic mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(7), H972–80.

- Katayama, S., Inaba, M., Maruno, Y., Omoto, A., Kawazu, S., Ishii, J., & Sawada, M. (1990). Increased renal TXA<sub>2</sub> synthesis in diabetes mellitus: simultaneous determination of urinary TXB<sub>2</sub> and 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 39(1), 47–51.
- Katoh, T., Takahashi, K., DeBoer, D. K., Serhan, C. N., & Badr, K. F. (1992). Renal hemodynamic actions of lipoxins in rats: a comparative physiological study. *American Journal of Physiology*, 263(3 Pt 2), F436–F442.
- Katusic, Z. S. (2007). Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I. *Circulation Research*, 101(7), 640–641.
- Katusic, Z. S., Shepherd, J. T., & Vanhoutte, P. M. (1987). Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries. *American Journal of Physiology*, 252(3 Pt 2), H671–H673.
- Katusic, Z. S., & Vanhoutte, P. M. (1989). Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *American Journal of Physiology*, 257(1 Pt 2), H33–H37.
- Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G., & Lambeth, J. D. (2005). Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31859–31869.
- Kieran, N. E., Maderna, P., & Godson, C. (2004). Lipoxins: potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease. *Kidney International*, 65(4), 1145–1154.
- Kim, H. J., Sato, T., Rodríguez-Iturbe, B., & Vaziri, N. D. (2011b). Role of intrarenal angiotensin system activation, oxidative stress, inflammation, and impaired nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 activity in the progression of focal glomerulosclerosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(3), 583–590.
- Kim, P., Schini, V. B., Sundt Jr., T. M., & Vanhoutte, P. M. (1992). Reduced production of cGMP underlies the loss of endothelium-dependent relaxations in the canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Circulation Research*, 70(2), 248–256.
- Kim, Y. H., Hwang, J. H., Noh, J. R., Gang, G. T., Kim, D. H., Son, H. Y., Kwak, T. H., Shong, M., Lee, I. K., & Lee, C. H. (2011a). Activation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase ameliorates spontaneous hypertension in an animal model via modulation of eNOS activity. *Cardiovascular Research*, 91(3), 519–527.
- Kimura, S., Zhang, G. X., Nishiyama, A., Shokoji, T., Yao, L., Fan, Y. Y., Rahman, M., & Abe, Y. (2005). Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension*, 45(3), 438–444.
- Kinlay, S., Behrendt, D., Wainstein, M., Beltrame, J., Fang, J. C., Creager, M. A., Selwyn, A. P., & Ganz, P. (2001). Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*, 104(10), 1114–1118. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/104/10/1114.long>
- Kiritoshi, S., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Senokuchi, T., Matsuo, T.,

- Matsumura, T., Tokunaga, H., Brownlee, M., & Araki, E. (2003). Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 52(10), 2570–2577.
- Klabunde, R. E. (2012). *Cardiovascular physiology concepts*. (Second). Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Koga, T., Takata, Y., Kobayashi, K., Takishita, S., Yamashita, Y., & Fujishima, M. (1989). Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*, 14(5), 542–548. Retrieved from <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.14.5.542>
- Kohan, D. E., Rossi, N. F., Inscho, E. W., & D. M. Pollock. (2011). Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiological Reviews*, 91(1), 1–77.
- Kolettis, T. M., Barton, M., Langleben, D., & Matsumura, Y. (2013). Endothelin in coronary artery disease and myocardial infarction. *Cardiology in Review*, 21(5), 249–256.
- Komers, R., Lindsley, J. N., Oyama, T. T., Schutzer, W. E., Reed, J. F., Mader, S. L., & Anderson, S. (2001). Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 889–898.
- Komers, R., Ždychová, J., Cahová, M., Kazdová, L., Lindsley, J. N., & Anderson, S. (2005). Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats. *Kidney International*, 67(6), 2151–2158.
- Kong, B. W., Man, R. Y., Gao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2015). Reduced activity of SKCa and Na-K ATPase underlies the accelerated impairment of EDH-type relaxations in mesenteric arteries of aging spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Research & Perspectives*, 3(3), e00150.
- Korda, M., Kubant, R., Patton, S., & Malinski, T. (2008). Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 295(4), H1514–H1521.
- Kovacevic, I., Müller, M., Kojonazarov, B., Ehrke, A., Randriamboavonjy, V., Kohlstedt, K., Hindemith, T., Schermuly, R. T., Fleming, I., Hoffmeister, M., & Oess, S. (2015). The F-BAR protein NOSTRIN dictates the localization of the muscarinic M3 receptor and regulates cardiovascular function. *Circulation Research*, 117(5), 460–469.
- Kramer, H., Luke, A., Bidani, A., Cao, G., Cooper, R., & McGee, D. (2005). Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *American Journal of Kidney Diseases*, 46(4), 587–594.
- Kratzer, A., Giral, H., & Landmesser, U. (2014). High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular Research*, 103(3), 350–361.
- Kunz, D., Walker, G., Eberhardt, W., Messmer, U. K., Huwiler, A., & Pfeilschifter, J. (1997). Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor differentially

- regulate interleukin 1beta- and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2800–2809.
- Kuriyama, S., Morio, Y., Toba, M., Nagaoka, T., Takahashi, F., Iwakami, S. -i., Seyama, K., & Takahashi, K. (2014). Genistein attenuates hypoxic pulmonary hypertension via enhanced nitric oxide signaling and the erythropoietin system. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 306(11), L996–L1005.
- Laakso, J., Mervaala, E., Himberg, J. J. J., Teravainen, T. L., Karppanen, H., Vapaatalo, H., Lapatto, R., Teräväinen, T. L., Karppanen, H., Vapaatalo, H., & Lapatto, R. (1998). Increased kidney xanthine oxidoreductase activity in salt-induced experimental hypertension. *Hypertension*, 32(5), 902–906.
- Laakso, J. T., Teräväinen, T. L., Martelin, E., Vaskonen, T., & Lapatto, R. (2004). Renal xanthine oxidoreductase activity during development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 22(7), 1333–1340.
- Lacy, F., Gough, D. A., & Schmid-Schönbein, G. W. (1998). Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(6), 720–727.
- Laffin, L. J., & Bakris, G. L. (2015). Endothelin antagonism and hypertension: an evolving target. *Seminars in Nephrology*, 35(2), 168–175.
- Lakshmikanthan, S., Zieba, B. J., Ge, Z. D., Momotani, K., Zheng, X., Lund, H., Artamonov, M. V., Maas, J. E., Szabo, A., Zhang, D. X., Auchampach, J. A., Mattson, D. L., Somlyo, A. V., & Chrzanowska-Wodnicka, M. (2014). Rap1b in smooth muscle and endothelium is required for maintenance of vascular tone and normal blood pressure. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), 1486–1494.
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., Mitch, W. E., & Harrison, D. G. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, 111(8), 1201–1209.
- Landmesser, U., Harrison, D. G., & Drexler, H. (2006). Oxidant stress: a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62(Suppl. 1), 13–19.
- Larsen, B. T., Bubolz, A. H., Mendoza, S. A., Pritchard, K. A., & Gutterman, D. D. (2009). Bradykinin-induced dilation of human coronary arterioles requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 739–745.
- Lassegue, B., & Clempus, R. E. (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(2), R277–R297.
- Lassègue, B., Sorescu, D., Szöcs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., Grant, S. L., Lambeth, J. D., & Griendling, K. K. (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circulation Research*, 88(9), 888–894.

- Lazarus, M., Kubata, B. K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y., & Hayaishi, O. (2002). Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 336–341.
- Lee, C. R., Imig, J. D., Edin, M. L., Foley, J., DeGraff, L. M., Bradbury, J. A., Graves, J. P., Lih, F. B., Clark, J., Myers, P., Perrow, A. L., Lepp, A. N., Kannon, M. A., Ronnekleiv, O. K., Alkayed, N. J., Falck, J. R., Tomer, K. B., & Zeldin, D. C. (2010). Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenases lowers blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice. *FASEB Journal*, 24(10), 3770–3781.
- Lee, H. B., Yu, M., Yang, Y., Jiang, Z., & Ha, H. (2003). Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(90003), S241–S245.
- Lee, H. Y., Youn, S. W., Cho, H. J., Kwon, Y. W., Lee, S. W., Kim, S. J., Park, Y. B., Oh, B. H., & Kim, H. S. (2013). FOXO1 impairs whereas statin protects endothelial function in diabetes through reciprocal regulation of Krüppel-like factor 2. *Cardiovascular Research*, 97(1), 143–152.
- Lee, S. C., & Levine, L. (1975). Purification and Regulatory Properties of Chicken Heart Prostaglandin E 9-Ketoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 250(12), 4549–4555.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A., & Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(1–2), 177–196.
- Lenna, S., Han, R., & Trojanowska, M. (2014). Endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction. *IUBMB Life*, 66(8), 530–537.
- Lerman, A., Holmes, D. R. J., Bell, M. R., Garratt, K. N., Nishimura, R. A., & Burnett, J. C. J. (1995). Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation*, 92(9), 2426–2431.
- Li, H., Wallerath, T., & Förstermann, U. (2002). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*, 7(2), 132–147.
- Li, J.-M., & Shah, A. M. (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), R1014–R1030.
- Li, J. M., & Shah, A. M. (2002). Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19952–19960.
- Li, L., Lai, E. Y., Wellstein, A., Welch, W. J., & Wilcox, C. S. (2016). Differential effects of superoxide and hydrogen peroxide on myogenic signaling, membrane potential, and contractions of mouse renal afferent arterioles. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 310(11), F1197–F1205.

- Li, Z., Wang, Y., Man, R. Y. K., & Vanhoutte, P. M. (2013). Upregulation of heme oxygenase-1 potentiates EDH-type relaxations in the mesenteric artery of the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 305(10), H1471–H1483.
- Liang, C. F., Liu, J. T., Wang, Y., Xu, A., & Vanhoutte, P. M. (2013). Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(4), 777–784.
- Lillestol, I. K., Helle, K. B., & Aardal, S. (1998). Relaxing effects of cyclic GMP and cyclic AMP-enhancing agents on the long-lasting contraction to endothelin-1 in the porcine coronary artery. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 58(8), 625–634.
- Lim, H., & Dey, S. K. (2000). PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(4), 137–142.
- Lin, K. Y., Ito, A., Asagami, T., Tsao, P. S., Adimoolam, S., Kimoto, M., Tsuji, H., Reaven, G. M., & Cooke, J. P. (2002). Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 106(8), 987–992.
- Liu, B., Luo, W., Zhang, Y., Li, H., Zhu, N., Huang, D., & Zhou, Y. (2012c). Role of cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in endothelium-dependent vasoconstrictor activity of porcine interlobular renal arteries. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 302(9), F1133–F1140.
- Liu, B., Zhang, Y., Zhu, N., Li, H., Luo, W., & Zhou, Y. (2013b). A vasoconstrictor role for cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in mouse renal arteries. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 305(9), F1315–F1322.
- Liu, H. B., Zhang, J., Xin, S. Y., Liu, C., Wang, C. Y., Zhao, D., & Zhang, Z. R. (2013a). Mechanosensitive properties in the endothelium and their roles in the regulation of endothelial function. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 61(6), 461–470.
- Liu, J. T. C., Song, E., Xu, A., Berger, T., Mak, T. W., Tse, H. F., Law, I. K. M., Huang, B., Liang, Y., Vanhoutte, P. M., & Wang, Y. (2012b). Lipocalin-2 deficiency prevents endothelial dysfunction associated with dietary obesity: role of cytochrome P450 2C inhibition. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), 520–531.
- Liu, L., Liu, J., Huang, Z., Yu, X., Zhang, X., Dou, D., & Huang, Y. (2015). Berberine improves endothelial function by inhibiting endoplasmic reticulum stress in the carotid arteries of spontaneously hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(4), 796–801.
- Liu, L., Liu, J., Tian, X. Y., Wong, W. T., Lau, C. W., Xu, A., Xu, G., Ng, C. F., Yao, X., Gao, Y., & Huang, Y. (2014). Uncoupling protein-2 mediates DPP-4 inhibitor-induced restoration of endothelial function in hypertension through reducing oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(11), 1571–1581.
- Liu, L., Liu, J., Wong, W. T., Tian, X. Y., Lau, C. W., Wang, Y. X., Xu, G., Pu, Y., Zhu, Z., Xu, A., Lam, K. S. L., Chen, Z. Y., Ng, C. F., Yao, X., & Huang, Y. (2012a).

- Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension*, 60(3), 833–841.
- Liu, Y., Bubolz, A. H., Mendoza, S., Zhang, D. X., & Gutterman, D. D. (2011). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. *Circulation Research*, 108(5), 566–573.
- Liu, Y., Zhao, H., Li, H., Kalyanaraman, B., Nicolosi, A. C., & Gutterman, D. D. (2003). Mitochondrial sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circulation Research*, 93(6), 573–580.
- Lodha, S., Dani, D., Mehta, R., Bhaskaran, M., Reddy, K., Ding, G., & Singhal, P. C. (2002). Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Molecular Medicine*, 8(12), 830–840.
- Luccesi, P. A., Belmadani, S., & Matrouqui, K. (2005). Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *Journal of Hypertension*, 23(3), 571–579.
- Lüscher, T. F., Landmesser, U., Von Eckardstein, A., & Fogelman, A. M. (2014). High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circulation Research*, 114(1), 171–182.
- Lüscher, T. F., & Vanhoutte, P. M. (1986). Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 8(4), 344–348.
- Lüscher, T., & Vanhoutte, P. M. (1990). *The endothelium: modulator of cardiovascular function*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ma, Q. (2014). Advances in mechanisms of anti-oxidation. *Discovery Medicine*, 17(93), 121–130.
- Ma, Y. H., Gebremedhin, D., Schwartzman, M. L., Falck, J. R., Clark, J. E., Masters, B. S., Harder, D. R., & Roman, R. J. (1993). 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circulation Research*, 72(1), 126–136.
- Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), 2277–2293.
- Margaritis, M., Antonopoulos, A. S., Digby, J., Lee, R., Reilly, S., Coutinho, P., Shirodaria, C., Sayeed, R., Petrou, M., De Silva, R., Jalilzadeh, S., Demosthenous, M., Bakogiannis, C., Tousoulis, D., Stefanadis, C., Choudhury, R. P., Casadei, B., Channon, K. M., & Antoniades, C. (2013). Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation*, 127(22), 2209–2221.
- Marklund, S. L. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochemical*

- Journal*, 222(3), 649–655.
- Marletta, M. A. (1989). Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(12), 488–492.
- Maron, B. a., & Michel, T. (2012). Subcellular localization of oxidants and redox modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation Journal*, 76(11), 2497–2512.
- Marsh, D. J. (1983). *Renal physiology*. New York: Raven.
- Martens, C. R., Kuczmarski, J. M., Lennon-Edwards, S., & Edwards, D. G. (2014). Impaired L-arginine uptake but not arginase contributes to endothelial dysfunction in rats with chronic kidney disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 63(1), 40–48.
- Martínez-Miguel, P., Valdivielso, J. M., Medrano-Andrés, D., Román-García, P., Cano-Peñalver, J. L., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., & Lopez-Ongil, S. (2014). The active form of vitamin D, calcitriol, induces a complex dual upregulation of endothelin and nitric oxide in cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 307(12), E1085–E1096.
- Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., García-Redondo, A. B., Álvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J. V., García-Redondo, L., Esteban, V., Redondo, J. M., Alonso, M. J., Briones, A. M., & Salaíces, M. (2013). Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(1), 51–65.
- Masaki, T., Vane, J. R., & Vanhoutte, P. M. (1994). IUPHAR nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacological Reviews*, 46(2), 137–140.
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1–3), 83–104.
- Matés, J. M., & Sánchez-Jiménez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience*, 4(95), D339–D345.
- Matoba, T., Shimokawa, H., Morikawa, K., Kubota, H., Kunihiro, I., Urakami-Harasawa, L., Mukai, Y., Hirakawa, Y., Akaike, T., & Takeshita, A. (2003). Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(7), 1224–1230.
- Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., & Takeshita, A. (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 106(12), 1521–1530.
- Matsuda, H., Hayashi, K., Wakino, S., Kubota, E., Honda, M., Tokuyama, H., Takamatsu, I., Tatematsu, S., & Saruta, T. (2004). Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in ACE inhibitor-induced renal vasodilation in vivo. *Hypertension*, 43(3), 603–609.
- Matsumoto, T., Kakami, M., Noguchi, E., Kobayashi, T., & Kamata, K. (2007).

- Imbalance between endothelium-derived relaxing and contracting factors in mesenteric arteries from aged OLETF rats, a model of Type 2 diabetes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 293(3), H1480–H1490.
- Matsumoto, T., Watanabe, S., Kawamura, R., Taguchi, K., & Kobayashi, T. (2014). Enhanced uridine adenosine tetraphosphate-induced contraction in renal artery from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats due to activated cyclooxygenase/thromboxane receptor axis. *Pflugers Archiv*, 466(2), 331–342.
- McAuley, D. F., Nugent, A. G., McGurk, C., Maguire, S., Hayes, J. R., & Johnston, G. D. (2000). Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is impaired in patients with type II diabetes mellitus. *Clinical Science*, 99(3), 175–179.
- Meijer, R. I., Bakker, W., Alta, C. L. A. F., Sipkema, P., Yudkin, J. S., Viollet, B., Richter, E. A., Smulders, Y. M., Van Hinsbergh, V. W. M., Serné, E. H., & Eringa, E. C. (2013). Perivascular adipose tissue control of insulin-induced vasoreactivity in muscle is impaired in db/db mice. *Diabetes*, 62(2), 590–598.
- Mendez, J. I., Nicholson, W. J., & Taylor, W. R. (2005). SOD isoforms and signaling in blood vessels: evidence for the importance of ROS compartmentalization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(5), 887–888.
- Mervaala, E. M., Cheng, Z. J., Tikkanen, I., Lapatto, R., Nurminen, K., Vapaatalo, H., Müller, D. N., Fiebeler, A., Ganten, U., Ganten, D., & Luft, F. C. (2001). Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*, 37(2 Part 2), 414–418.
- Michel, T., & Vanhoutte, P. M. (2010). Cellular signaling and NO production. *Pflugers Archiv*, 459(6), 807–816.
- Miller, A. A., Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2006). Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 928–948.
- Miller, V. M., & Vanhoutte, P. M. (1985). Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *American Journal of Physiology*, 248(4 Pt 2), H432–H437.
- Miller, V. M., & Vanhoutte, P. M. (1988). Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow. *American Journal of Physiology*, 255(3), H446–H451.
- Ming, X. F., Barandier, C., Viswambharan, H., Kwak, B. R., Mach, F., Mazzolai, L., Hayoz, D., Ruffieux, J., Rusconi, S., Montani, J. P., & Yang, Z. (2004). Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation*, 110(24), 3708–3714.
- Minuz, P., Jiang, H., Fava, C., Turolo, L., Tacconelli, S., Ricci, M., Patrignani, P., Morganti, A., Lechi, A., & McGiff, J. C. (2008). Altered release of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in renovascular disease. *Hypertension*, 51(5), 1379–1385.
- Miura, H., Bosnjak, J. J., Ning, G., Saito, T., Miura, M., & Gutterman, D. D. (2003). Role

- for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circulation Research*, 92(2), e31–e40. Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000054200.44505.AB>
- Miyagawa, K., Ohashi, M., Yamashita, S., Kojima, M., Sato, K., Ueda, R., & Dohi, Y. (2007). Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 25(2), 415–421.
- Miyamoto, M., Yamada, N., Ikezawa, S., Ohno, M., Otake, A., Umemura, K., & Matsushita, T. (2003). Effects of TRA-418, a novel TP-receptor antagonist, and IP-receptor agonist, on human platelet activation and aggregation. *British Journal of Pharmacology*, 140(5), 889–894.
- Miyata, K., Rahman, M., Shokoji, T., Nagai, Y., Zhang, G., Sun, G., Kimura, S., Yukimura, T., Kiyomoto, H., Kohno, M., Abe, Y., Nishiyama, A., & \*Radioisotope. (2005). Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(10), 2906–2912.
- Miyata, T., Kurokawa, K., & Van Ypersele De Strihou, C. (2000). Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(9), 1744–1752.
- Miyauchi, T., Yanagisawa, M., Tomizawa, T., Sugishita, Y., Suzuki, N., Fujino, M., Ajisaka, R., Goto, K., & Masaki, T. (1989). Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet*, 2(8653), 53–54.
- Mombouli, J. V., & Vanhoutte, P. M. (1995). Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s) and the potentiation of kinins by converting enzyme inhibitors. *American Journal of Hypertension*, 8(5 Pt 2), 19S–27S.
- Moncada, S. (1997). Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 811, 60–69.
- Monnier, V., Nemet, I., Sell, D., & Weiss, M. (2011). Transition metals and other forms of oxidative protein damage in renal disease. In T. Miyata, K. Eckardt, & M. Nangaku (Eds.), *In: Studies on Renal Disorders* (pp. 25–50). New York: Humana Press. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60761-857-7>
- Monsalve, E., Oviedo, P. J., García-Pérez, M. A., Tarín, J. J., Cano, A., & Hermenegildo, C. (2007). Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 73(1), 66–72.
- Montezano, A. C., & 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 and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 110(1), 87–94.

- Moreau, K. L., Deane, K. D., Meditz, A. L., & Kohrt, W. M. (2012). Tetrahydrobiopterin improves endothelial function and decreases arterial stiffness in estrogen-deficient postmenopausal women. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 302(2), H1211–H1218.
- Moreno-Manzano, V., Ishikawa, Y., Lucio-Cazana, J., & Kitamura, M. (2000). Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of rat mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12684–12691.
- Morikawa, K., Shimokawa, H., Matoba, T., Kubota, H., Akaike, T., Talukder, M., Hatanaka, M., Fujiki, T., Maeda, H., Takahashi, S., & Takeshita, A. (2003). Pivotal role of Cu, Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1871–1879.
- Mueller, C. F. H., Laude, K., McNally, J. S., & Harrison, D. G. (2005). ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(2), 274–278.
- Mühl, H., & Pfeilschifter, J. (1995). Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 beta-stimulated rat mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 95(4), 1941–1946.
- Muñoz, M., Sánchez, A., Martínez, M. P., Benedito, S., López-Oliva, M. E., García-Sacristán, A., Hernández, M., & Prieto, D. (2015). COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 84, 77–90.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Tanioka, T., & Kudo, I. (2002). Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68–69, 383–399.
- Nakajima, S., Ohashi, J., Sawada, A., Noda, K., Fukumoto, Y., & Shimokawa, H. (2012). Essential role of bone marrow for microvascular endothelial and metabolic functions in mice. *Circulation Research*, 111(1), 87–96.
- Nangaku, M., & Eckardt, K. U. (2007). Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *Journal of Molecular Medicine*, 85(12), 1325–1330.
- Narita, I., Border, W. A., Ketteler, M., & Noble, N. A. (1995). Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. *Laboratory Investigation*, 72(1), 17–24.
- Narumiya, S., & FitzGerald, G. A. (2001). Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *Journal of Clinical Investigation*, 108(1), 25–30.
- Natarajan, R., & Nadler, J. L. (2004). Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(9), 1542–1548.
- Navar, L. G., Inscho, E. W., Majid, S. A., Imig, J. D., Harrison-Bernard, L. M., & Mitchell, K. D. (1996). Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiological Reviews*, 76(2), 425–536.
- Nemoto, S., Kobayashi, T., Taguchi, K., Matsumoto, T., & Kamata, K. (2011). Losartan improves aortic endothelium-dependent relaxation via proline-rich tyrosine

- kinase 2/Src/Akt pathway in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(6), H2383–H2394.
- Neves, K. B., Nguyen Dinh Cat, A., Lopes, R. A. M., Rios, F. J., Anagnostopoulou, A., Lobato, N. S., De Oliveira, A. M., Tostes, R. C., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2015). Chemerin regulates crosstalk between adipocytes and vascular cells through Nox. *Hypertension*, 66(3), 657–666.
- Nguyen, H., Chiasson, V. L., Chatterjee, P., Kopriva, S. E., Young, K. J., & Mitchell, B. M. (2013). Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovascular Research*, 97(4), 696–704.
- Ni, W., Watts, S. W., Ng, M., Chen, S., Glenn, D. J., & Gardner, D. G. (2014). Elimination of vitamin D receptor in vascular endothelial cells alters vascular function. *Hypertension*, 64(6), 1290–1298.
- Noblet, J. N., Owen, M. K., Goodwill, A. G., Sassoon, D. J., & Tune, J. D. (2015). Lean and obese coronary perivascular adipose tissue impairs vasodilation via differential inhibition of vascular smooth muscle K<sup>+</sup> channels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(6), 1393–1400.
- Nohria, A., Kinlay, S., Buck, J. S., Redline, W., Copeland-Halperin, R., Kim, S., & Beckman, J. A. (2014). The effect of salsalate therapy on endothelial function in a broad range of subjects. *Journal of the American Heart Association*, 3(1), 1–10.
- Noiri, E., Addabbo, F., & M. Goligorsky. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species, oxidative and nitrosative stress, and their role in the pathogenesis of acute kidney injury. In T. Miyata, K. Eckardt, & M. Nangaku (Eds.), *In: Studies on Renal Disorders* (pp. 161–177). New York: New York: Humana Press.
- Nozik-Grayck, E., Suliman, H. B., & Piantadosi, C. A. (2005). Extracellular superoxide dismutase. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(12), 2466–2471.
- Numaguchi, Y., Harada, M., H. Osanai, Hayashi, K., Toki, Y., Okumura, K., Ito, T., & Hayakawa, T. (1999). Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 41(3), 682–688.
- O'Rourke, S. T., Vanhoutte, P. M., & Miller, V. M. (2006). Biology of blood vessels. In M. A. Creager, V. Dzau, & J. Loscalzo (Eds.), *Vascular Medicine, a companion to Braunwald's Heart Disease*. (pp. 71–100). Philadelphia, PA: ELSEVIER.
- Oaetes, J. A. (1982). The 1982 nobel prize in physiology or medicine. *Science*, 218(4574), 765–768.
- Oberley, T. D., Verwiebe, E., Zhong, W., Kang, S. W., & Rhee, S. G. (2001). Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), 412–424.
- Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K., & Schultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 504–508.
- Ohno, M., Gibbons, G. H., Dzau, V. J., & Cooke, J. P. (1993). Shear stress elevates

- endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling. *Circulation*, 88(1), 193–197.
- Ohsaki, Y., O'Connor, P., Mori, T., Ryan, R. P., Dickinson, B. C., Chang, C. J., Lu, Y., Ito, S., & Cowley, a. W. (2012). Increase of sodium delivery stimulates the mitochondrial respiratory chain H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in rat renal medullary thick ascending limb. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 302(1), F95–F102.
- Okano, H., Jayachandran, M., Yoshikawa, A., & Miller, V. M. (2006). Differential effects of chronic treatment with estrogen receptor ligands on regulation of nitric oxide synthase in porcine aortic endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 47(4), 621–628.
- Okumura, M., Imanishi, M., Yamashita, T., Yamamura, Y., Kim, S., Iwao, H., Tanaka, S., & Fujii, S. (2000). Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sciences*, 65(5), 371–377.
- Olesen, S. P., Clapham, D. E., & Davies, P. F. (1988). Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature*, 331(6152), 168–170.
- Olsson, J., Jacobson, T. A. S., Paulsson, J. M., Dadfar, E., Moshfegh, A., Jacobson, S. H., & Lundahl, J. (2011). Expression of neutrophil SOD2 is reduced after lipopolysaccharide stimulation: a potential cause of neutrophil dysfunction in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(7), 2195–2201.
- Orient, A., Donkó, Á., Szabó, A., Leto, T. L., & Geiszt, M. (2007). Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(5), 1281–1288.
- Oriowo, M. A. (2015). Perivascular adipose tissue, vascular reactivity and hypertension. *Medical Principles and Practice*, 24(suppl 1), 29–37.
- Osman, B., Doller, A., Akool, E.-S., Holdener, M., Hintermann, E., Pfeilschifter, J., & Eberhardt, W. (2009). Rapamycin induces the TGFβ1/Smad signaling cascade in renal mesangial cells upstream of mTOR. *Cellular Signalling*, 21(12), 1806–1817.
- Osto, E., Doytcheva, P., Corteville, C., Bueter, M., Dörig, C., Stivala, S., Buhmann, H., Colin, S., Rohrer, L., Hasballa, R., Tailleux, A., Wolfrum, C., Tona, F., Manz, J., Vetter, D., Spliethoff, K., Vanhoutte, P. M., Landmesser, U., Pattou, F., et al. (2015). Rapid and body weight-independent improvement of endothelial and high-density lipoprotein function after Roux-en-Y gastric bypass role of glucagon-like peptide-1. *Circulation*, 131(10), 871–881.
- Palen, D. I., Ouhtit, A., Belmadani, S., Lucchesi, P. A., & Matrougui, K. (2006). Hydrogen peroxide acts as relaxing factor in human vascular smooth muscle cells independent of map-kinase and nitric oxide. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2526–2534.
- Pannirselvam, M., Verma, S., Anderson, T. J., & Triggle, C. R. (2002). Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db -/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability. *British Journal of Pharmacology*, 136(2), 255–263.
- Paravicini, T. M., Chrissobolis, S., Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2004). Increased

- NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke*, 35(2), 584–589.
- Paravicini, T. M., & Touyz, R. M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 31(2), S170–S180.
- Park, J. Y., Takahara, N., Gabriele, A., Chou, E., Naruse, K., Suzuma, K., Yamauchi, T., Ha, S. W., Meier, M., Rhodes, C. J., & King, G. L. (2000). Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes*, 49(7), 1239–1248.
- Patel, V. B., Bodiga, S., Basu, R., Das, S. K., Wang, W., Wang, Z., Lo, J., Grant, M. B., Zhong, J., Kassiri, Z., & Oudit, G. Y. (2012). Loss of angiotensin-converting enzyme-2 exacerbates diabetic cardiovascular complications and leads to systolic and vascular dysfunction: A critical role of the angiotensin II/AT1 receptor axis. *Circulation Research*, 110(10), 1322–1335.
- Patrono, C., Ciabattini, G., Pugliese, F., Pierucci, A., Blair, I. A., & FitzGerald, G. A. (1986). Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *Journal of Clinical Investigation*, 77(2), 590–594.
- Pawlak, K., Naumnik, B., Brzósko, S., Pawlak, D., & Mysliwiec, M. (2004). Oxidative stress - a link between endothelial injury, coagulation activation, and atherosclerosis in haemodialysis patients. *American Journal of Nephrology*, 24(1), 154–161.
- Pearson, P. J., & Vanhoutte, P. M. (1993). Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 122, 1–67.
- Peppas, M., Uribarri, J., Cai, W., Lu, M., & Vlassara, H. (2004). Glycooxidation and inflammation in renal failure patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 43(4), 690–695.
- Peresleni, T., Noiri, E., Bahou, W. F., & Goligorsky, M. S. (1996). Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *American Journal of Physiology*, 270(6 Pt 2), F971–F977.
- Perticone, F., Sciacqua, A., Maio, R., Perticone, M., Maas, R., Boger, R. H., Tripepi, G., Sesti, G., & Zoccali, C. (2005). Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(3), 518–523.
- Pfeilschifter, J., & Beck, K. (2011). Oxidative stress injury in glomerular mesangium. In T. Miyata, K. Eckardt, & N. Nangaku (Eds.), *In: Studies on Renal Disorders* (pp. 3–23). New York: Humana Press.
- Pfeilschifter, J., Beck, K. F., Eberhardt, W., & Huwiler, A. (2002). Changing gears in the course of glomerulonephritis by shifting superoxide to nitric oxide-dominated chemistry. *Kidney International*, 61(3), 809–815.

- Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Beck, K. F., & Huwiler, A. (2003). Redox signaling in mesangial cells. *Nephron. Experimental Nephrology*, 93(1), e23–e26.
- Piantadosi, C. A., & Suliman, H. B. (2006). Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 324–333.
- Piecznik, S. R., & J. Neustadt. (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 83(1), 84–92.
- Pierce, G. L., Lesniewski, L. A., Lawson, B. R., Beske, S. D., & Seals, D. R. (2009). Nuclear factor- $\kappa$ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation*, 119(9), 1284–1292.
- Pinilla, E., Sánchez, A., Muñoz, M., García-Sacristán, A., Köhler, R., Prieto, D., & Rivera, L. (2016). Role of endothelium-derived hyperpolarization in the vasodilation of rat intrarenal arteries. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72, S48.
- Plesková, M., Beck, K. F., Behrens, M. H., Huwiler, A., Fichtlscherer, B., Wingerter, O., Brandes, R. P., Mülsch, A., & Pfeilschifter, J. (2006). Nitric oxide down-regulates the expression of the catalytic NADPH oxidase subunit Nox1 in rat renal mesangial cells. *FASEB Journal*, 20(1), 139–141.
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 7(10), 803–815.
- Pojoga, L. H., Williams, J. S., Yao, T. M., Kumar, A., Raffetto, J. D., do Nascimento, G. R. a., Reslan, O. M., Adler, G. K., Williams, G. H., Shi, Y., & Khalil, R. a. (2011). Histone demethylase LSD1 deficiency during high-salt diet is associated with enhanced vascular contraction, altered NO-cGMP relaxation pathway, and hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(46), H1862–H1871.
- Polla, B. S., Bachelet, M., Elia, G., & Santoro, M. G. (1998). Stress proteins in inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 75–85.
- Poss, K. D., & Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10925–10930.
- Prieto, D., Contreras, C., & Sánchez, A. (2013). Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Current Vascular Pharmacology*, 12(3), 412–426.
- Pritchard, K. A., Jr, S., Banionn, M. K. O., Mianoi, J. M., Vlasics, N., Bhatias, U. G., Youngll, D. A., & Stemermans, M. B. (1994). Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8504–8509.
- Prysyazhna, O., Rudyk, O., & Eaton, P. (2012). Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nature Medicine*, 18(2), 286–290.
- Puntarulo, S., & Cederbaum, A. I. (1998). Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radical*

- Biology and Medicine*, 24(7-8), 1324-1330.
- Purdy, K. E., & Arendshorst, W. J. (1999). Prostaglandins buffer ANG II-mediated increases in cytosolic calcium in preglomerular VSMC. *American Journal of Physiology*, 277(6 Pt 2), F850-F858.
- Purdy, K. E., & Arendshorst, W. J. (2001). Iloprost inhibits inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(1), 19-28.
- Pushpa-Rekha, T. R., Burdsall, A. L., Oleksa, L. M., Chisolm, G. M., & Driscoll, D. M. (1995). Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26993-26999.
- Qi, Z., Cai, H., Morrow, J. D., & Breyer, M. D. (2006). Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension*, 48(2), 323-328.
- Quilley, J., Bell-Quilley, C. P., & McGiff, J. C. (1995). Eicosanoids and hypertension. In J. H. Laragh & B. M. Brenner (Eds.), *In hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. (Second, pp. 963-982). New York: Raven Press.
- Quilley, J., & Chen, Y. J. (2003). Role of COX-2 in the enhanced vasoconstrictor effect of arachidonic acid in the diabetic rat kidney. *Hypertension*, 42(part 2), 837-843.
- Quilley, J., Santos, M., & Pedraza, P. (2011). Renal protective effect of chronic inhibition of COX-2 with SC-58236 in streptozotocin-diabetic rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 300(6), H2316-H2322.
- Radeke, H. H., Meier, B., Topley, N., Flöge, J., Habermehl, G. G., & Resch, K. (1990). Interleukin 1- $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney International*, 37(2), 767-775.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1987). The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148(3), 1482-1489.
- Raffai, G., Durand, M. J., & Lombard, J. H. (2011). Acute and chronic angiotensin-(1 - 7) restores vasodilation and reduces oxidative stress in mesenteric arteries of salt-fed rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(4), H1341-H1352.
- Rafnsson, A., Böhm, F., Settergren, M., Gonon, A., Brismar, K., & Pernow, J. (2012). The endothelin receptor antagonist bosentan improves peripheral endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: a randomised trial. *Diabetologia*, 55(3), 600-607.
- Rafnsson, A., Shemyakin, A., & Pernow, J. (2014). Selective endothelin ETA and dual ET(A)/ET(B) receptor blockade improve endothelium-dependent vasodilatation in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Life Sciences*, 118(2), 435-439. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.026>
- RaKugi, H., Tabuchi, Y., Nakamaru, M., Nagano, M., Higashimori, K., Mikami, H.,

- Ogihara, T., & Suzuki, N. (1990). Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 169(3), 973–977.
- Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G., & Villarreal, F. (2011). (-)-Epicatechin induces calcium and translocation independent eNOS activation in arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300(4), C880–C887.
- Rath, G., Dessy, C., & Feron, O. (2009). Caveolae, caveolin and control of vascular tone: nitric oxide (NO) and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(Suppl 4), 105–109.
- Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R., & Wolin, M. S. (2016). Oxidant mechanisms in renal injury and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(3), 119–146.
- Ray, R., Murdoch, C. E., Wang, M., Santos, C. X., Zhang, M., Alom-Ruiz, S., Anilkumar, N., Ouattara, A., Cave, A. C., Walker, S. J., Grieve, D. J., Charles, R. L., Eaton, P., Brewer, A. C., & Shah, A. M. (2011). Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(6), 1368–1376.
- Raychowdhury, M. K., Yukawa, M., Collins, L. J., McGrail, S. H., Craig Kent, K., & Ware, J. A. (1994). Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(30), 19256–19261.
- Rinne, P., Ahola-Olli, A., Nuutinen, S., Koskinen, E., Kaipio, K., Eerola, K., Juonala, M., Kähönen, M., Lehtimäki, T., Raitakari, O. T., & Savontaus, E. (2015). Deficiency in melanocortin 1 receptor signaling predisposes to vascular endothelial dysfunction and increased arterial stiffness in mice and humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(7), 1678–1686.
- Robey, R. B., & Hay, N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*, 25(34), 4683–4696.
- Roche, C., Besnier, M., Cassel, R., Harouki, N., Coquerel, D., Guerrot, D., Nicol, L., Loizon, E., Remy-Jouet, I., Morisseau, C., Mulder, P., Ouvrard-Pascaud, A., Madec, A.-M., Richard, V., & Bellien, J. (2015). Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(9), H1020–H1029.
- Roman, R. J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological Reviews*, 82(1), 131–185.
- Rosen, H., Crowley, J. R., & Heinecke, J. W. (2002). Human neutrophils use the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to chlorinate but not nitrate bacterial proteins during phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30463–30468.
- Ruan, X., Chatziantoniou, C., & Arendshorst, W. J. (1999). Impaired prostaglandin E2 /prostaglandin I2 receptor-Gs protein interactions in isolated renal resistance arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34, 1134–1141.

- Rubanyi, G. M., & Polokoff, M. A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews*, 46(3), 325–415.
- Rubanyi, G. M., Romero, J. C., & Vanhoutte, P. M. (1986). Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology*, 250(6), H1145–H1149.
- Rubanyi, G. M., & Vanhoutte, P. M. (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology*, 250(5 (Part 2)), H822–H827.
- Sachse, A., & Wolf, G. (2007). Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(9), 2439–2446.
- San Martín, A., Du, P., Dikalova, A., Lassègue, B., Aleman, M., Góngora, M. C., Brown, K., Joseph, G., Harrison, D. G., Taylor, W. R., Jo, H., & Griending, K. K. (2007). Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(5), H2073–H2082.
- Sánchez, A., Contreras, C., Martínez, M. P., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., Hernández, M., & Prieto, D. (2012). Role of neural NO synthase (nNOS) uncoupling in the dysfunctional nitric oxide vasorelaxation of penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *PLoS ONE*, 7(4), e36027.
- Sánchez, A., Contreras, C., Martínez, P., Villalba, N., Benedito, S., García-Sacristán, A., Saláces, M., Hernández, M., & Prieto, D. (2010). Enhanced cyclooxygenase 2-mediated vasorelaxation in coronary arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis*, 213(2), 392–399.
- Sánchez, A., Contreras, C., Villalba, N., Martínez, P., Martínez, A. C., Briones, A., Saláces, M., García-Sacristán, A., Hernández, M., & Prieto, D. (2010). Altered arachidonic acid metabolism via COX-1 and COX-2 contributes to the endothelial dysfunction of penile arteries from obese Zucker rats. *British Journal of Pharmacology*, 159(3), 604–616.
- Sánchez, A., Martínez, P., Muñoz, M., Benedito, S., García-Sacristán, A., Hernández, M., & Prieto, D. (2014). Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: Role of ETA and ETB receptors. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5682–5695.
- Sandau, K., Pfeilschifter, J., & Brüne, B. (1997). The balance between nitric oxide and superoxide determines apoptotic and necrotic death of rat mesangial cells. *Journal of Immunology*, 158(10), 4938–4946.
- Sandoval, Y. H., Atef, M. E., Levesque L. O., Li, Y., & Anand-Srivastava, M. B. (2014). Endothelin-1 signaling in vascular physiology and pathophysiology. *Current Vascular Pharmacology*, 12(2), 202–214.
- Santiago, E., Climent, B., Muñoz, M., García-Sacristán, A., Rivera, L., & Prieto, D. (2015). Hydrogen peroxide activates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in coronary

- arteries. *British Journal of Pharmacology*, 172(22), 5318–5332.
- Santiago, E., Contreras, C., García-Sacristán, A., Sánchez, A., Rivera, L., Climent, B., & Prieto, D. (2013). Signaling pathways involved in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced vasoconstriction of rat coronary arteries. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 136–146.
- Sasser, J. M., Cunningham, M. W., & Baylis, C. (2014). Serelaxin reduces oxidative stress and asymmetric dimethylarginine in angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 307(12), F1355–F1362.
- Satriano, J. A., Banas, B., Luckow, B., Nelson, P., & Schlondorff, D. O. (1997). Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 8(4), 596–603.
- Satriano, J., Lortie, M. J., Ishizuka, S., Valdivielso, J. M., Friedman, B., & Munger, K. A. (2006). Inhibition of inducible nitric oxide synthase alters Thy-1 glomerulonephritis in rats. *Nephron. Physiology*, 102(2), p17–p26.
- Scalera, F., Closs, E. I., Flick, E., Martens-Lobenhoffer, J., Boissel, J. P., Lendeckel, U., Heimburg, A., & Bode-Böger, S. M. (2009). Paradoxical effect of L-arginine: acceleration of endothelial cell senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(4), 650–655.
- Schäfer, N., Lohmann, C., Winnik, S., van Tits, L. J., Miranda, M. X., Vergopoulos, A., Ruschitzka, F., Nussberger, J., Berger, S., Luscher, T. F., Verrey, F., & Matter, C. M. (2013). Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *European Heart Journal*, 34(45), 3515–3524.
- Schiffrin, E. L. (1999). Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*, 34(4 Pt 2), 876–881.
- Schini-Kerth, V. B., & Vanhoutte, P. M. (1995). Nitric oxide synthases in vascular cells. *Experimental Physiology*, 80, 885–905.
- Schini, V. B., & Vanhoutte, P. M. (1991). L-arginine evokes both endothelium-dependent and -independent relaxations in L-arginine-depleted aortas of the rat. *Circulation Research*, 68(1), 209–216.
- Schinzari, F., Tesauro, M., Rovella, V., Daniele, N. Di, Mores, N., Veneziani, A., & Cardillo, C. (2013). Leptin stimulates both endothelin-1 and nitric oxide activity in lean subjects but not in patients with obesity-related metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(3), 1235–1241.
- Schjerning, J., Uhrenholt, T. R., Svenningsen, P., Vanhoutte, P. M., Skøtt, O., Jensen, B. L., & Hansen, P. B. L. (2013). Histamine-dependent prolongation by aldosterone of vasoconstriction in isolated small mesenteric arteries of the mouse. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 304(8), H1094–H1102.
- Schlüter, T., Zimmermann, U., Protzel, C., Miehe, B., Klebingat, K. J., Rettig, R., & Grisk, O. (2010). Intrarenal artery superoxide is mainly NADPH oxidase-derived and modulates endothelium-dependent dilation in elderly patients. *Cardiovascular Research*, 85(4), 814–824.

- Schmidt, A. M., Hofmann, M., Taguchi, A., Yan, S. D., & Stern, D. M. (2000). RAGE: a multiligand receptor contributing to the cellular response in diabetic vasculopathy and inflammation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26(5), 485–493.
- Schneider, J. G., Tilly, N., Hierl, T., Sommer, U., Hamann, A., Dugi, K., Leidig-Bruckner, G., & Kasperk, C. (2002). Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *American Journal of Hypertension*, 15(11), 967–972.
- Schweda, F., Klar, J., Narumiya, S., Nüsing, R. M., & Kurtz, A. (2004). Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 287(3), F427–F433.
- Sedeek, M., Gutsol, A., Montezano, A. C., Burger, D., Nguyen Dinh Cat, A., Kennedy, C. R. J., Burns, K. D., Cooper, M. E., Jandeleit-Dahm, K., Page, P., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Hebert, R. L., & Touyz, R. M. (2013). Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes. *Clinical Science*, 124(3), 191–202.
- Sekikawa, A., Curb, J. D., Ueshima, H., El-Saed, A., Kadowaki, T., Abbott, R. D., Evans, R. W., Rodriguez, B. L., Okamura, T., Sutton-Tyrrell, K., Nakamura, Y., Masaki, K., Edmundowicz, D., Kashiwagi, A., Willcox, B. J., Takamiya, T., Mitsunami, K. ichi, Seto, T. B., Murata, K., et al. (2008). Marine-derived n-3 fatty acids and atherosclerosis in Japanese, Japanese-Americans, and whites: a cross-sectional study. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(6), 417–424.
- Sena, C. M., Matafome, P., Louro, T., Nunes, E., Fernandes, R., & Seica, R. M. (2011). Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*, 163(2), 424–437.
- Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., & Griendling, K. K. (2002). Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circulation Research*, 91(5), 406–413.
- Shalamanova, L., McArdle, F., Amara, A. B., Jackson, M. J., & Rustom, R. (2007). Albumin overload induces adaptive responses in human proximal tubular cells through oxidative stress but not via angiotensin II type 1 receptor. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292(6), F1846–F1857.
- Sharma, K. (2015). Mitochondrial hormesis and diabetic complications. *Diabetes*, 64(3), 663–672.
- Sharma, K. (2016). Obesity and diabetic kidney disease: role of oxidant stress and redox balance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(4), 208–216.
- Shenoy, V., Gjymishka, A., Jarajapu, Y. P., Qi, Y., Afzal, A., Rigatto, K., Ferreira, A. J., Fraga-Silva, R. A., Kearns, P., Douglas, J. Y., Agarwal, D., Mubarak, K. K., Bradford, C., Kennedy, W. R., Jun, J. Y., Rathinasabapathy, A., Bruce, E., Gupta, D., Cardounel, A. J., et al. (2013). Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(6), 648–657.
- Shenoy, V., Kwon, K. C., Rathinasabapathy, A., Lin, S., Jin, G., Song, C., Shil, P., Nair, A., Qi, Y., Li, Q., Francis, J., Katovich, M. J., Daniell, H., & Raizada, M. K. (2014).

- Oral delivery of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. *Hypertension*, 64(6), 1248–1259.
- Shi, Y., Man, R. Y. K., & Vanhoutte, P. M. (2008). Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(2), 185–192.
- Shi, Y., & Vanhoutte, P. M. (2008). Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*, 154(3), 639–651.
- Shibata, S., Nagase, M., Yoshida, S., Kawachi, H., & Fujita, T. (2007). Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension*, 49(2), 355–364.
- Shimokawa, H. (2010). Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Archiv*, 459(6), 915–922.
- Shimokawa, H. (2014). 2014 williams harvey lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities - from bench to bedside. *European Heart Journal*, 35(45), 3180–3193.
- Shimokawa, H., Aarhus, L. L., & Vanhoutte, P. M. (1988a). Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids augment endothelium-dependent relaxation to bradykinin in coronary microvessels of the pig. *British Journal of Pharmacology*, 95(4), 1191–1196.
- Shimokawa, H., Flavahan, N. A., Lorenz, R. R., & Vanhoutte, P. M. (1988b). Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *British Journal of Pharmacology*, 95(4), 1197–1203.
- Shimokawa, H., Flavahan, N. A., & Vanhoutte, P. M. (1991). Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation*, 83(2), 652–660.
- Shimokawa, H., Kim, P., & Vanhoutte, P. M. (1988c). Endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets in isolated basilar arteries of control and hypercholesterolemic pigs. *Circulation Research*, 63(3), 604–612.
- Shimokawa, H., Lam, J. Y., Chesebro, J. H., Bowie, E. J., & Vanhoutte, P. M. (1987). Effects of dietary supplementation with cod-liver oil on endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries. *Circulation*, 76(4), 898–905.
- Shimokawa, H., & Matoba, T. (2004). Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacological Research*, 49(6), 543–549.
- Shimokawa, H., & Vanhoutte, P. M. (1989). Hypercholesterolemia causes generalized impairment of endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets in porcine arteries. *Journal of the American College of Cardiology*, 13(6), 1402–1408.
- Shin, S., Mohan, S., & Fung, H. L. (2011). Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: implications on the “L-arginine

- paradox". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(4), 660–663.
- Silswal, N., Touchberry, C. D., Daniel, D. R., McCarthy, D. L., Zhang, S., Andresen, J., Stubbs, J. R., & Wacker, M. J. (2014). FGF23 directly impairs endothelium-dependent vasorelaxation by increasing superoxide levels and reducing nitric oxide bioavailability. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 307(5), 426–436.
- Silver, A. E., Beske, S. D., Christou, D. D., Donato, A. J., Moreau, K. L., Eskurza, I., Gates, P. E., & Seals, D. R. (2007). Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47phox expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation*, 115(5), 627–637.
- Sindhu, R. K., Ehdaie, A., Farmand, F., Dhaliwal, K. K., Nguyen, T., Zhan, C. De, Roberts, C. K., & Vaziri, N. D. (2005). Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1743(1–2), 86–92.
- Siu, H., Wang, W., Wang, P. H., & Liu, L. S. (2005). Effect of glutathione peroxidase mimic ebselen (PZ51) on endothelium and vascular structure of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Blood Pressure*, 14(6), 366–372.
- Siu, Y. P., Leung, K. T., Tong, M. K., & Kwan, T. H. (2006). Use of allopurinol in slowing the progression of renal disease through its ability to lower serum uric acid level. *American Journal of Kidney Diseases*, 47(1), 51–59.
- Skinner, M., Philp, K., Lengel, D., Coverley, L., Lamm Bergström, E., Graves, P., Musgrove, H., Prior, H., Braddock, M., Huby, R., Curwen, J. O., Duffy, P., & Harmer, A. R. (2014). The contribution of VEGF signalling to fostamatinib-induced blood pressure elevation. *British Journal of Pharmacology*, 171(9), 2308–2320.
- Smillie, S. J., King, R., Kodji, X., Outzen, E., Pozsgai, G., Fernandes, E., Marshall, N., De Winter, P., Heads, R. J., Dessapt-Baradez, C., Gnudi, L., Sams, A., Shah, A. M., Siow, R. C., & Brain, S. D. (2014). An ongoing role of alfa-calcitonin gene-related peptide as part of a protective network against hypertension, vascular hypertrophy, and oxidative stress. *Hypertension*, 63(5), 1056–1062.
- Smith, W. L. (1992). Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *American Journal of Physiology*, 263(2 Pt 2), F181–F191.
- Smith, W. L., Langenbach, R., Langenbach, R., Morham, S., Dinchuk, J., Brash, A., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Ichikawa, A., Patrignani, P., Patrono, C., Lim, H., Gross, G., Gross, G., Davis, B., Lim, H., Komhoff, M., Loftin, C., Wallace, J., et al. (2001). Why there are two cyclooxygenase isozymes. *Journal of Clinical Investigation*, 107(12), 1491–1495.
- Sodhi, K., Wu, C. C., Cheng, J., Gotlinger, K., Inoue, K., Goli, M., Falck, J. R., Abraham, N. G., & Schwartzman, M. L. (2010). CYP4A2-induced hypertension is 20-hydroxyeicosatetraenoic acid- and angiotensin II-dependent. *Hypertension*, 56(5), 871–878.
- Sokol, S. I., Grushko, M., Srinivas, V. S., & Crandall, J. P. (2012). Relationship between

- vitamin D deficiency, post-challenge hyperglycemia, and endothelial function in healthy older adults. *Journal of Diabetes*, 4(1), 102–103.
- Sollinger, D., Eißler, R., Lorenz, S., Strand, S., Chmielewski, S., Aoqui, C., Schmaderer, C., Bluysen, H., Zicha, J., Witzke, O., Scherer, E., Lutz, J., Heemann, U., & Baumann, M. (2014). Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signalling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension. *Cardiovascular Research*, 101(3), 464–472.
- Spector, A. A., Fang, X., Snyder, G. D., & Weintraub, N. L. (2004). Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progress in Lipid Research*, 43(1), 55–90.
- Stähli, B. E., Greutert, H., Mei, S., Graf, P., Frischknecht, K., Stalder, M., Englberger, L., Künzli, A., Schärer, L., Lüscher, T. F., Carrel, T. P., & Tanner, F. C. (2006). Absence of histamine-induced nitric oxide release in the human radial artery: implications for vasospasm of coronary artery bypass vessels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 290(3), H1182–H1189.
- Strachan, F. E., Spratt, J. C., Wilkinson, I. B., Johnston, N. R., Gray, G. a., & Webb, D. J. (1999). Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension*, 33(1 Pt 2), 581–585.
- Stuehr, D., Pou, S., & Rosen, G. M. (2001). Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14533–14536.
- Sudhahar, V., Shaw, S., & Imig, J. D. (2010). Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Current Medicinal Chemistry*, 17(12), 1181–1190.
- Sugihara, S., Hisatome, I., Kuwabara, M., Niwa, K., Maharani, N., Kato, M., Ogino, K., Hamada, T., Ninomiya, H., Higashi, Y., Ichida, K., & Yamamoto, K. (2015). Depletion of uric acid due to SLC22A12 (URAT1) loss-of-function mutation causes endothelial dysfunction in hypouricemia. *Circulation Journal*, 79(5), 1125–1132.
- Sullivan, J. C., Rodriguez-Miguel, P., Zimmerman, M. A., & Harris, R. A. (2015). Differences in angiotensin (1–7) between men and women. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(9), H1171–H1176.
- Suzuki, H., DeLano, F. A., Parks, D. A., Jamshidi, N., Granger, D. N., Ishii, H., Suematsu, M., Zweifach, B. W., & Schmid-Schönbein, G. W. (1998). Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4754–4759.
- Sverrisson, K., Axelsson, J., Rippe, A., Asgeirsson, D., & Rippe, B. (2015). Acute reactive oxygen species (ROS)-dependent effects of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 on the glomerular filtration barrier (GFB) in vivo. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 309(9), F800–F806.
- Szerafin, T., Erdei, N., Fülöp, T., Pasztor, E. T., Édes, I., Koller, A., & Bagi, Z. (2006). Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circulation Research*, 99(5), e12–e17.

- Tabet, F., Savoia, C., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2004). Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 44(2), 200–208.
- Tabit, C. E., Shenouda, S. M., Holbrook, M., Fetterman, J. L., Kiani, S., Frame, A. A., Kluge, M. A., Held, A., Dohadwala, M. M., Gokce, N., Farb, M. G., Rosenzweig, J., Ruderman, N., Vita, J. A., & Hamburg, N. M. (2013). Protein kinase C-beta contributes to impaired endothelial insulin signaling in humans with diabetes mellitus. *Circulation*, 127(1), 86–95.
- Taddei, S., Virdis, A., Mattei, P., Ghiadoni, L., Fasolo, C. B., Sudano, I., & Salvetti, A. (1997). Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension*, 29(3), 736–743.
- Taguchi, K., Sakata, K., Ohashi, W., Imaizumi, T., Imura, J., & Hattori, Y. (2014). Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyperglycemia with high insulin levels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349(2), 199–208.
- Tajiri, Y., Umeda, F., Inoguchi, T., & Nawata, H. (1994). Effects of thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) on urinary prostaglandin excretion and renal function in streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 8(2), 126–132.
- Takai, J., Santu, A., Zheng, H., Koh, S. D., Ohta, M., Filimban, L. M., Lemaître, V., Teraoka, R., Jo, H., & Miura, H. (2013). Laminar shear stress upregulates endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels KCa2.3 and KCa3.1 via a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase/Akt/p300 cascade. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 305(12), H484–H493.
- Takeshita, S., Inoue, N., Ueyama, T., Kawashima, S., & Yokoyama, M. (2000). Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(1), 66–71.
- Takeya, R., & Sumimoto, H. (2006). Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1523–1532.
- Tamarelle, S., Terwelp, M., Amirian, J., Felli, P., Zhang, X. Q., Barry, W. H., & Smalling, R. W. (2013). Endothelin-1 release during the early phase of reperfusion is a mediator of myocardial reperfusion injury. *Cardiology*, 125(4), 242–249.
- Tang, E. H. C., Feletou, M., Huang, Y., Man, R. Y. K., & Vanhoutte, P. M. (2005). Acetylcholine and sodium nitroprusside cause long-term inhibition of EDGF-mediated contractions. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(6), H2434–H2440.
- Tang, E. H. C., Leung, F. P., Huang, Y., Feletou, M., So, K. F., Man, R. Y. K., & Vanhoutte, P. M. (2007). Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *British Journal of Pharmacology*, 151(1), 15–23.

- Tang, E. H. C., & Vanhoutte, P. M. (2008b). Gap junction inhibitors reduce endothelium-dependent contractions in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(1), 148–153.
- Tang, E. H. C., & Vanhoutte, P. M. (2008a). Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiological Genomics*, 32(3), 409–418.
- Tang, E. H., & Vanhoutte, P. M. (2009). Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(2), 140–149.
- Tang, E. H., & Vanhoutte, P. M. (2010). Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Archiv*, 459(6), 995–1004.
- Tang, L., Loutzenhiser, K., & Loutzenhiser, R. (2000). Biphasic actions of prostaglandin E(2) on the renal afferent arteriole : role of EP(3) and EP(4) receptors. *Circulation Research*, 86(6), 663–670.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S., & Watanabe, K. (2002). Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(4), 884–889.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., & Kudo, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32775–32782.
- Tarhouni, K., Guihot, A. L., Freidja, M. L., Toutain, B., Henrion, B., Baufreton, C., Pinaud, F., Procaccio, V., Grimaud, L., Ayer, A., Loufrani, L., Lenfant, F., Arnal, J. F., & Henrion, D. (2013). Key role of estrogens and endothelial estrogen receptor alfa in blood flow-mediated remodeling of resistance arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(3), 605–611.
- Tarhouni, K., Guihot, A. L., Vessières, E., Toutain, B., Procaccio, V., Grimaud, L., Loufrani, L., Lenfant, F., Arnal, J. F., & Henrion, D. (2014). Determinants of flow-mediated outward remodeling in female rodents: respective roles of age, estrogens, and timing. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(6), 1281–1289.
- Tatematsu, S., Francis, S. A., Natarajan, P., Rader, D. J., Saghatelian, A., Brown, J. D., Michel, T., & Plutzky, J. (2013). Endothelial lipase is a critical determinant of high-density lipoprotein-stimulated sphingosine 1-phosphate-dependent signaling in vascular endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1788–1794.
- Thallas-Bonke, V., Jandeleit-Dahm, K. A., & Cooper, M. E. (2015). Nox-4 and progressive kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(1), 74–80.
- Thomas, S. R., Witting, P. K., & Drummond, G. R. (2008). Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities.

- Antioxidants & Redox Signaling*, 10(10), 1713–1765.
- Tian, S., Ge, X., Wu, K., Yang, H., & Liu, Y. (2014). Ramipril protects the endothelium from high glucose-induced dysfunction through CaMKK $\beta$ /AMPK and HO-1 activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(1), 5–13.
- Tian, X. Y., Wong, W. T., Leung, F. P., Zhang, Y., Wang, Y. X., Lee, H. K., Ng, C. F., Chen, Z. Y., Yao, X., Au, C. L., Lau, C. W., Vanhoutte, P. M., Cooke, J. P., & Huang, Y. (2012). Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 $\alpha$ ) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(4), 363–373.
- Toda, N., Ayajiki, K., & Okamura, T. (2012). Neurogenic and endothelial nitric oxide regulates blood circulation in lingual and other oral tissues. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60(1), 100–108.
- Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., & Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Current Vascular Pharmacology*, 10(1), 4–18.
- Touyz, R. M. (2005). Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14(2), 125–131.
- Touyz, R. M. (2007). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by thrombin. *Hypertension*, 49(3), 429–431.
- Touyz, R. M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M. T., Pagano, P. J., & Schiffrin, E. L. (2002). Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation Research*, 90(11), 1205–1213.
- Touyz, R. M., Tabet, F., & Schiffrin, E. L. (2003b). Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 30(11), 860–866.
- Touyz, R. M., Yao, G., & Schiffrin, E. L. (2003a). c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(6), 981–987.
- Toyo-oka, T., Aizawa, T., Suzuki, N., Hirata, Y., Miyauchi, T., Shin, W. S., Yanagisawa, M., Masaki, T., & Sugimoto, T. (1991). Increased plasma level of endothelin-1 and coronary spasm induction in patients with vasospastic angina pectoris. *Circulation*, 83(2), 476–483.
- Trebak, M., Ginnan, R., Singer, H. A., Jourd'heuil, D., & Jourd, D. (2010). Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(5), 657–674.
- Ungvari, Z., Parrado-Fernandez, C., Csiszar, A., & De Cabo, R. (2008). Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: Implications for vascular aging. *Circulation Research*, 102(5), 519–529.

- Urade, Y., & Eguchi, N. (2002). Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 375-382.
- Urade, Y., & Hayaishi, O. (2000). Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482(1-2), 259-271.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., & Griendling, K. K. (1998). p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 15022-15029.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Vallejo, S., Romacho, T., Angulo, J., Villalobos, L. A., Cercas, E., Leivas, A., Bermejo, E., Carraro, R., Sánchez-Ferrer, C. F., & Peiró, C. (2011). Visfatin impairs endothelium-dependent relaxation in rat and human mesenteric microvessels through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *PLoS ONE*, 6(11), e27299.
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New Biology*, 231(25), 232-235.
- Vanhoutte, P. M. (2002). Ageing and endothelial dysfunction. *European Heart Journal Supplements*, 4(suppl\_A), A8-A17.
- Vanhoutte, P. M. (1988). The endothelium-modulator of vascular smooth-muscle tone. *New England Journal of Medicine*, 319(8), 512-513.
- Vanhoutte, P. M. (1991). Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *European Heart Journal*, 12(Suppl E), 25-32.
- Vanhoutte, P. M. (1993). Is endothelin involved in the pathogenesis of hypertension? *Hypertension*, 21(6 Pt 1), 747-751.
- Vanhoutte, P. M. (1996). Endothelial dysfunction in hypertension. *Journal of Hypertension Supplement*, 14(5), S83-S93.
- Vanhoutte, P. M. (1997). Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Archives Des Maladies Du Coeur et Des Vaisseaux*, 90(6), 9-19.
- Vanhoutte, P. M. (2000). Say NO to ET. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81(1-3), 271-277.
- Vanhoutte, P. M. (2001). Endothelium-derived free radicals: For worse and for better. *Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 23-25.
- Vanhoutte, P. M. (2009a). Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation Journal*, 73(4), 595-601.

- Vanhoutte, P. M. (2009b). How we learned to say NO. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(8), 1156–1160.
- Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. *Hypertension*, 57(3 PART 2), 526–531.
- Vanhoutte, P. M. (2013). Endothelial dysfunction in obesity. *Annual Pharmaceutiques Francaises*, 71(1), 42–50.
- Vanhoutte, P. M., Rubanyi, G. M., Miller, V. M., & Houston, D. S. (1986). Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Annual Review of Physiology*, 48, 307–320.
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. C. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, pp. 22–96.
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E. H. C., & Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, 196(2), 193–222.
- Vasko, R., & Goligorsky, M. S. (2013). Dysfunctional lysosomal autophagy leads to peroxisomal oxidative burnout and damage during endotoxin-induced stress. *Autophagy*, 9(3), 442–444.
- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martásek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P., & Pritchard, K. a. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9220–9225.
- Vaziri, N. D., & Rodríguez-Iturbe, B. (2006). Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nature Clinical Practice. Nephrology*, 2(10), 582–593.
- Verhaar, M. C., Strachan, F. E., Newby, D. E., Cruden, N. L., Koomans, H. a., Rabelink, T. J., & Webb, D. J. (1998). Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation*, 97(8), 752–756.
- Villa, F., Carrizzo, A., Spinelli, C. C., Ferrario, A., Malovini, A., Maciag, A., Damato, A., Auricchio, A., Spinetti, G., Sangalli, E., Dang, Z., Madonna, M., Ambrosio, M., Sitia, L., Bigini, P., Cali, G., Schreiber, S., Perls, T., Fucile, S., et al. (2015). Genetic analysis reveals a longevity-associated protein modulating endothelial function and angiogenesis. *Circulation Research*, 117(4), 333–345.
- Villalba, N., Martínez, P., Briones, A. M., Sánchez, A., Salaíces, M., García-Sacristán, A., Hernández, M., Benedito, S., & Prieto, D. (2009). Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 297(2), H696–H707.
- Virdis, A., Bacca, A., Colucci, R., Duranti, E., Fornai, M., Materazzi, G., Ippolito, C., Bernardini, N., Blandizzi, C., Bernini, G., & Taddei, S. (2013). Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of

- cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension*, 62(2), 337–344.
- Virdis, A., Santini, F., Colucci, R., Duranti, E., Salvetti, G., Rugani, I., Segnani, C., Anselmino, M., Bernardini, N., Blandizzi, C., Salvetti, A., Pinchera, A., & Taddei, S. (2011). Vascular generation of tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(3), 238–247.
- Walpen, S., Beck, K. F., Schaefer, L., Raslik, I., Eberhardt, W., Schaefer, R. M., & Pfeilschifter, J. (2001). Nitric oxide induces MIP-2 transcription in rat renal mesangial cells and in a rat model of glomerulonephritis. *FASEB Journal*, 15(3), 571–573.
- Wang, D., Chabrashvili, T., & Wilcox, C. S. (2004). Enhanced contractility of renal afferent arterioles from angiotensin-infused rabbits: roles of oxidative stress, thromboxane prostanoid receptors, and endothelium. *Circulation Research*, 94(11), 1436–1442.
- Wang, D., Strandgaard, S., Iversen, J., & Wilcox, C. S. (2009). Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress, and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(2), R195–R200.
- Wang, D., Wang, C., Wu, X., Zheng, W., Sandberg, K., Ji, H., Welch, W. J., & Wilcox, C. S. (2014a). Endothelial dysfunction and enhanced contractility in microvessels from ovariectomized rats roles of oxidative stress and perivascular adipose tissue. *Hypertension*, 63(5), 1063–1069.
- Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., Wang, X., Li, K., Han, P., Zheng, M., Yin, J., Wang, W., Mattson, P., Kao, J. P. Y., Lakatta, E. G., Sheu, S., Ouyang, K., Dirksen, R. T., & Cheng, H. (2008). Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*, 134(2), 279–290.
- Wang, Y., Ying, L., Chen, Y. Y., Shen, Y. L., Guo, R., Jin, K. K., & Wang, L. X. (2014b). Induction of heme oxygenase-1 ameliorates vascular dysfunction in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Vascular Pharmacology*, 61(1), 16–24.
- Ward, J. E., Gould, H., Harris, T., Bonacci, J. V., & Stewart, A. G. (2004). PPAR gamma ligands, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 and rosiglitazone regulate human cultured airway smooth muscle proliferation through different mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 141(3), 517–525.
- Wassmann, S., Bäumer, a T., Strehlow, K., van Eickels, M., Grohé, C., Ahlbory, K., Rösen, R., Böhm, M., & Nickenig, G. (2001). Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 103(3), 435–441.
- Wassmann, S., Wassmann, K., & Nickenig, G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44(4), 381–386.
- Watanabe, K. (2002). Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68–69, 401–407.

- Wauters, A., Dreyfuss, C., Pochet, S., Hendrick, P., Berkenboom, G., Van De Borne, P., & Argacha, J. F. (2013). Acute exposure to diesel exhaust impairs nitric oxide-mediated endothelial vasomotor function by increasing endothelial oxidative stress. *Hypertension*, *62*(2), 352–358.
- Weinberg, J. B., Granger, D. L., Pisetsky, D. S., Seldin, M. F., Misukonis, M. A., Mason, S. N., Pippen, A. M., Ruiz, P., Wood, E. R., & Gilkeson, G. S. (1994). The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally adm. *Journal of Experimental Medicine*, *179*(2), 651–660.
- Welch, W. J., Baumgärtl, H., Lübbers, D., & Wilcox, C. S. (2001). Nephron pO<sub>2</sub> and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney International*, *59*(1), 230–237.
- Westbrook, C., & Jarabak, J. (1975). Purification and partial characterization of an NADH-linked delta13-15-ketoprostaglandin reductase from human placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *66*(2), 541–546.
- Westerfeld, R., Gawlik, A., De Heer, E., Kitahara, M., Abou-Rebyeh, F., Floege, J., & Ketteler, M. (2002). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase enhances intraglomerular coagulation in chronic anti-Thy 1 nephritis. *Kidney International*, *61*(3), 834–838.
- Widder, J. D., Guzik, T. J., Mueller, C. F. H., Clempus, R. E., Schmidt, H. H. H. W., Dikalov, S. I., Griendling, K. K., Jones, D. P., & Harrison, D. G. (2007). Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(4), 762–768.
- Wilcox, C. S. (2005). Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney : a critical link to hypertension ? *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *289*(4), R913–R935.
- Wilson, A. M., Harada, R., Nair, N., Balasubramanian, N., & Cooke, J. P. (2007). L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation*, *116*(2), 188–195.
- Wong, M. S. K., & Vanhoutte, P. M. (2010). COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta Pharmacologica Sinica*, *31*(9), 1095–1102.
- Wong, M. S. K., Delansorne, R., Man, R. Y. K., Svenningsen, P., & Vanhoutte, P. M. (2010b). Chronic treatment with vitamin D lowers arterial blood pressure and reduces endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *299*(4), H1226–H1234.
- Wong, M. S. K., Delansorne, R., Man, R. Y. K., & Vanhoutte, P. M. (2008). Vitamin D derivatives acutely reduce endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *295*(1), H289–H296.

- Wong, P. S., Roberts, R. E., & Randall, M. D. (2014). Sex differences in endothelial function in porcine coronary arteries: A role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gap junctions? *British Journal of Pharmacology*, 171(11), 2751–2766.
- Wong, S. L., Leung, F. P., Lau, C. W., Au, C. L., Yung, L. M., Yao, X., Chen, Z. Y., Vanhoutte, P. M., Gollasch, M., & Huang, Y. (2009). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F<sub>2</sub>α mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circulation Research*, 104(2), 228–235.
- Wong, W. T., Tian, X. Y., Chen, Y., Leung, F. P., Liu, L., Lee, H. K., Ng, C. F., Xu, A., Yao, X., Vanhoutte, P. M., Tipoe, G. L., & Huang, Y. (2010a). Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. *Circulation Research*, 107(8), 984–991.
- Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J., & Haystead, T. A. J. (2004). Smooth muscle phosphatase is regulated in Vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of serine 695 in response to cyclic nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34496–34504.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., & Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115–124.
- Xavier, F. E., Aras-López, R., Arroyo-Villa, I., Campo, L. Del, Salaices, M., Rossoni, L. V., Ferrer, M., & Balfagón, G. (2008). Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *British Journal of Pharmacology*, 154(6), 1225–35.
- Xing, W., Yan, W., Liu, P., Ji, L., Li, Y., Sun, L., Tao, L., Zhang, H., & Gao, F. (2013). A novel mechanism for vascular insulin resistance in normotensive young SHR: hypoadiponectinemia and resultant APPL1 downregulation. *Hypertension*, 61(5), 1028–1035.
- Xu, A., & Vanhoutte, P. M. (2012). Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 302(6), H1231–H1240.
- Xu, Y. C., Leung, S. W. S., Leung, G. P. H., & Man, R. Y. K. (2015). Kaempferol enhances endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery through activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *British Journal of Pharmacology*, 172(12), 3003–3014.
- Xu, Y. C., Leung, S. W., Yeung, D. K., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., & Man, R. Y. (2007). Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*, 68(8), 1179–1188.
- Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Haruna, Y., Morita, Y., Kashihara, N., Shinozaki, Y., Mori, H., Goto, M., Ogasawara, Y., & Kajiya, F. (2006). Cardioprotective role of endogenous hydrogen peroxide during ischemia-

- reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), H1138-H1146.
- Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shigeto, F., Goto, M., Ogasawara, Y., & Kajiya, F. (2003). Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation*, 107(7), 1040-1045.
- Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Satoh, M., Kashihara, N., Takaki, A., Goto, M., Ogasawara, Y., & Kajiya, F. (2010). Erythropoietin enhances hydrogen peroxide-mediated dilatation of canine coronary collateral arterioles during myocardial ischemia in dogs in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(6), H1928-H1935.
- Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Shinozaki, Y., Mori, H., Goto, M., Ogasawara, Y., & Kajiya, F. (2007). Important role of endogenous hydrogen peroxide in pacing-induced metabolic coronary vasodilation in dogs in vivo. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(13), 1272-1278.
- Yamamoto, S. (1992). Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1128(2-3), 117-131.
- Yan, C., Huang, A., Kaley, G., & Sun, D. (2007). Chronic high blood flow potentiates shear stress-induced release of NO in arteries of aged rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 293(5), H3105-H3110.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163), 411-415.
- Yang, C., Chen, Z. Y., Wong, S. L., Liu, J., Liang, Y. T., Lau, C. W., Lee, H. K., Huang, Y., & Tsang, S. Y. (2013).  $\beta$ -Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Cardiovascular Research*, 97(3), 520-532.
- Yang, D., Félétou, M., Boulanger, C. M., Wu, H.-F., Levens, N., Zhang, J.-N., & Vanhoutte, P. M. (2002). Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 136(1), 104-110.
- Yang, D., Félétou, M., Levens, N., Zhang, J. N., & Vanhoutte, P. M. (2003). A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension*, 41(1), 143-148.
- Yao, L., Chandra, S., Toque, H. A., Bhatta, A., Rojas, M., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2013). Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout. *Cardiovascular Research*, 97(3), 509-519.
- Yiu, S. S., Zhao, X., Inscho, E. W., & Imig, J. D. (2003). 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid participates in angiotensin II afferent arteriolar vasoconstriction by activating L-type calcium channels. *Journal of Lipid Research*, 44(12), 2391-2399.

- Yokoyama, C., Yabuki, T., Shimonishi, M., Wada, M., Hatae, T., Ohkawara, S., Takeda, J., Kinoshita, T., Okabe, M., & Tanabe, T. (2002). Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation*, *106*(18), 2397–2403.
- Yoshioka, J., Schreiter, E. R., & Lee, R. T. (2006). Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(11–12), 2143–2151.
- Yu, Y., Fan, J., Chen, X. S., Wang, D., Klein-Szanto, A. J., Campbell, R. L., FitzGerald, G. A., & Funk, C. D. (2006). Genetic model of selective COX2 inhibition reveals novel heterodimer signaling. *Nature Medicine*, *12*(6), 699–704.
- Yurdagul, A., Kleinedler, J. J., McInnis, M. C., Khandelwal, A. R., Spence, A. L., Orr, a W., & Dugas, T. R. (2014). Resveratrol promotes endothelial cell wound healing under laminar shear stress through an estrogen receptor- $\alpha$ -dependent pathway. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *306*(6), H797–H806.
- Zelko, I. N., & Folz, R. J. (2005). Extracellular superoxide dismutase functions as a major repressor of hypoxia-induced erythropoietin gene expression. *Endocrinology*, *146*(1), 332–340.
- Zhang, D. X., Borbouse, L., Gebremedhin, D., Mendoza, S. A., Zinkevich, N. S., Li, R., & Gutterman, D. D. (2012b). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activation. *Circulation Research*, *110*(3), 471–480.
- Zhang, D., Xie, X., Chen, Y., Hammock, B. D., Kong, W., & Zhu, Y. (2012a). Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo. *Circulation Research*, *110*(6), 808–817.
- Zhang, Y., Janssens, S. P., Wingler, K., Schmidt, H. H. H. W., & Moens, A. L. (2011). Modulating endothelial nitric oxide synthase : a new cardiovascular therapeutic strategy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *(301)*, 634–646.
- Zhao, X., Dey, A., Romanko, O. P., Stepp, D. W., Wang, M.-H., Zhou, Y., Jin, L., Pollock, J. S., Webb, R. C., & Imig, J. D. (2005). Decreased epoxygenase and increased epoxide hydrolase expression in the mesenteric artery of obese Zucker rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *288*(1), R188–R196.
- Zhao, X., Falck, J. R., Gopal, V. R., Inscho, E. W., & Imig, J. D. (2004a). P2X receptor-stimulated calcium responses in preglomerular vascular smooth muscle cells involves 20-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *311*(3), 1211–1217.
- Zhao, X., Yamamoto, T., Newman, J. W., Kim, I. H., Watanabe, T., Hammock, B. D., Stewart, J., Pollock, J. S., Pollock, D. M., & Imig, J. D. (2004b). Soluble epoxide hydrolase inhibition protects the kidney from hypertension-induced damage. *Journal of the American Society of Nephrology*, *15*(5), 1244–1253.

- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2013). Endothelial nitric oxide synthase-independent release of nitric oxide in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *344*(1), 15–22.
- Zheng, Y., & Shen, X. (2005). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells. *Redox Report*, *10*(1), 29–36.
- Zhong, J. C., Yu, X. Y., Huang, Y., Yung, L. M., Lau, C. W., & Lin, S. G. (2007). Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovascular Research*, *74*(3), 388–395.
- Zhou, Y., Luo, W., Zhang, Y., Li, H., Huang, D., & Liu, B. (2013). Cyclo-oxygenase-1 or -2-mediated metabolism of arachidonic acid in endothelium-dependent contraction of mouse arteries. *Experimental Physiology*, *98*(7), 1225–1234.
- Zhou, Z., Hemradj, V., de Beer, V. J., Gao, F., Hoekstra, M., Merkus, D., & Duncker, D. J. (2012). Cytochrome P-450 2C9 exerts a vasoconstrictor influence on coronary resistance vessels in swine at rest and during exercise. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *302*(24), H1747–H1755.
- Zhu, W., Cheng, K. K. Y., Vanhoutte, P. M., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2008). Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clinical Science*, *114*(5), 361–374.
- Zoccali, C., Curatola, G., Panuccio, V., Tripepi, R., Pizzini, P., Versace, M., Bolignano, D., Cutrupi, S., Politi, R., Tripepi, G., Ghiadoni, L., Thadhani, R., & Mallamaci, F. (2014). Paricalcitol and endothelial function in chronic kidney disease trial. *Hypertension*, *64*(5), 1005–1011.
- Zou, A. P., Fleming, J. T., Falck, J. R., Jacobs, E. R., Gebremedhin, D., Harder, D. R., & Roman, R. J. (1996). Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+) -channel activity. *American Journal of Physiology*, *270*(5 Pt 2), F822–F832.
- Zou, A. P., Imig, J. D., Kaldunski, M., Montellano, P. R. O. de, Sui, Z., & Roman, R. J. (1994a). Inhibition of renal vascular 20-HETE production impairs autoregulation of renal blood flow. *American Journal of Physiology*, *266*(2 Pt 2), F275–F282.
- Zou, A. P., Imig, J. D., Montellano, P. R. O. de, Sui, Z., Falck, J. R., & Roman, R. J. (1994b). Effect of P-450 omega-hydroxylase metabolites of arachidonic acid on tubuloglomerular feedback. *American Journal of Physiology*, *266*(6 Pt 2), F934–F941.
- Zou, M. H., Shi, C., & Cohen, R. A. (2002). High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes*, *51*(1), 198–203.
- Zou, Q., Leung, S. W. S., & Vanhoutte, P. M. (2015). Transient receptor potential channel opening releases endogenous acetylcholine, which contributes to endothelium-dependent relaxation induced by mild hypothermia in spontaneously hypertensive rat but not wistar-kyoto rat arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *354*(2), 121–30.

Zuloaga, K. L., Davis, C. M., Zhang, W., & Alkayed, N. J. (2014). Role of aromatase in sex-specific cerebrovascular endothelial function in mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.*, 306(7), H929–H937.

